



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

BRUNO JAEGGER LARANJEIRA

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
SOROTIPOS DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS
DE PORTADORES E DE INDIVÍDUOS COM
INFECÇÃO SISTÊMICA EM FORTALEZA, BRASIL.**

FORTALEZA/CE

2010

BRUNO JAEGGER LARANJEIRA

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E
SOROTIPOS DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS
DE PORTADORES E DE INDIVÍDUOS COM
INFECÇÃO SISTÊMICA EM FORTALEZA, BRASIL.**

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

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

FORTALEZA/CE

2010

BRUNO JAEGGER LARANJEIRA

SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E SOROTIPOS DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DE PORTADORES E DE INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO SISTÊMICA EM FORTALEZA, BRASIL.

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

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Carlos Rey
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Leila Carvalho Campos
Fundação Oswaldo Cruz-Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Bahia

Prof^a. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho (Orientadora)
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

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

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

*Ao meu irmão, Brenno Jaegger Laranjeira,
que foi importantíssimo na minha trajetória
para que eu chegasse até aqui.
Ao meu irmão Thiago pelo companheirismo nos
momentos em que me sentia só.*

*À minha noiva, Adriana Pinheiro Rodrigues,
que apesar de todo meu estresse e mau-humor,
esteve sempre presente, dando-me amor,
carinho e compreensão em cada etapa
desse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, coordenador do Mestrado em Microbiologia Médica, pela sua dedicação para o funcionamento desse mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Leila Carvalho Campos, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FioCruz-BA, pelos ensinamentos em biologia molecular, pela sua disponibilidade e pela sua paciência em passar os seus conhecimentos.

À Diretora do LACEN-CE, Dr^a Maria Iracema de Aguiar Patrício, pela autorização da utilização dos isolados sistêmicos e ao acesso às sorotipagens dos mesmos utilizados nesse trabalho.

À Dr^a. Maria do Carmo, do LACEN-CE, pela sua colaboração direta para realização deste trabalho e pela sua disponibilidade permanente sempre que precisei.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Luís Carlos Rey, Prof^a. Dr^a. Leila Carvalho Campos e Prof^a. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira, por terem aceitado gentilmente a participar da avaliação desse trabalho.

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

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

Aos meus colegas de curso, em especial aos amigos Rafael Carvalho, Emerson Ramalho e Anne Carolinne Bezerra Perdigão pelo companheirismo e palavras de estímulo ao longo desses meses.

Aos meus amigos e primos por compreenderem meu afastamento temporário, pelo apoio e torcida.

Ao José Olavo Moraes, técnico do Setor de Microbiologia, pelo auxílio concedido para a realização desse trabalho, por sua grande amizade e pelo café.

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

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

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

“Ser feliz é reconhecer que vale
a pena viver apesar de todos os
desafios, incompreensões e períodos
de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos
problemas e se tornar um autor
da própria história. É atravessar
desertos fora de si, mas ser capaz de
encontrar um oásis no recôndito da
sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã
pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios
sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um "não".

É ter segurança para receber uma
crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir
um castelo...”

Fernando Pessoa

RESUMO

O *Streptococcus (S.) pneumoniae* é considerado como o principal agente causador de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade. Todas as doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização do *S. pneumoniae* na nasofaringe, podendo progredir para doença invasiva se as barreiras naturais forem cruzadas. Nas últimas décadas, o aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à antibióticos β -lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos tem dificultado o tratamento da infecção pneumocócica. Atualmente cerca de 13 sorotipos de *S. pneumoniae* respondem por mais de 85% dos isolados invasivos. A vacina pneumocócica polissacarídica conjugada 7-valente tem sido amplamente recomendada para crianças menores de cinco anos. Os objetivos desse estudo foram determinar a prevalência de *S. pneumoniae* em crianças portadoras, a frequência de isolados de *S. pneumoniae* de indivíduos com infecção sistêmica, o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e os sorotipos mais comuns, em Fortaleza, Brasil. Os isolados de portadores foram recuperados a partir de *swabs* de nasofaringe de crianças usuárias de creches, enquanto que os isolados de infecção sistêmica foram cedidos pelo LACEN-CE. Foram realizadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para penicilina e ceftriaxona para todos os isolados, e levofloxacina apenas para os isolados de nasofaringe. Os pontos de corte das CIM foram determinados de acordo com o CLSI (2007). As sorotipagens dos isolados sistêmicos foram realizadas pela reação de Quellung, enquanto que a genotipagem capsular dos isolados de portadores foi realizada pela técnica de multiplex PCR. De 215 crianças usuárias de creches, foram isolados *S. pneumoniae* em 152 (71%). As CIM de 137 isolados de portadores mostraram uma taxa resistência de 71% para penicilina e de 21% para ceftriaxona. Não houve resistência nos testes com levofloxacina. Comparado a um estudo similar, realizado há 10 anos, em Fortaleza, nossos resultados apresentaram um aumento significativo nas taxas de resistência à penicilina e ceftriaxona. De 26 isolados de nasofaringe que apresentaram resistência plena, apenas, seis isolados (23%) tiveram a genotipagem capsular identificada por multiplex PCR. A incidência de isolados invasivos neste estudo por ano, foi de, aproximadamente, 1 caso/100.000 hab. Dos 52 isolados, 42% apresentaram resistência à penicilina e 13,5% à ceftriaxona. Os sorotipos mais comuns dos isolados sistêmicos foram 19F (12%), 14, 3, 6A (8% cada), 4, 18C e 9V (6% cada), com cobertura estimada, tanto para vacina pneumocócica conjugada 7-valente quanto para a 10-valente, de 31,8%.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, portador, infecção, resistência a antibióticos, sorotipagem.

ABSTRACT

Streptococcus (S.) pneumoniae is considered the principal causative agent of morbidity and mortality in children younger than five years of age. All pneumococcal diseases are initiated by establishing a *S. pneumoniae* colonization in nasopharynx, the disease progressing to systemic disease if natural barrier are crossed. During the last decades, the increasing amount of resistant *S. pneumoniae* strains to beta-lactams and other classes of antimicrobials has modified the treatment of pneumococcal infection. At present, nearly 13 serotypes respond for more than 85% of invasive isolates. The 7-valent polysaccharide-conjugated pneumococcal vaccine has been widely recommended for use in children younger than five years. The aims of this study were to determine the *S. pneumoniae* carrier in children, the frequency of serotypes from systemic infection patients, the susceptibility profile to antimicrobials in Fortaleza, Brazil. Carrier state isolates were recovered from nasopharyngeal swabs from children attending day-care center facilities, while the isolates from systemic infection furnished by LACEN-CE. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) to penicillin and ceftriaxone were assessed for all isolates, and levofloxacin MIC only from nasopharyngeal isolates. MIC cut-offs were determined according to CLSI standards (2007). Serotyping of systemic isolates was performed by Quellung reaction, while capsular genotyping of carrier isolates was performed by multiplex PCR assay. Of 215 children attending day-care centers, 152 *S. pneumoniae* isolates were identified (71%). Penicillin MIC showed 71% of resistance, and for ceftriaxone, 21% of resistance. No resistance was found for levofloxacin MIC testing. When compared to a 10-year old similar study in Fortaleza, our results have shown a significant increase of penicillin and ceftriaxone resistance rates. Of 26 isolates tested, only six nasopharyngeal isolates (23%) were positively genotyped by multiplex PCR. The incidence of invasive isolates was 1/100,000 inhab. per year. Of 52 systemic isolates serotyped, 42% were penicillin-resistant, and 13.5% were ceftriaxone-resistant. Systemic serotypes identified were 19F, 3, 6A, 4, 18C and 9V, with a estimated coverage by the 7-valent and 10-v pneumococcal polysaccharide conjugated vaccines of 31.8%.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*, carrier state, infection, drug resistance, serotyping.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Histórico, Classificação e Características Bacterianas.....	15
1.2. Patogênese.....	16
1.3. Epidemiologia	18
1.4. Resistência a Antimicrobianos.....	20
1.5. Sorotipos	23
1.6. Vacinas Pneumocócicas.....	26
1.7. Pergunta de Partida.....	29
1.8. Hipóteses.....	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Coleta das Amostras.....	31
3.1.1. Amostras de Portadores Sadios.....	31
3.1.2. Amostras de Indivíduos com Infecção Sistêmica.....	32
3.2. Coleta do Material de Nasofaringe	33
3.3. Isolamento Bacteriano do Material de Nasofaringe.....	33
3.4. Identificação de <i>S. Pneumoniae</i>	34
3.5. Estocagem das Amostras	36
3.6. Teste de Sensibilidade	36
3.6.1. Teste de Microdiluição em Caldo	36
3.6.2. E-test.....	37
3.7. Sorotipagem.....	38
3.7.1. Sorotipagem dos Isolados Sistêmicos.....	38
3.7.2. Tipagem Molecular da Cápsula dos Isolados de Portadores.....	38
3.7.2.1. Extração de DNA.....	39
3.7.2.2. <i>Primers</i>	39
3.7.2.3. Esquema de Multiplex PCR	40
3.8. Análise Estatística	41
3.8.1. Tamanho da Amostra	41
3.8.2. Randomização dos Participantes	42
3.9. Aspectos Éticos	42

3.9.1. Revisão da Comitê de Ética e Consentimento Informado e Esclarecido	42
3.9.2. Confidencialidade dos Dados e Direito à Privacidade dos Participantes	43
4. RESULTADOS	43
4.1. Portadores.....	43
4.1.1. Prevalência	43
4.1.2. Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	44
4.1.3. Sorotipos.....	45
4.2. Amostras de Infecção Sistêmica.....	46
4.2.1. Número de Amostras	46
4.2.2. Resistência aos Antimicrobianos.....	47
4.2.3. Sorotipos.....	48
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	
Anexo I – Questionário.....	74
Anexo II – Sequência dos <i>primers</i> e tamanho dos amplicons.....	75
Anexo III – Esquema de Multiplex PCR.....	80
Anexo IV - Componentes da Reação.....	87
Anexo V - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
Anexo VI - Aprovação do Comitê de Ética.....	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Resistência à penicilina no Brasil por ano.....	23
FIGURA 2 – Organização genética da região do DNA do <i>S. pneumoniae</i> que contém o cluster dos genes capsulares de diferentes genótipos.....	24
FIGURA 3 – Sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> associados à resistência à penicilina (CLSI, 2007), período de 2000-2006, em crianças < 6 anos.....	25
FIGURA 4 – Impacto estimado da cobertura das vacinas conjugadas (%) 7, 9,10 e 13-valente frente aos sorotipos encontrados com mais frequência no Brasil, 2000-2006,< 6 anos.....	28
FIGURA 5 – Mapa da cidade de Fortaleza, dividida em seis regionais.....	32
FIGURA 6 – Coleta de material da nasofaringe, e conservação da amostra em meio de transporte Stuart.....	33
FIGURA 7 – Crescimento em ágar sangue de colônias planas com alfa hemólise ao seu redor, características de <i>S. pneumoniae</i>	34
FIGURA 8 – Sensibilidade à optoquina.....	35
FIGURA 9 - Teste de aglutinação em látex.....	35
FIGURA 10 – Reação de Quellung, antígeno tipo específico.....	38
FIGURA 11 – Taxa de sensibilidade e resistência dos isolados de <i>S. pneumoniae</i> , baseado nas CIM, frente aos antibióticos: penicilina, ceftriaxona e levofloxacina.....	44
FIGURA 12 – Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da genotipagem por multiplex PCR dos isolados de <i>S. pneumoniae</i> de nasofaringe de crianças saudáveis usuárias de creches.....	46
FIGURA 13 – Distribuição dos sítios de isolamentos de <i>S. pneumoniae</i> provenientes de amostras sistêmicas.....	47
FIGURA 14 – Número de isolados de <i>S. pneumoniae</i> sistêmicos frente aos antimicrobianos: penicilina e ceftriaxona.....	48
FIGURA 15 – Distribuição dos sorotipos dos isolados <i>S. pneumoniae</i> de indivíduos com infecção sistêmica de X Sensibilidade à penicilina.....	49
FIGURA 16 – Impacto estimado da cobertura das vacinas conjugadas (%) 10 e 13-valente frente ao total de sorotipos e sobre os sorotipos relacionados com a resistência encontrados.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Prevalência dos portadores do <i>S. pneumoniae</i> distribuída por sexo e idade.....	43
TABELA 2 - Comparação entre taxas de portadores e a sensibilidade à penicilina e à ceftriaxona, de dois diferentes estudos realizados em Fortaleza.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHI - Brain Heart Infusion
CIM - concentração inibitória mínima
CLSI - *Clinical Laboratory Standard Institute*
DNA – ácido desoxirribonucléico
E-test - epsilometer-test
EUA - Estados Unidos da América
hab.- habitantes
IgA1 - imunoglobulina da classe A1
IL - interleucina
LCR - líquido cefalorraquidiano
MHC - complexo de histocompatibilidade
OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde
PAF - fator de agregação plaquetária
PCR - Polymerase Chain Reaction
PspA - adesina pneumocócica de superfície A
S. pneumoniae - Streptococcus pneumoniae
SIREVA - Sistema Regional de Vacinas
TNF - fator de necrose tumoral

1. INTRODUÇÃO

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

O *S. pneumoniae* pode causar uma variedade de doenças, incluindo doenças invasivas, como meningite, bacteremia e pneumonia, bem como doenças não invasivas como, otite média e sinusite (CDC, 1997). Os fatores que permitem que o pneumococo migre da nasofaringe e cause doença invasiva variam, e dependem da virulência do microrganismo, do estado imune do hospedeiro e da existência de uma infecção viral precedente. Crianças menores de dois anos, idosos, pacientes imunocomprometidos, pacientes asplênicos, alcoolismo e pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica apresentam um maior risco de contrair doença pneumocócica. (RIVERA-OLIVERO et al, 2007). Segundo Monteros e colaboradores (2007), 65% das infecções pneumocócicas ocorrem em crianças menores de dois anos e que este número aumenta para 85% em crianças menores de quatro anos de idade.

O *S. pneumoniae* é considerado como o principal agente causador de morbidade e mortalidade, com cerca de 1,2 milhões de mortes por ano representando 9% das mortes nos países em desenvolvimento (NUNES et al, 2005; MYERS e GERVAIX, 2007). Na América Latina, 150.000 crianças menores de cinco anos de idade morrem de pneumonia pneumocócica a cada ano, e aproximadamente 90% dessas mortes ocorrem nas regiões mais pobres do continente (REY et al, 2002).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o *S. pneumoniae* causava anualmente cerca de 3.000 casos de meningite, 50.000 casos de bacteremia, 500.000 casos de pneumonia e sete milhões de casos de otite aguda, em média (FRASER et al, 2001).

Até a década de 1960 os antibióticos β -lactâmicos foram amplamente utilizados para o tratamento de infecções pneumocócicas, pois se acreditava até então na sensibilidade universal do *S. pneumoniae* e também por causa da crença de que os estreptococos não possuíam mecanismos para o desenvolvimento de resistência clinicamente significativa. No entanto, houve claramente uma subavaliação da capacidade evolutiva e adaptativa do *S. pneumoniae*. Desde a primeira descrição de pneumococo resistente à penicilina em Boston, em 1965, e especialmente na última década (década de 1990), o problema da resistência pneumocócica tornou-se um motivo de grande preocupação no mundo, uma evolução geralmente atribuída a um consumo extensivo de antibióticos. A vigilância de resistência pneumocócica entre os isolados de nasofaringe de crianças tem sido uma maneira prática e útil de estimar a prevalência de isolados resistentes em uma comunidade (BAQUERO et al, 2002; STRATCHOUNSKI et al, 2006; KATSAROLIS et al, 2009).

Mais de 90 sorotipos de pneumococos já foram identificados com base nas diferenças antigênicas das cápsulas polissacarídicas. A distribuição destes sorotipos varia de acordo com a faixa etária, sintomas clínicos e área geográfica. A prevalência regional de determinados sorotipos destaca a importância de se conhecer os sorotipos prevalentes em cada região. (VIEIRA et al, 2007). Assim, é necessário monitorar continuamente a frequência relativa e a distribuição de sorotipos de pneumococos em cada região, para projetar a formulação de vacinas mais eficazes (LAUDERDALE et al, 2006).

1.1. Histórico, Classificação e Características Bacterianas

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

Em 1886 esse organismo foi referido como *Pneumococcus* por Fraenkel, devido a sua propensão de causar doença pulmonar. Neufeld em 1902 descreveu a reação de NEUFELD-QUELLUNG (reação antígeno-anticorpo entre a cápsula bacteriana e antissoros homólogos), técnica utilizada até hoje na identificação dos tipos capsulares (AUSTRIAN, 1981). O microrganismo foi rebatizado de *Diplococcus pneumoniae* em 1920 – uma denominação referindo-se obviamente aos cocos arrançados aos pares que causavam pneumonia (WATSON et al, 1993).

Em 1974, foi dado o nome atual ao pneumococo, *Streptococcus pneumoniae*, com base, principalmente, no seu crescimento característico de cocos dispostos em cadeias quando em meio líquido (WATSON et al, 1993).

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva, capsulada em forma de cocos (lanceolados) pertencente ao gênero *Streptococcus*, família *Streptococcaceae* e medindo 0,5 a 1,25 µm de diâmetro (DEIBEL; SEELEY, 1974). Costumam permanecer arranjados aos pares ou dispostos em pequenas cadeias. Não apresentam atividade de catalase nem de citocromo oxidase. São exigentes quanto à atmosfera de crescimento “in vitro”, pois têm o crescimento estimulado por um aumento na concentração de gás carbônico (CO₂) além de um crescimento otimizado em ambiente de microaerofilia. São também exigentes nutricionais e requerem meios de culturas ricos em vitaminas e proteínas. Em meios de cultura sólido suplementados com sangue desfibrinado de carneiro crescem como colônias lisas, pequenas, brilhantes e circundadas com um halo esverdeado de alfa-hemólise. São sensíveis ao aquecimento a 60°C por 30 minutos, solúveis na presença de sais biliares e sensíveis à optoquina (FACKLAM; WASHINGTON, 1991; KONEMAN et al, 2008).

1.2. Patogênese

Todas as doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização, isto é, com o estado de portador. Nenhuma das formas comuns de doença pneumocócica é transmitida, o que implica dizer que as características de virulência dos pneumococos são, provavelmente, adaptações que aumentam com a persistência do microrganismo no hospedeiro durante a colonização (KADIOGLU et al, 2008). A colonização pode progredir para doença invasiva se as barreiras naturais forem cruzadas (BOGAERT et al, 2004).

Em um estudo longitudinal em crianças portadoras de *S. pneumoniae* nos Estados Unidos, foi reportado que a média de idade de aquisição do pneumococo é de seis meses. Nos primeiros 24 meses de vida, 95% das crianças são colonizadas em algum momento e 73% adquirem pelo menos dois sorotipos. A duração do estado de portador diminui com a sucessiva aquisição dos sorotipos de pneumococos, e por isso, é inversamente relacionado com a idade (OBARO; ADEGBOLA, 2002).

A colonização por *S. pneumoniae* implica na adesão do microrganismo a carboidratos de superfície celular presentes sobre o epitélio íntegro (não inflamado). A aderência inicial dos pneumococos é mediada por proteínas de superfície associadas à parede celular, as adesinas, principalmente a adesina pneumocócica de superfície A (PspA), que interage com

receptores presentes na superfície das células epiteliais da faringe. Pode ocorrer interação com o ácido siálico da mucosa através da neuraminidase pneumocócica ou através de ligantes de superfície celular do pneumococo, que se ligam aos resíduos de dissacarídeo N-acetil-D-galactosamina-galactose sobre a superfície das células do trato respiratório. Além disso, as proteínas de superfície contribuem para as características hidrofóbicas e eletrostáticas de superfície dos pneumococos o que facilita a adesão às células do hospedeiro através de interações físico-químicas (BOGAERT et al, 2004). Outra enzima que facilita a aderência e colonização inicial é a protease IgA1, pois a enzima hidrolisa e inativa a imunoglobulina A1 (IgA1) presente nas mucosas (WEISER et al, 2003).

Em geral, a colonização não é seguida de doença. A conversão de colonização assintomática para doença invasiva requer a produção de fatores inflamatórios locais, como a interleucina (IL) -1 e do fator de necrose tumoral (TNF). A cascata inflamatória altera o número de receptores e o alvo das células epiteliais e endoteliais para um novo receptor, a proteína G acoplada ao fator de agregação plaquetária (PAF). Os pneumococos mais virulentos se ligam ao receptor do PAF através da fixação da fosforilcolina presente na parede celular bacteriana. A ligação a estes receptores induz a internalização do pneumococo e promove a migração intracelular através do epitélio respiratório e endotélio vascular, resultando em doença invasiva. (VELASCO et al, 1995; OBARO; ADEGBOLA, 2002; BOGAERT et al, 2004).

A virulência do pneumococo tem sido atribuída a várias estruturas, a maioria das quais está situada em sua superfície. A cápsula é constituída por polímeros de alto peso molecular, composto por unidades de repetição de oligossacarídeos, que pode conter entre dois e oito monossacarídeos. Muitos sorotipos possuem componentes ácidos, como ácido D-glucurônico ou grupos fosfatos, ribitol ou arabinitol. Em seis sorotipos, a fosforilcolina faz parte dos polissacarídeos capsulares. A cápsula polissacarídica é o mais importante fator de virulência do pneumococo, porque protege a bactéria da fagocitose. A estrutura química da cápsula e, em menor escala, a sua espessura determina a habilidade diferencial dos sorotipos de sobreviver na corrente sanguínea e, possivelmente causar doença invasiva. Existem diferenças entre os sorotipos em termos de ativação da via alternativa (C3) do complemento, - fixação e ativação em cascata dos componentes do sistema complemento com lise bacteriana – a deposição e degradação dos componentes do complemento na cápsula, resistência à fagocitose e à capacidade de induzir anticorpos (VELASCO et al, 1995; KONEMAN et al, 2008).

A camada subjacente à cápsula, a parede celular, consiste de polissacarídeos e ácidos teicóicos e serve como uma âncora para proteínas de superfície associadas à parede celular. A parede celular é uma das causas da intensa reação inflamatória que acompanha a infecção pneumocócica, uma vez que ativa a cascata da via alternativa do sistema Complemento, com liberação de C3a e C5a, que aumentam a permeabilidade vascular, induzem a desgranulação de mastócitos e recrutam e ativam leucócitos polimorfonucleares ao local da inflamação, e ainda ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF) (VELASCO et al, 1995; BOGAERT et al, 2004; KONEMAN et al, 2008).

Outro importante fator de virulência produzido pelos pneumococos é a pneumolisina, uma proteína que se acumula no interior das células durante o crescimento, sendo liberada durante a lise celular pela autolisina. A pneumolisina interage com o colesterol nas membranas celulares de uma variedade de células hospedeiras, produzindo poros e levando à lise das células. A pneumolisina também inibe a atividade bactericida de células fagocíticas, interrompe a motilidade das células epiteliais ciliadas do trato respiratório, estimula a produção de citocinas pelos macrófagos (particularmente IL-1, IL-8 e TNF) e ativa a via clássica do sistema complemento. A autolisina, uma amidase, é uma enzima que hidrolisa a camada de peptidoglicano em um sítio específico, entre o ácido N-acetil murâmico e o resíduo de alanina da ligação peptídica, liberando dessa forma a pneumolisina para o meio extracelular, assim como fragmentos da parede celular (VELASCO et al, 1995; KONEMAN et al, 2008).

Como a inflamação é responsável por induzir a maioria dos sintomas da doença pneumocócica, este grupo de fatores de virulência pode, dessa maneira, ser diretamente responsável pela mortalidade e morbidade causada pelo pneumococo após o início da infecção (VELASCO et al, 1995).

1.3. Epidemiologia

O nicho ecológico de *S. pneumoniae* é a nasofaringe de humanos (NUNES et al, 2005), e principalmente das crianças. Esta colonização é transmitida de indivíduo portador a não-portador através de gotículas respiratórias. Os isolados de nasofaringe em crianças saudáveis têm um potencial de tornarem-se invasivos e causar infecção sistêmica ou serem aspirados e causarem pneumonia comunitária ou otite média aguda (SCHULTZ et al., 2006).

A condição de portador de pneumococo na nasofaringe é o maior fator de transmissão horizontal da doença pneumocócica na comunidade (MALFROOT et al, 2004; LAVAL et al, 2006). Os fatores de risco que elevam a taxa de portador nas crianças são afetados pelos fatores ambientais e pelos fatores sócioeconômicos, incluindo o número de irmãos, renda, exposição aos antibióticos, o tabagismo dos pais e, principalmente a utilização de creches, devido à aglomeração (BOGAERT et al, 2004; CHEN et al, 2007). Entre os adultos, a disseminação da colonização ou infecção de *S. pneumoniae* foi documentada em campos militares, prisões e enfermarias (PALLARES et al, 2003).

Na América do Sul a taxa de colonização varia de 10% (região Sudeste do Brasil, 2001) a 66% (Quito, Equador, 2002) (CARDOZO et al, 2006). A taxa de colonização em crianças, no Brasil, varia de 30 a 50% (FONSECA et al, 2005).

Em um estudo com crianças saudáveis e usuárias de creches, realizado há 10 anos, em 11 creches do município de Fortaleza, Rey e colaboradores (2002) encontraram uma taxa de colonização por *S. pneumoniae* de 72%.

Estima-se que cerca de um milhão de crianças morrem de doença pneumocócica a cada ano, a maioria nos países em desenvolvimento e menores de cinco anos de idade. Poucos dados estão disponíveis sobre a morbidade e mortalidade pneumocócica em adultos em países em desenvolvimento, mas a taxa presumida é bastante elevada (HAUSDORFF et al, 2007).

Em crianças menores que cinco anos de idade, a incidência anual de doença invasiva pneumocócica (DIP) varia aproximadamente de 10 a 100 casos/100.000 habitantes (hab.). Para a meningite pneumocócica, em particular, a incidência relatada na população geral é de 1-2 casos/100.000 hab. em países desenvolvidos, aumentando para 20 casos/100.000 hab. em países em desenvolvimento. A maior incidência é em crianças menores de dois anos de idade, e, especialmente, nos países em desenvolvimento em crianças menores de seis meses (HAUSDORFF et al, 2007).

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), entre os 6470 isolados de *S. pneumoniae* invasivos identificados, 69,3% foram recuperados de líquido cefalorraquidiano (LCR), 19,1% de pneumonia invasiva e 11,6% de bacteremia ou sepse, artrite ou abscesso abdominal. Os dados sobre a idade do paciente estavam disponíveis em 5520 isolados, dos quais 42,8% eram menores de cinco anos de idade.

1.4. Resistência a Antimicrobianos

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

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

Nas últimas décadas, o aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, a outros antibióticos β -lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos tem complicado o tratamento da infecção pneumocócica (HSIEH et al, 2009). O frequente uso de antibióticos em crianças tem sido identificado como o maior fator de risco para a seleção de resistência em pneumococos (BRANDILEONE et al, 2006).

A penicilina é importante para o tratamento da pneumonia pneumocócica e seu baixo custo favorece a sua utilização nos países em desenvolvimento. Infelizmente, a eficácia da penicilina está ameaçada pelo aparecimento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes (CAMARGOS et al, 2006).

A definição de resistência do *S. pneumoniae* à penicilina é dada pela avaliação da concentração inibitória mínima (CIM). Até 2007, as cepas que apresentavam a $CIM \leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ eram consideradas sensíveis, CIM entre 0,12-1,0 $\mu\text{g/ml}$, resistência intermediária, e $CIM \geq 2$ $\mu\text{g/ml}$, resistência plena (CLSI, 2007), porém a partir de 2008, houve uma mudança de ponto de corte para penicilina para as cepas isoladas de meningite, as que apresentassem a $CIM \leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ eram consideradas sensíveis, mas as que apresentassem a $CIM \geq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$, já eram consideradas resistentes, sem que houvesse ponto de corte intermediário (CLSI, 2008).

As penicilinas e os outros antibióticos β -lactâmicos apresentam atividade bactericida contra o *S. pneumoniae*. Especificamente, esses antibióticos se ligam às enzimas transpeptidases, ou proteínas ligadoras de penicilinas (PLPs), envolvidas na montagem e metabolismo do peptidoglicano da parede celular bacteriana, inibindo, assim, as ligações cruzadas das cadeias de peptidoglicano (MORENO; CASTAÑEDA, 2003; ROGERS et al, 2007).

A resistência à ação das penicilinas nos pneumococos é mediada por genes cromossômicos, que sofrem mutações sucessivas no código genético que comandam alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas, as PLPs 1a, 1b, 2x, 2a, 2b e 3 e que passam a apresentar baixa afinidade de ligação com as penicilinas (ROSSONI et al, 2008). Estas PLPs alteradas apresentam também baixa afinidade para outros antibióticos beta-lactâmicos, mas, nos pneumococos com resistência intermediária, as cefalosporinas da segunda e da terceira gerações e as carbapenemas ainda têm afinidade de ligação e exercem ação antimicrobiana. Contudo, nas cepas que apresentam resistência plena, que têm maior alteração nas PBP 1a, 2b e 2x, ocorre 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 (KLUGMAN, 1990; TAVARES, 2000; MORENO; CASTAÑEDA, 2003; CAMARGOS et al, 2006; ZETTLER et al, 2004).

Os pneumococos com elevada resistência às penicilinas freqüentemente mantêm a sensibilidade às fluoroquinolonas antipneumocócicas (levofloxacina, esparfloxacina, clinafloxacina e outras) e aos glicopeptídeos. Desta maneira, essas drogas representam alternativas terapêuticas para infecções causadas por estas cepas resistentes: as fluoroquinolonas para as infecções respiratórias e a vancomicina e a teicoplanina para as infecções sistêmicas (TAVARES, 2000).

As fluoroquinolonas atuam inibindo as topoisomerases tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV, que interferem na síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) bacteriano (PINOS et al, 2000). As fluoroquinolonas mais novas têm uma atividade reforçada contra patógenos respiratórios e estão sendo mais amplamente utilizadas. A levofloxacina, a primeira das fluoroquinolonas da nova geração, tem sido disponibilizada extensivamente já há alguns anos (PALLARES et al, 2003). Recentemente, vêm sendo registradas cepas de pneumococos que apresentam modificações de suas topoisomerases e apresentam um mecanismo de efluxo que as tornam resistentes também às novas FQ (TAVARES, 2000).

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

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

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

Em 1993, o Sistema Regional de Vacinas (SIREVA) foi implementado no Brasil, patrocinado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e pelo Ministério da Saúde do Brasil. Este projeto é responsável pela vigilância laboratorial do *S. pneumoniae* na América Latina, contribuindo significativamente para a investigação dos níveis de resistência aos antimicrobianos comumente usados e dos sorotipos prevalentes em cada área (VIEIRA et al, 2007).

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

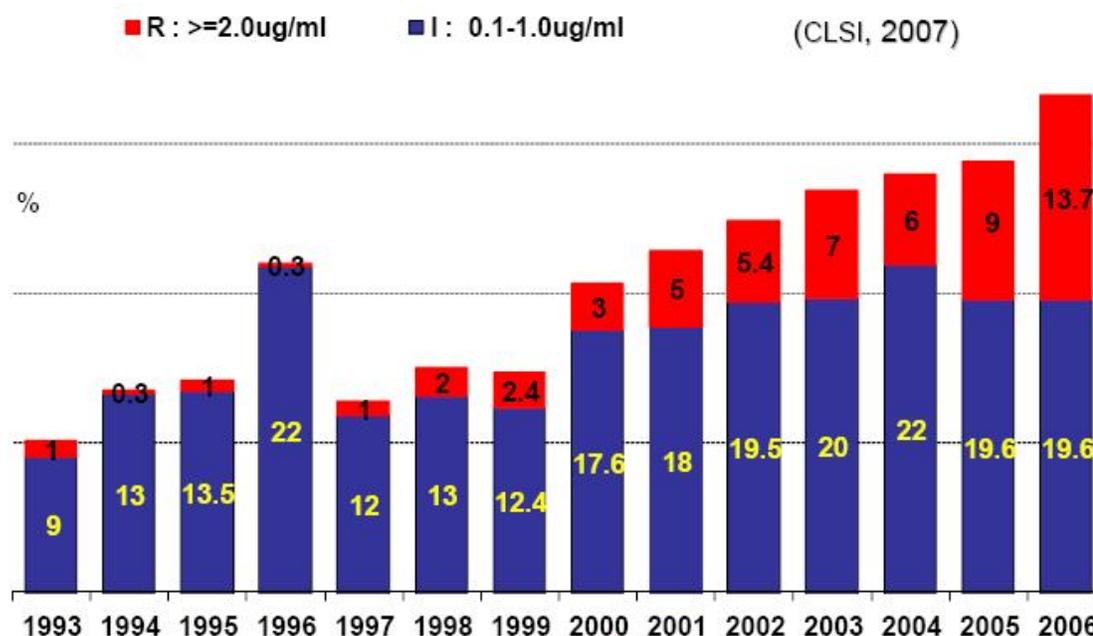


Figura. 1 – Resistência à penicilina no Brasil por ano. R: resistência plena; I: resistência intermediária.

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

1.5. Sorotipos

Existem 91 sorotipos de *S. pneumoniae* imunologicamente distintos identificados atualmente, diferindo na composição química dos seus polissacarídeos capsulares (HAUSDORFF et al, 2005). Porém, cerca de quinze sorotipos parecem causar a maioria das doenças invasivas. Na América Latina, 13 sorotipos correspondem a mais de 85% dos isolados invasivos (DIAS et al, 2007).

Estudos da distribuição dos sorotipos dependem da sorotipagem convencional (Reação de Quellung) para determinação direta dos sorotipos de *S. pneumoniae* (DIAS et al, 2007). A reação de Quellung se baseia na capacidade de o soro hiperimune específico reagir com a cápsula da bactéria em suspensão (HENRICHSEN, 1995). Os sorotipos são classificados segundo o sistema de nomenclatura dinamarquesa, que leva em consideração as características imunológicas e antigênicas dos polissacarídeos capsulares. O grupo é denominado por números e o tipo por letras maiúsculas, e a combinação destes identifica cada sorotipo diferente (LUND, 1970, HENRICHSEN, 1979).

O alto custo do antissoro, a subjetividade na interpretação e as dificuldades intrínsecas da técnica da sorotipagem convencional limitam o seu uso a poucos laboratórios altamente especializados (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007).

O desenvolvimento de sistemas de genotipagem baseados em reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) tem o potencial de superar algumas dificuldades associadas à sorologia convencional (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007).

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

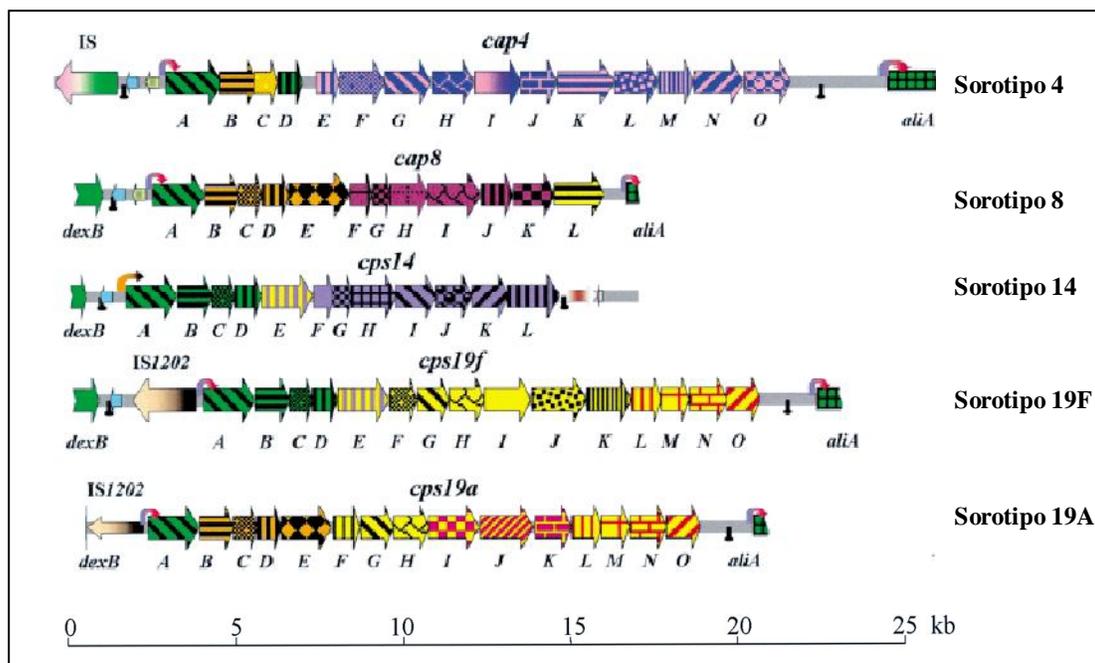


Figura 2. Organização genética da região do DNA do *S. pneumoniae* que contém o cluster dos genes capsulares de diferentes genótipos. As regiões que apresentam mais de 90% de nucleotídeos idênticos são representadas pelas mesmas cores e sombreado.

Adaptada de GARCÍA, et al, 2000.

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

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

Na América do Sul, os sorotipos mais prevalentes são o 14, 5, 1, 6A/B, 23F, 7F, 9V, 19F, 18C, 19A e 9N (CAMARGOS et al, 2006). No Brasil, a distribuição dos sorotipos mais prevalentes, segundo um estudo realizado de 1993-1999, são o 14, 6A/6B, 1, 18C, 5, 23F, 19F e 9V (DI FABIO et al, 2001). Segundo o SIREVA, os sorotipos que mais se relacionam com resistência à penicilina, no Brasil, estão representados na figura 3. Em Fortaleza, segundo Rey et al (2002), os sorogrupos mais comuns encontrados foram o 6, 19, 23 e 14.

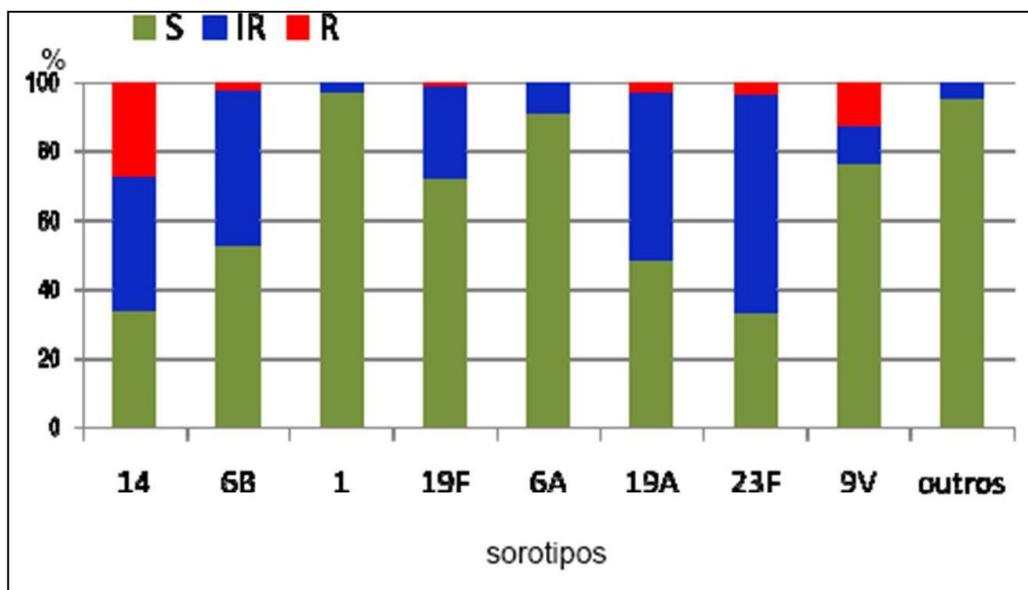


Figura 3. Sorotipos de *S. pneumoniae* associados à resistência à penicilina (CLSI, 2007), período de 2000-2006, em crianças < 6 anos. S: sensível; IR: resistência intermediária; R: resistente.

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

1.6. Vacinas Pneumocócicas

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

Duas vacinas pneumocócicas estão atualmente disponíveis: a mais antiga, a vacina polissacarídica 23-valente e a vacina polissacarídica conjugada 7-valente (ASLAN et al, 2007, VIEIRA et al, 2007)

A vacina 23-valente, preparada a partir de polissacarídeos purificados, contém os seguintes polissacarídeos capsulares 1, 2, 3, 4, 5,6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F. Apesar da vacina ter uma cobertura de 85-95% contra os polissacarídeos das cepas circulantes na população, ela não é recomendada para crianças menores de dois anos de idade. Crianças nessa faixa etária possuem um sistema imunológico imaturo, incapaz de responder com eficiência a essa vacina, pois ela provoca uma resposta imunológica na célula T-independente contra o polissacarídeo capsular do pneumococo (VELASCO et al., 1995; OBARO; ADEGBOLA, 2002)

Os linfócitos T, que não reconhecem antígenos não protéicos (como os polissacarídeos capsulares), só reconhecem peptídeos e só respondem aos mesmos quando são processados e apresentados via moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC). Dessa forma, os polissacarídeos são reconhecidos apenas pelos linfócitos B, que produzem anticorpos de baixa afinidade, principalmente imunoglobulina M, sem geração de linfócitos B de memória (BOGAERT et al, 2004; LIN et al 2006; ASLAN et al, 2007; VIEIRA et al, 2007; PLETZ et al, 2008). A vacina 23-valente é recomendada para idosos (maiores de 65 anos de idade) ou crianças com mais de 2 anos de idade com alto risco de desenvolver doença pneumocócica invasiva, ou seja, que apresentam doenças como insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, esplenectomias e imunodeficiências (BOGAERT et al, 2004; VIEIRA et al 2007; FLAMAING, 2008).

A vacina pneumocócica polissacarídica conjugada 7-valente, licenciada desde o ano 2000 em vários países, inclui os seguintes sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Essa vacina possui polissacarídeos capsulares conjugados a uma proteína carreadora do toxóide diftérico (CRM197), tornando-se, dessa maneira, altamente imunogênica, pois é capaz de provocar uma resposta imunológica do tipo célula T-dependente (PLETZ et al., 2008).

A proteína conjugada aos polissacarídeos capsulares é processada em peptídeos pelas APC. Os peptídeos são apresentados aos linfócitos T $CD4^+$ via MHC de classe II, na presença de moléculas co-estimulantes, o que resulta na proliferação e expansão de células T efetoras

(padrão de resposta Th2). Esses linfócitos T efetores ao entrar em contato com o peptídeo via MHC dos linfócitos B, também na presença de moléculas co-estimulantes, são ativados e passam a produzir citocinas (IL-4, IL5 e IL6) que são responsáveis por estimular os linfócitos B em se diferenciar em plasmócitos, produtores de imunoglobulina G, a gerar de células B de memória (PLETZ et al., 2008).

A vacina conjugada 7-valente tem sido amplamente recomendada para crianças menores de 5 anos saudáveis e para crianças de até 8 anos apresentando determinadas condições de alto risco de adquirir doença pneumocócica (por exemplo, anemia falciforme, imunodeficiência ou doenças crônicas cardíacas, renais, hepáticas ou pulmonares). Além de ser altamente imunogênica, esta vacina inclui a maioria dos sorotipos de pneumococos associados à resistência aos antimicrobianos (BRANDILEONE et al, 2006; FARREL et al, 2007; VIEIRA et al, 2007; FLAMAING, 2008; PLETZ et al, 2008). Em crianças menores de 5 anos de idade, a maior cobertura dos sorogrupos da vacina 7-valente foi relatada nos EUA, Canadá e Austrália (80-90%), seguida pela Europa e África (70-75%), América Latina (em torno de 65%) e Ásia (aproximadamente 50%) (BOGAERT et al, 2004; HAUSDORFF et al, 2005). O impacto potencial desta vacina sobre as cepas invasivas isoladas no Brasil é de aproximadamente 60% (BRANDILEONE et al., 2003). Embora essa vacina esteja licenciada no Brasil, ela, ainda, não foi introduzida no Programa Nacional de Imunização (PNI) (BRANDILEONE et al, 2006).

Existem ainda três formulações da vacina conjugada em desenvolvimento, a 9-valente, que inclui, além dos sorotipos presentes na 7-valente, são acrescentados os sorotipos 1 e 5, a 10-valente, acrescentada do sorotipo 7F em relação a 9-valente e a 13-valente, acrescentada dos sorotipos 3, 6A e 19A em relação a 10-valente. Segundo dados do SIREVA a cobertura estimada da vacina 7-valente é de 68%, no Brasil, estimando um aumento da cobertura para as outras formulações em desenvolvimento (Figura 04.).

A vacina 10-valente foi aprovada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O Brasil será o primeiro país a incluir a vacina 10-valente em sua política nacional de saúde pública em 2010 (CECOVISA ENSP/FIOCRUZ, 2009).

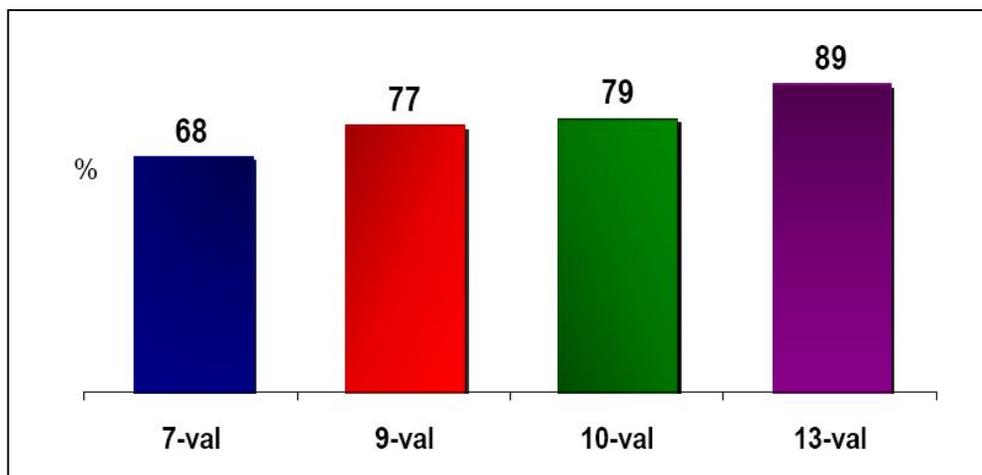


Figura 4. Impacto estimado da cobertura das vacinas conjugadas (%) 7, 9,10 e 13-valente frente aos sorotipos encontrados com mais frequência no Brasil, 2000-2006,< 6 anos. Adaptado de www.paho.org/spanish/ad/fch/im/17-Brandileone_SIREVA_Brasil.pdf

O presente estudo tem o objetivo de reunir dados epidemiológicos em Fortaleza sobre os sorotipos dos isolados de *S. pneumoniae*, tanto de pacientes com infecção sistêmica quanto de portadores saudáveis, correlacionando com a resistência a antibióticos. Estes dados servem tanto para comparação com um estudo realizado há dez anos em Fortaleza (REY et al, 2002), quanto para fornecer informações pré-vacinais, já que a vacina 10-valente vai entrar no calendário de vacinação nacional a partir de 2010.

1.7. Pergunta de Partida

- Qual a prevalência de *Streptococcus pneumoniae* em amostras isoladas de crianças saudáveis usuárias de creches, em Fortaleza, a frequência de *S. pneumoniae* isolados a partir de infecções sistêmicas, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos pneumococos e os sorotipos mais comuns?

1.8. Hipóteses

- A prevalência de *Streptococcus pneumoniae* em crianças portadoras é alta, pois há dez anos, em um estudo similar, Rey e colaboradores (2002), encontraram uma alta prevalência em relação a outros locais estudados, e nenhuma medida profilática foi tomada.
- A frequência de *S. pneumoniae* isolados de infecções sistêmicas é similar à encontrada em outros estudos realizados em laboratórios de vigilância pneumocócica.
- Os sorotipos mais comuns encontrados são semelhantes aos encontrados no restante do país.
- A taxa de resistência do pneumococo à penicilina e aos β -lactâmicos aumentou, haja vista, há uma tendência mundial ao aumento de resistência a esses antibióticos e não existe controle oficial para coibir o consumo abusivo desses fármacos pela população

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a prevalência de *S. pneumoniae* em crianças portadoras, a frequência de isolados de *S. pneumoniae* de indivíduos com infecção sistêmica, o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e os sorotipos mais comuns, em Fortaleza, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a taxa de portadores de *S. pneumoniae* em crianças usuárias de creche.
- Determinar a frequência de *S. pneumoniae* isolados de indivíduos com infecções sistêmicas.
- Verificar a resistência de *S. pneumoniae* de isolados de crianças portadoras frente à penicilina, ceftriaxona e levofloxacina.
- Verificar a resistência de *S. pneumoniae* de isolados de infecções sistêmicas frente à penicilina e ceftriaxona.
- Determinar os sorotipos mais comuns em isolados de infecções sistêmicas e em amostras de portadores.
- Comparar a resistência à penicilina e ceftriaxona dos isolados *S. pneumoniae* de portadores com um estudo similar realizado há 10 anos por Rey e colaboradores (2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta das Amostras

3.1.1. Amostras de Portadores Sadios

No período compreendido entre julho a outubro de 2008, amostras da nasofaringe foram coletadas de crianças saudáveis com idade entre 12 a 58 meses. Estas crianças foram recrutadas randomicamente de 12 creches municipais, onde duas unidades foram sorteadas de cada uma das seis regionais em que o município de Fortaleza está dividido administrativamente (figura 5.). Foi usado um questionário padrão com informações das crianças (Anexo I). Cada unidade foi visitada apenas uma vez e uma média de 18 crianças recrutadas por creche. Por ocasião de cada visita, as mães eram reunidas em uma sala para que pudessem ser esclarecidas sobre os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios da participação da criança na pesquisa. Após esta explanação era realizado o convite para a participação de seus filhos no estudo. As crianças eram admitidas somente após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelas mães ou responsáveis legais.

Critérios de inclusão: Crianças saudáveis, com idade entre 12 a 58 meses, usuárias de creche municipal de Fortaleza.

Critérios de exclusão: Foram excluídas do estudo as crianças com uso de antibiótico até 30 dias antes da coleta do material, crianças hospitalizadas por mais de 48 horas nos últimos 3 meses, crianças que apresentavam algum sintoma de gripe no dia da coleta (tosse, coriza ou febre).

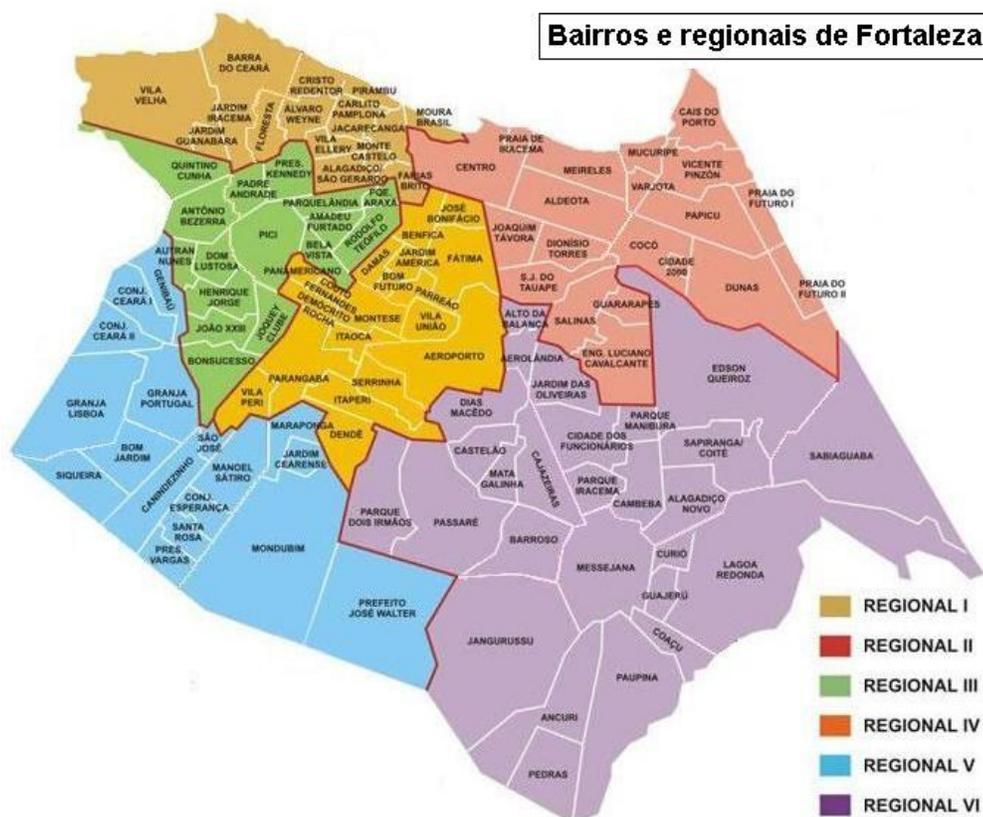


Figura 5. Mapa da cidade de Fortaleza, dividida em seis regionais.

Extraído de: www.solutio360.com/images/stories/fortaleza/Cidade/Bairros_e_regionais_de_Fortaleza.png

3.1.2. Amostras de Indivíduos com Infecção Sistêmica

Todos os isolados de *S. pneumoniae* de indivíduos com infecção sistêmica, foram coletados pelo LACEN-CE, que é o laboratório de referência do estado do Ceará responsável pelo recebimento de amostras provenientes do Hospital São José de Doenças Infecciosas e do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO). Os isolados foram coletados no período de janeiro de 2007 a julho de 2009. As amostras foram transportadas até laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal/ UFC, em caixa de isopor contendo gelo seco, em até no máximo quatro horas, e foram estocadas em freezer -80°C , para posterior processamento.

3.2. Coleta do Material de Nasofaringe

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

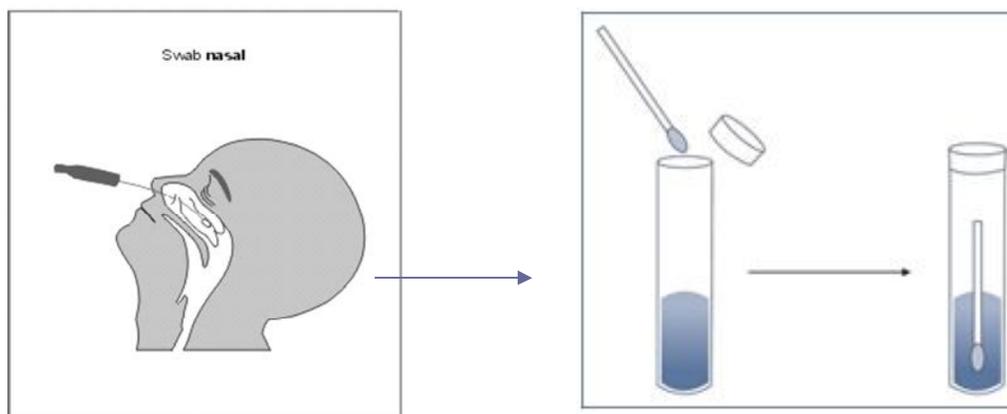


Figura 6. Coleta de material da nasofaringe, e conservação da amostra em meio de transporte Stuart.

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

3.3. Isolamento Bacteriano do Material de Nasofaringe

Os *swabs* de nasofaringe foram semeados em placas de petri contendo o meio *Brain Heart Infusion* (BHI) agar (OXOID) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro a 5% e gentamicina 5µg/ml(SIGMA) e em seguida os meios semeados foram incubados a 36 ± 1 °C em microaerofilia (jarra com vela) por 24 horas. Após o período de incubação foram selecionadas colônias isoladas que apresentassem as seguintes

características: colônias planas com uma zona cinza-esverdeada ao redor (alfa hemólise) (Figura 7). Estas colônias foram então reisoladas em outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, a fim de gerar uma maior massa celular bacteriana para posterior realização da coloração de Gram, dos testes com disco de optoquina (5µg) e teste rápido de aglutinação em látex Slidex®Pneumo-kit (Biomérieux, Paris, França). (BAYRAKTAR et al, 2005; FONSECA et al, 2005; STRATCHOUNSKI et al., 2006; LAUDERDALE et al, 2006; MATSUMOTO et al, 2007).

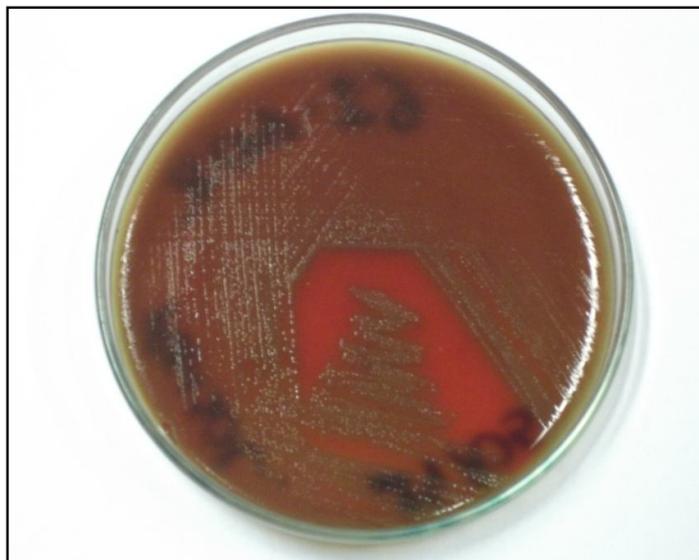


Figura 7. Crescimento em ágar sangue de colônias planas com alfa hemólise ao seu redor, características de *S. pneumoniae*.

3.4. Identificação de *S. pneumoniae*

A identificação do *S. pneumoniae* dos isolados de pacientes saudáveis usuários de creche, foi realizada através da análise da morfologia da colônia, presença de alfa hemólise, características microscópicas morfo-tintoriais através da coloração de Gram, teste da sensibilidade à optoquina (5µg) (OXOID) e teste de aglutinação rápida em partículas de látex. Colônias planas, que apresentaram em sua volta alfa-hemólise, que microscopicamente, coradas pela coloração de Gram, mostraram-se arranjadas como diplococos Gram-positivos em forma de lança, foram selecionadas para o teste da sensibilidade à optoquina (FACKLAM; WASHINGTON, 1991)

O teste de sensibilidade à optoquina foi realizado semeando uma cultura recente (24h) de *S. pneumoniae* em ágar Mueller-Hinton (DIFCO) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e com o auxílio de um *swab*. Em seguida um disco de optoquina (5µg) foi aplicado sobre o inóculo semeado e a placa incubada em microaerofilia e a 37°C por 24h. As cepas que apresentaram sensibilidade a optoquina (halo de inibição > 14 mm) (Figura 8) foram identificadas como *S. pneumoniae* (FACKLAM; WASHINGTON, 1991; CLSI, 2007).

O teste da optoquina foi confirmado com o teste sorológico, que foi realizado retirando uma alçada, com alça de platina, do crescimento bacteriano de 24 horas e realizando uma emulsão com o anti-soro em uma lâmina de vidro gerando uma reação de aglutinação. O teste foi considerado positivo quando as colônias bacterianas de *S. pneumoniae* ao entrar em contato com as partículas de látex do teste, que cobrem todos os sorotipos, as sensibilizavam e gerando uma reação de aglutinação (Figura 9). (BAYRAKTAR et al, 2005; FONSECA et al, 2005; STRATCHOUNSKI et al., 2006; LAUDERDALE et al, 2006; LAVAL et al, 2006).



Figura 8. Sensibilidade à optoquina



Figura 9. Teste de aglutinação em látex

Os isolados sistêmicos cedidos pelo LACEN-CE foram previamente identificados como *S. pneumoniae*, e por esse motivo foram, apenas, submetidas ao teste de sensibilidade à optoquina para confirmação da identificação.

3.5. Estocagem das Amostras

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

3.6. Teste de Sensibilidade

As drogas escolhidas para avaliação da sensibilidade das cepas de *S. pneumoniae* para isolados de portadores foram a penicilina (SIGMA), ceftriaxona (SIGMA) e levofloxacina (PROBAC), enquanto que para as isoladas de indivíduos com infecção sistêmica foram a penicilina e ceftriaxona.

3.6.1. Teste de Microdiluição em Caldo

Para as drogas penicilina e ceftriaxona (SIGMA), as CIMs foram determinadas pelo método da microdiluição em caldo. O inóculo foi composto de uma suspensão, em um tubo contendo 2 ml de BHI caldo ou solução salina 0,9 % estéril, com colônias recentes, com turbidez ajustada pelo padrão 0,5 de MacFarland (cerca de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml), onde foi retirado 100 μl e colocado em 900 μl de solução salina 0,9 % estéril. Os antibióticos tinham concentração inicial de 16 $\mu\text{g/ml}$ e foram diluídos até a concentração de 0,06 $\mu\text{g/ml}$. Foram utilizadas placas de acrílico para microdiluição de 96 poços, com fundo em U (BIOSYSTEMS), onde foram colocados 100 μl de caldo Mueller Hinton cátion ajustado (MERCK) com sangue desfibrinado de cavalo de 2% a 5%, 100 μl de antibiótico, com concentração inicial de 16 $\mu\text{g/ml}$ e 5 μl da suspensão bacteriana. O ponto de corte das CIM para penicilina, tanto para isolados de portadores quanto para isolados de infecção sistêmica, foram CIM $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$, sensíveis, CIM entre 0,12-1 $\mu\text{g/ml}$, resistência intermediária e CIM ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$, resistência plena. O ponto de corte das CIM para ceftriaxona, tanto para isolados de portadores quanto para isolados de infecção sistêmica (exceto meningite), foram de CIM ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, sensíveis, CIM igual a 2 $\mu\text{g/ml}$, resistência intermediária e CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$

resistência plena. Para isolados de LCR, os pontos de corte da ceftriaxona foram de CIM $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, sensível, CIM igual a 1 $\mu\text{g/ml}$, resistência intermediária e CIM ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ resistência plena. Os pontos de corte das CIMs foram determinados de acordo com os padrões do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2007). A cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada como referência da espécie no controle de qualidade. (FONSECA et al., 2005; STRATCHOUNSKI et al., 2006).

3.6.2. E-test

As CIMs para levofloxacin foi determinada, apenas para os isolados de *S. pneumoniae* provenientes de pacientes portadores usuários de creche. A determinação da CIM foi realizada pela técnica de inibição de crescimento em meio ágar sangue contendo uma fita com gradiente de concentração da droga. Esse teste é chamado de *epsilometer-test* (E-test). E-test é baseado numa combinação dos conceitos de testes de diluição e difusão. Como os métodos de CIM, o Etest quantifica diretamente a sensibilidade antimicrobiana. Mesmo sendo processado como teste de difusão em disco, o E-test difere do método disco convencional pelo uso de um gradiente pré-formado e estável de antimicrobiano. O E-test consiste numa fita plástica fina, inerte e não porosa de 5mm largura e 50mm de comprimento. Um lado da fita é marcado com uma escala de leitura de CIM em $\mu\text{g/ml}$. Um código de letras designa a identidade do antibiótico. Um gradiente exponencial pré-definido do antibiótico seco e estabilizado é mobilizado no outro lado da fita. O gradiente reflete uma faixa contínua de concentração, que varia de 0.016 a 256 mcg/ml ou 0.002 a 32 mcg/ml. Esta faixa corresponde a 15 diluições num método convencional de CIM. Quando uma fita de Etest é aplicada numa placa de agar inoculado (inoculo 0,5McFarland semeado com swab na placa em três direções), há uma liberação imediata do antibiótico da fita para o agar. Após incubação, quando o crescimento bacteriano se torna visível, uma elipse de inibição simétrica ao redor da fita é visualizada. O ponto de corte das CIMs para levofloxacin, foram de CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, sensível, CIM igual a 4 $\mu\text{g/ml}$, resistência intermediária e CIM ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ resistência plena. (CLSI, 2007).

3.7. Sorotipagem

3.7.1 Sorotipagem dos Isolados Sistêmicos

A sorotipagem dos isolados de *S. pneumoniae* provenientes de infecção sistêmica foi realizada pelo método de reação de Quellung (antígeno tipo específico, que quando positiva provoca o intumescimento da cápsula) (Figura 10), no Instituto Adolf Lutz, São Paulo.

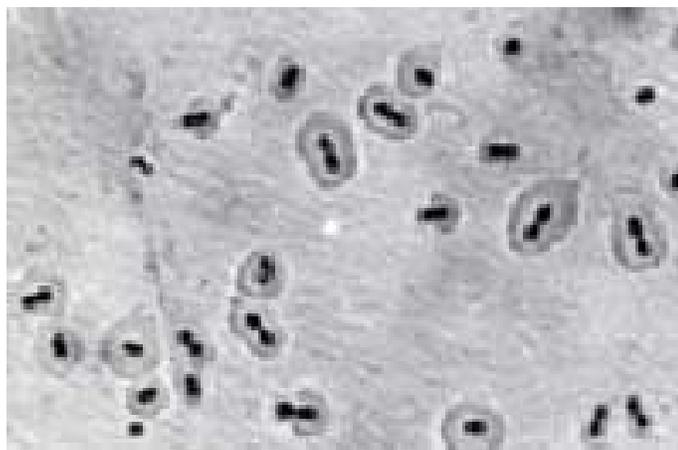


Figura 10. Reação de Quellung, antígeno tipo específico.

Extraído de <http://textbookofbacteriology.net/S.pneumoniae.html>>

3.7.2. Tipagem Molecular da Cápsula dos Isolados de Portadores

A tipagem molecular da cápsula foi realizada no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FioCruz-Salvador. Foram selecionadas 26 cepas de pneumococo que apresentaram resistência plena à penicilina ($CIM \leq 2\mu\text{g/ml}$), com o objetivo de verificar os sorotipos prevalentes associados à resistência.

3.7.2.1. Extração de DNA

Os pneumococos isolados foram retirados do estoque e semeados em placas contendo o meio de cultura ágar BHI suplementado de sangue desfibrina adicionado de 5 µg/ml de gentamicina e incubados durante 24 horas a 36°C, em jarra de vela, afim de gerar um ambiente com 5% de CO₂. As células bacterianas de cada isolado, crescidas na placa, foram suspensas em 300 µl de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%. A suspensão foi aquecida a 70 °C por 15 minutos e imediatamente centrifugadas em centrífuga refrigerada por 2 minutos, para baixar o pellet. Em seguida os sobrenadantes foram desprezados e os pellets ressuspendidos em 50 µl de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0), 10 µl de mutanolisina (solução a 3000 unidades/ml) e 8 µl de hialuronidase (30 mg/ml, Sigma H-3506; 300-750 unidades/mg). As amostras foram incubadas em banho-maria por 30 minutos ou até o dia seguinte e logo após foram inativadas a 100 °C por 10 minutos e centrifugadas em centrífuga refrigerada por 2 minutos. Os DNAs lisados, suspensos no sobrenadante, foram transferidos para criotubos e congelados a -20 °C para posterior utilização (PAI et al., 2006; DIAS et al, 2007).

3.7.2.2. Primers

Vinte e nove pares de *primers* foram usados para atingir os sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7F, 7C, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 31, 33, 34, 35B, 35F e 38.(Anexo II.) Um par de primer também foi incluído (*primers cpsA-f* e *cpsA-r*) (Anexo II) como controle interno que tem como alvo o locus *cpsA* presente em todos os pneumococos. Para concepção dos *primers*, todos os dados disponíveis relevantes das sequências do gene *cps* foram alinhados (MegAlign) e os *primers* foram selecionados através do programa *PrimerSelect* do DNASTAR versão 5. (PAI et al., 2006)

3.7.2.3. Esquema de Multiplex PCR

Os *primers* foram utilizados em seis reações de multiplex, e uma reação, para diferenciar os sorotipos 6A/B do 6C. Os *primers* foram agrupados com base na distribuição dos sorotipos dos pneumococos invasivos encontrados no Brasil. Em cada reação foram colocados cinco pares de *primers* que tinham como alvo regiões sorotipo-específicas de cinco diferentes sorotipos. Foi também incluído em cada reação o controle positivo interno (Anexo III) (PAI et al., 2006; DIAS et al, 2007).

Os *PCRs* foram realizados em solução contendo 25 µl, com cada mix da reação contendo: 1X tampão *PCR* (5 X *PCR* buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 M dithiothreitol, 0,5% Tween 20; Nonidet P-40; Promega Inc., Madison, Wis.), 200 µM de cada trifosfato de desoxinucleotídio (New England Biolabs, Beverly, MA), 3.5 mM de MgCl₂, 2.0 U de *Taq* DNA polimerase (Promega Inc.) e *primers* com concentrações especificadas (Anexo IV) (PAI et al., 2006). O extrato bruto (2,5 µl) de DNA de cada amostra foi usada para o *PCR*. Ciclos térmicos foram realizados em Perkin-Elmer GeneAmp *PCR* system 2700 (Applied Biosystems) sobre as seguintes condições: um ciclo a 94°C por 4 minutos seguido de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 45 segundos (desnaturação), 54°C por 45 segundos (anelamento) e 65°C por 2 minutos e 30 segundos (extensão) (PAI et al., 2006; DIAS et al, 2007).

Os produtos de *PCR* foram analisados em gel gel de agarose a 2% NuSieve (Cambrex Bio Science, Inc., Rockland, ME) em 1X tampão TAE (100ml) (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 100 V por 1 hora e 15 minutos. Os géis foram revelados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e as imagens foram fotografadas. Os tamanhos dos produtos de *PCR* foram comparados com marcador de peso molecular padrão (50-bp ladder; Novagen, Inc.) (PAI et al., 2006; DIAS et al, 2007).

3.8. Análise Estatística

3.8.1. Tamanho da Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando-se a fórmula para cálculo do intervalo de confiança de uma proporção populacional estimada por amostragem.

$$N = (Z_{\alpha/2})^2 \cdot P (1-P) / E^2$$

Onde:

N= total de indivíduos participantes

$Z_{\alpha/2}$ = corresponde ao intervalo de confiança $(1-\alpha)$ de uma distribuição bicaudal = 1,96 (intervalo de confiança de 95%)

E = margem de erro considerada aceitável, ou desvio padrão populacional (para mais ou para menos)

P = probabilidade esperada (taxa de ocorrência do fenômeno estudado)

O cálculo da amostra baseou-se na probabilidade de desfecho de duas variáveis principais do estudo: o estado de portador de pneumococos em nasofaringe e a resistência dos isolados à penicilina (o que exigisse maior número de participantes). Foi tomada como referência para a hipótese de nulidade H_0 a taxa de 70% das crianças portadoras de pneumococos, conforme estudo anterior (REY et al., 2002). Para a taxa de resistência dos pneumococos colonizantes à penicilina foi considerado o valor de 10%. Aceitando-se um erro alfa de 5% ($p \leq 0,05$) para rejeitar a hipótese de nulidade H_0 , e uma precisão de $E=10\%$ seriam necessários 161 participantes para mostrar uma diferença na taxa de portador entre os grupos de crianças usuárias de creche. Quando consideramos a taxa da resistência à penicilina (taxa estimada de 10%), erro alfa de 5% e precisão de 10%, seriam necessárias aproximadamente 70 crianças freqüentando creches municipais (DEAN et al, 1995).

3.8.2. Randomização dos Participantes

As crianças recrutadas no estudo foram selecionadas após levantamento das creches municipais do município de Fortaleza, nos 6 distritos administrativos (Regionais). Foram sorteadas as creches dentro de cada Regional em função de sua população (peso 1 ou 2 segundo a Regional). Dentro das creches sorteadas, as crianças foram selecionadas de forma aleatória entre aquelas que se encontravam presentes no momento da visita do pesquisador.

As informações obtidas foram digitadas em um computador IBM-PC compatível pelo processo de dupla entrada e posteriormente resolvidas as discrepâncias e inconsistência dos dados. A entrada do sistema foi realizada por meio de senha individualizada.

As taxas de crianças portadoras sadias de pneumococo em nasofaringe foram comparadas por unidade de creche e globalmente com os dados obtidos anteriormente por Rey e colaboradores (2002).

As Concentrações Inibitórias Mínimas dos diversos antibióticos foram dicotomizadas em sensíveis, intermediárias e resistentes conforme critérios estabelecidos pelo CLSI (2007).

Os principais testes estatísticos utilizados nas Tabelas 2x2 foram os testes de qui-quadrado e o exato de Fisher quando pertinente. Na comparação entre médias foi utilizado o teste t de Student. Análises uni e multivariadas foram utilizadas para corrigir eventuais desvios causados por fatores de confundimento entre as variáveis. Em todos os casos foram consideradas significantes as diferenças com erro de primeira ordem inferior a 5% ($p < 0,05$).

3.9. Aspectos Éticos

3.9.1. Revisão do Comitê de Ética e Consentimento Informado e Esclarecido

O protocolo, Termo de Consentimento Informado (Anexo V) e qualquer modificação subsequente foram revistos e aprovados pela Comissão de Ética do Hospital São José de Doenças Infecciosas (CEP/HSJ), responsável pela revisão da pesquisa. O consentimento escrito para participação da criança no estudo foi obtido dos pais da criança ou seu guardião legal. 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.

3.9.2. Confidencialidade dos Dados e Direito à Privacidade dos Participantes

Todos os registros pessoais, clínicos e laboratoriais sobre pacientes e a origem das amostras foram guardados em lugar protegido. As entradas de computador ou em rede de computadores foram feitas apenas por identificação numérica. Informações clínicas não foram liberadas sem permissão por escrito do participante, exceto quando necessário para encaminhamento.

A pesquisa foi registrada no Sisnet sob o número FR 147711 (Anexo VI). Foi solicitado à chefia do Hospital São José de Doenças Infecciosas, à Secretaria de Educação de Fortaleza e Secretaria da Saúde de Fortaleza autorização para utilização das unidades durante a realização da pesquisa.

As amostras de pneumococos isoladas foram processadas e estocadas para posterior processamento conforme rotina do Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará. O encaminhamento das amostras ao Laboratório Nacional de Referência do Instituto Adolfo Lutz se realizou conforme as normas de segurança vigentes no país para transporte de materiais biológicos potencialmente contaminantes através do Laboratório Central do Ceará (LACEN-CE).

4. RESULTADOS

4.1. Portadores

4.1.1. Prevalência

Entre Agosto e Outubro de 2008, foram recrutadas 215 crianças saudáveis usuárias de creches municipais de Fortaleza, com idade entre 12 e 58 meses. As unidades foram sorteadas dentro das seis regionais em que é dividido o município. Das 215 crianças, 18 (8%) eram menores de 2 anos de idade, uma vez que as creches só admitem sob sua responsabilidade crianças que já conseguem andar.

Foram isolados *S. pneumoniae* em 152 crianças, perfazendo uma taxa de portadores sadios de 71%. Oitenta (53%) desses portadores eram do sexo masculino. Do total de portadores, 14 (9%) eram menores de dois anos (Tabela 1.).

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

Variáveis	N (%)	Portadores (%)
Gênero		
Masculino	121 (56)	80 (66)
Feminino	94 (44)	72 (77)
Total	215 (100)	152 (71)
Idade		
12-23 meses	18 (8)	14 (78)
24-58 meses	197 (92)	138 (70)
Total	215 (100)	152 (71)

4.1.2. Sensibilidade aos Antimicrobianos

Dos 152 isolados de nasofaringe, foram realizadas as CIMs de 137, pois 15 amostras foram perdidas, por contaminação, durante o processo de reativação das cepas. Foram realizadas as CIMs para os antimicrobianos: penicilina, ceftriaxona e levofloxacina.

Dos 137 isolados, 97 (71%) foram resistentes à penicilina, sendo que 71 (52%) apresentaram resistência intermediária e 26 (19%) resistência plena. Para ceftriaxona, 29 (21%) isolados foram resistentes, sendo que 12 (9%) apresentaram resistência intermediária e 17 (12%) resistência plena. Todos os isolados que apresentaram resistência à ceftriaxona (intermediária ou plena), tinham sensibilidade reduzida para penicilina. Nenhum isolado apresentou resistência à levofloxacina. A figura 11. mostra as taxas de sensibilidade e resistência dos isolados de *S. pneumoniae*, baseado nas CIMs, frente aos antibióticos: penicilina, ceftriaxona e levofloxacina.

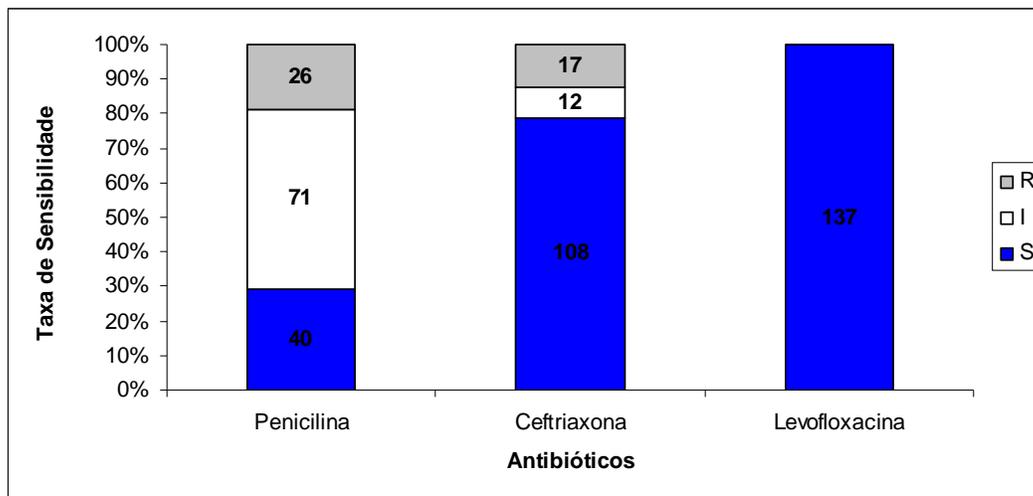


Figura 11. Taxa de sensibilidade e resistência dos isolados de *S. pneumoniae*, baseado nas CIM, frente aos antibióticos: penicilina, ceftriaxona e levofloxacina. R= resistência plena; I= resistência intermediária; S= sensível.

4.1.3. Sorotipos

A sorotipagem dos isolados de crianças saudáveis usuárias de creche foi feita através da técnica de multiplex *PCR*. Todos os 26 isolados selecionados foram positivos para o gene *cpsA* (Figura 12), comprovando que eram realmente *S. pneumoniae*. Apenas seis isolados (23%) tiveram a genotipagem capsular identificada por esse método. Dos genótipos capsulares, o mais comum foi 19F, presente em três isolados, seguido do 19A (dois isolados), e 14 (um isolado).

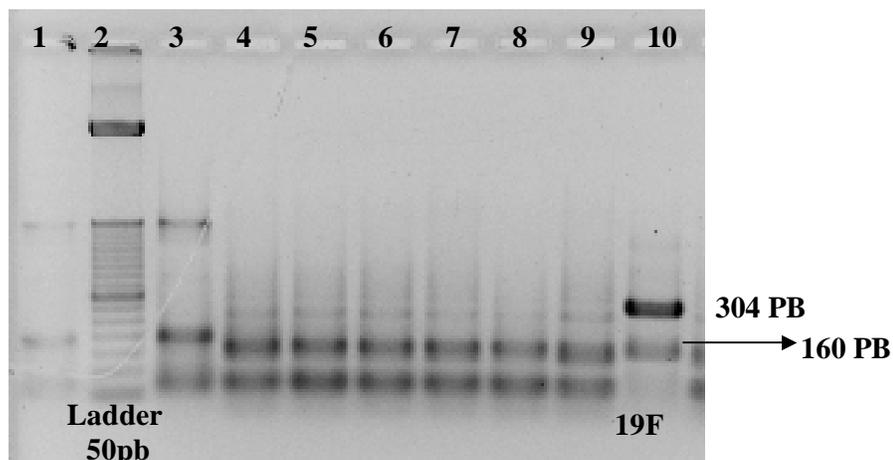


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do produto da genotipagem por multiplex *PCR* dos isolados de *S. pneumoniae* de nasofaringe de crianças saudáveis usuárias de creches. Linha 1, controle negativo; linha 2, marcador de peso molecular de 50 pb; linha 3-9, amostras positivas para o gene *cpsA* (160 pb); e linha 10 amostra positiva para o sorotipo 19F (304 pb), além do gene *cpsA*

4.2. Amostras de Infecção Sistêmica

4.2.1. Número de Amostras

Foram cedidas pelo LACEN 52 isolados de *S. pneumoniae* provenientes de infecção sistêmica. Levando em consideração que a estimativa da população de Fortaleza para 1º de Julho de 2009, segundo o IBGE (IBGE, 2009), foi de 2.505.552, a frequência de isolados invasivos neste estudo, por ano, foi de, aproximadamente, 1 caso/100.000 hab. A média de idade dos pacientes foi de 29 anos, com a maioria dos pacientes (14) dentro da faixa etária de

20 a 30 anos e apenas cinco deles com menos de dois anos. Dessas amostras, a maioria das cepas foi isolada de LCR, perfazendo 36 isolados (69%), seguido de sangue com 11 isolados (21%), as outras 5 (10%) amostras sendo de materiais diversos. A distribuição dos sítios de isolamentos de *S. pneumoniae* é mostrada na figura 13.

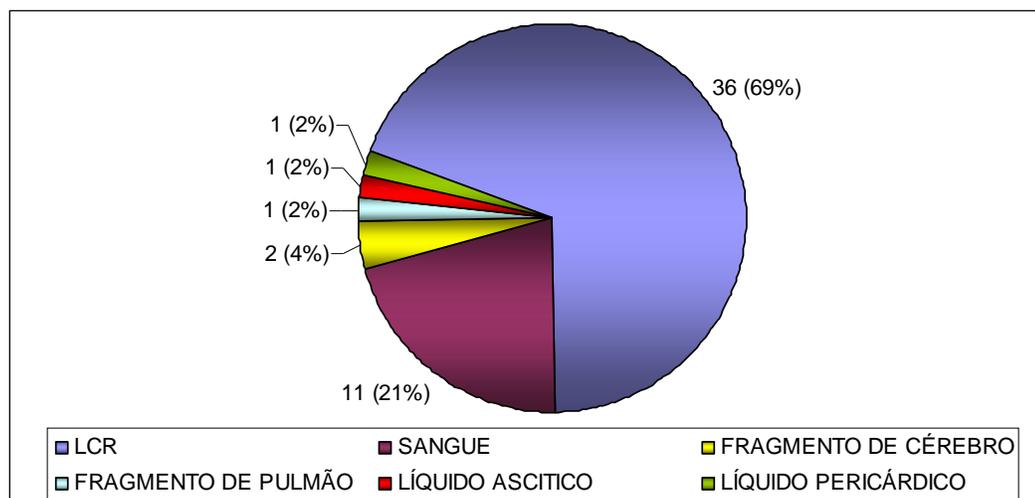


Figura 13. Distribuição dos sítios de isolamentos de *S. pneumoniae* provenientes de amostras sistêmicas.

4.2.2. Resistência aos Antimicrobianos

Foram realizados CIMs para os antimicrobianos: penicilina e ceftriaxona. Dos 52 isolados, 22 (42%) apresentaram resistência à penicilina, sendo que 20 (38%) apresentaram resistência intermediária e dois (4%), apresentaram resistência plena, para penicilina. Para ceftriaxona, 7 (13,5%) isolados apresentaram resistência, sendo que 4 (7,5%) apresentaram resistência intermediária e 3 (6%) apresentaram resistência plena. A figura 14. mostra as taxas de sensibilidade e resistência dos isolados sistêmicos para penicilina e ceftriaxona.

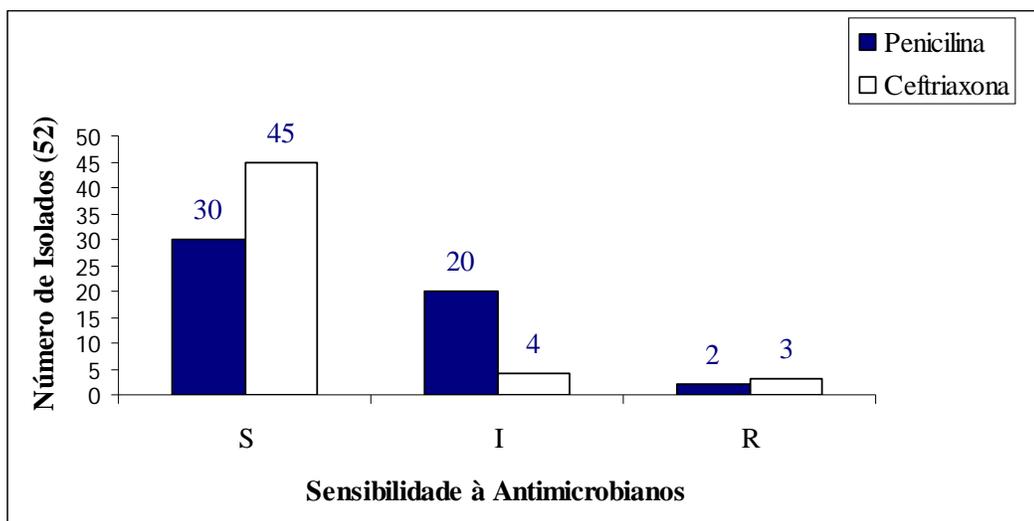


Figura 14. Número de isolados de *S. pneumoniae* sistêmicos frente aos antimicrobianos: penicilina e ceftriaxona. S= sensível; I= resistência intermediária; R= resistência plena.

4.2.3. Sorotipos

Os isolados sistêmicos foram sorotipados pela reação de Quellung. Das 52 amostras sistêmicas, apenas cinco (9%) foram não reagentes. Foram encontrados 22 sorotipos diferentes. Os sorotipos mais comuns foram o 19F, presente em seis (12%) isolados, seguido dos sorotipos 14 (8%), 3 (8%) e 6A (8%), cada um presente em quatro isolados, e dos sorotipos 4 (6%), 18C (6%) e 9V (6%) (figura 15.), cada um presente em 3 isolados. Os sorotipos relacionados com resistência à penicilina foram, respectivamente, os 19F, 14, 19A, 6B, 6A, 20, 19V, 23B e 23F (figura 15.). Os sorotipos relacionados com resistência à ceftriaxona foram os 19F, com 2 isolados, e 14, 9V, 19A, 20, 23B, todos com um isolado.

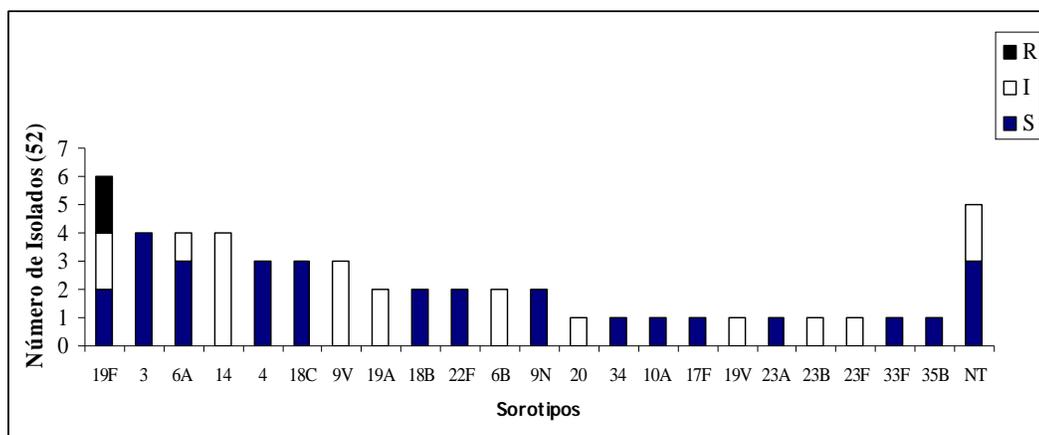


Figura 15. Distribuição dos sorotipos dos isolados *S. pneumoniae* de indivíduos com infecção sistêmica de X Sensibilidade à penicilina. R= resistência plena; I= resistência intermediária; S= sensível.

A vacina conjugada 10-valente (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5 e 7F), que vai ser introduzida na política nacional de saúde pública do Brasil em 2010, de acordo com os sorotipos encontrados nesse estudo, tem a mesma cobertura da vacina conjugada 7-valente (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), que é de 42,3% sobre o total dos sorotipos encontrados. O impacto da vacina 10- valente sobre os isolados relacionados com a resistência foi de 63,6%. A figura 16 mostra a cobertura das vacinas conjugadas 10 e 13-valente (10-valente mais os sorotipos 3, 6A e 19A) sobre todos os sorotipos encontrados em nosso estudo e sobre os sorotipos relacionados com a resistência.

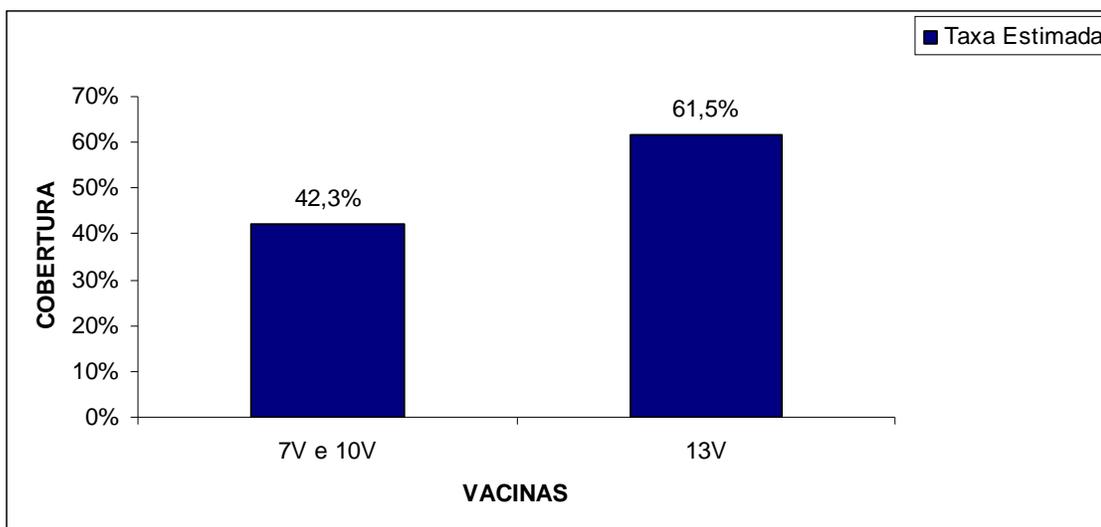


Figura 16. Impacto estimado da cobertura das vacinas conjugadas (%) 7, 10 e 13-valente.

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido publicados mundialmente sobre as doenças pneumocócicas e os seus fatores de risco. Isto se deve a alta morbidade e mortalidade causada pela doença pneumocócica, ao aumento do número de cepas de *S. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos e a introdução de vacinas pneumocócicas nos programas de imunização de alguns países.

Os esforços mundiais para controlar as doenças pneumocócicas têm se concentrado na pesquisa de novas vacinas que contemplam os sorotipos prevalentes em determinada região. A decisão de introduzir as vacinas pneumocócicas atuais ou em desenvolvimento em um país depende, portanto, de informações sobre a taxa de portadores de *S. pneumoniae*, a incidência das doenças pneumocócicas, das características fenotípicas da bactéria, tais como os sorotipos prevalentes e a resistência antimicrobiana, além do conhecimento da imunogenicidade da vacina (MANTESE et al, 2003; NASCIMENTO-CARVALHO et al, 2003; LAVAL et al, 2006).

Como todas as doenças pneumocócicas começam com o estabelecimento da colonização, isto é, com o estado de portador (KADIOGLU et al, 2008), existem vários estudos analisando os fatores de riscos da colonização e as taxas de colonização de *S. pneumoniae* no mundo. (BOGAERT et al, 2004; MALFROOT et al, 2004; LAVAL et al, 2006; CHEN et al, 2007; ARTAN et al, 2008). Muitos trabalhos correlacionam a taxa de portadores com a resistência à antibióticos enquanto outros relacionam, além da resistência a antibióticos, também os sorotipos mais comuns. (DI FABIO et al., 2001; REY et al, 2002; MALFROOT et al, 2004; BAYRAKTAR et al, 2005; CARDOZO et al, 2006; MATSUMOTO et al, 2007, ARTAN et al, 2008).

O primeiro relato brasileiro de resistência à penicilina foi descrito por de Sousa et al., em 1988, com amostras de São Paulo. Desde então a resistência do pneumococo aos antimicrobianos, pela grande morbimortalidade das suas infecções, vem sendo cada vez mais estudada.

Apesar do aumento da resistência dos pneumococos à penicilina nos últimos anos, ela ainda é a droga de escolha para o tratamento da infecção pneumocócica, pois a resistência intermediária à penicilina não oferece dificuldade para o tratamento de infecções respiratórias ou sistêmicas pelo pneumococo, visto que as doses usuais ou ligeiramente aumentadas de penicilinas e cefalosporinas são adequadas para promover níveis terapêuticos. No entanto, a resistência intermediária pode influenciar na ação terapêutica das penicilinas nas meningites pneumocócicas, pois a concentração destas drogas não atinge o pneumococo que apresenta

resistência intermediária quando está situado nas meninges. Nesta circunstância, as cefalosporinas da terceira geração mostram-se adequadas para o tratamento (TAVARES, 2000).

Nas regiões onde a frequência do pneumococo resistente (seja com resistência intermediária ou elevada) à penicilina ultrapassar 10% recomenda-se, atualmente, nas infecções respiratórias o uso de fluoroquinolonas ou doses usuais de penicilinas ou cefalosporinas orais da segunda e terceira gerações (TAVARES, 2000).

No Japão, Masuda e colaboradores (2002) realizaram um trabalho com 156 crianças usuárias de duas creches, em 1999, com idade variando entre um mês e cinco anos, e encontraram uma taxa de colonização de 60,3%. A taxa de resistência à penicilina descrita foi de 60,6%, com todos isolados apresentando resistência intermediária.

Em Hong Kong, na China, Chiu e colaboradores (2001) realizaram um estudo com 1.978 crianças usuárias de creches e jardins de infância, entre 1999-2000, com idade variando de dois a seis anos, e obtiveram uma taxa de colonização de 19,4%. A taxa de resistência à penicilina encontrada foi de 58,2%, sendo 29,5% dos isolados com resistência intermediária e 26,1% com resistência plena.

Lo e colaboradores (2003), no Norte de Taiwan, encontraram uma taxa de portadores de 19,9% em uma pesquisa realizada com 478 crianças, com faixa etária entre um mês e 14 anos de idade. A taxa de resistência à penicilina foi de 89,5% (49,5% dos isolados apresentaram resistência intermediária e 40% resistência plena), enquanto que a resistência à cefotaxima foi de 8,4% (7,4% dos isolados apresentaram resistência intermediária e 1% resistência plena). Os sorotipos mais encontrados foram, do mais frequente para o menos frequente, 23F, 6B, 19F e 14.

Em um estudo realizado por Bayraktar e colaboradores (2005) na Malatya, Turquia, encontraram uma taxa de colonização de 19,1%, em 848 crianças de três escolas primárias, com idade variando de sete a treze anos, com uma frequência maior de portadores nas crianças com sete anos de idade. Apenas 10,5% dos isolados apresentaram resistência intermediária à penicilina e não houve resistência à levofloxacina. Os sorogrupos mais comuns encontrados foram os 9, 19, 23, 10, 6 e 18, respectivamente. Em outro trabalho realizado por Aslan e colaboradores (2007), na Turquia, na cidade de Mersin, também em crianças de escolas primárias, com idade variando de seis a treze anos e observaram uma taxa de portadores de 13,9%. A taxa de resistência à penicilina foi de 12,9%, com apenas 1% de resistência plena e 11,9% de resistência intermediária e os sorogrupos mais comuns foram os 6, 19, 23, 1, 20 e 17, respectivamente.

Na África, dois trabalhos publicados em 2001, com crianças saudáveis, um por Adegbola e colaboradores, na Gâmbia, e outro por Joloba e colaboradores, em Uganda, mostraram taxas de portadores respectivamente de 87% e 62%. No estudo realizado em Uganda, foi observada uma taxa de resistência à penicilina, apenas intermediária, de 83,5%.

Em um estudo realizado por Roche e colaboradores (2007), em Londres, com crianças usuárias de creches, com a faixa etária variando de seis meses a cinco anos, foi observada uma taxa de portadores de 51%, com uma frequência maior de portadores nas crianças com faixa de idade entre 1-2 anos. Nenhum dos isolados foram resistente à penicilina e os sorotipos 6A, 19F e 23F, em ordem decrescente, foram os mais comuns.

Nunes e colaboradores (2005), em Portugal, obtiveram a partir de crianças usuárias de creches de Lisboa, com faixa etária entre seis meses e seis anos de idade, uma taxa de portadores de 63%. A resistência à penicilina foi de 22% dos isolados, destes 20% apresentaram resistência intermediária e 2% resistência plena, enquanto que a resistência à ceftriaxona foi de 2%. Os sorotipos mais frequentes, respectivamente, foram 6B, 14, 19F, 23F.

Na Rússia, Strachounski e colaboradores (2006), relataram uma taxa de colonização em crianças usuárias de creches, menores que cinco anos, de 45,8% na Rússia europeia e 53,8% na Rússia asiática. As taxa de resistência à penicilina na Rússia europeia e Rússia asiática foi, respectivamente, de 9,6% (9% de resistência intermediária e 0,6% de resistência plena) e 13,9% (13,7% de resistência intermediária e 0,2% de resistência plena), enquanto que a resistência, apenas intermediária, à cefotaxima foi de 0,3% e 0,1%. Não houve nenhum isolado resistente à levofloxacina.

Monteros e colaboradores (2007) realizaram um estudo no México, com 2777 crianças usuárias de creche, com idade variando entre dois meses a seis anos, e encontraram uma taxa de colonização de 29,9%. A taxa de resistência à penicilina foi de 63,3%, com 49,4% dos isolados apresentando resistência intermediária e 14,3% apresentando resistência plena. Os sorotipos mais comuns foram, em ordem decrescente, os 19F, 6B, 23F, 6A e 19A.

Na América do Sul, Rivera-Olivero e colaboradores (2007), na Venezuela, obtiveram uma taxa de colonização de 45%, em um estudo realizado com 356 crianças indígenas, com idade de até 72 meses. A taxa de resistência à penicilina foi de 13%, em que 11% dos isolados demonstraram resistência intermediária e 2% resistência plena, e não houve resistência à levofloxacina. Os sorotipos mais comuns foram os 23F, 6A, 15B e 6B, respectivamente. Hamer e colaboradores (2002), em um estudo realizado em Quito, Equador, com crianças saudáveis, com faixa etária variando de dois a sessenta meses, observaram uma taxa de portadores de 66%.

No Brasil, em um trabalho realizado por Rossi e colaboradores (2001), com crianças usuárias de creches menores de cinco anos de idade, de diferentes regiões, as taxas de portadores foram de: 18,5%, região Norte, 16,7%, região Nordeste, 10%, região Sudeste e 18,4% na região Sul. Nesse estudo foi encontrada apenas resistência intermediária à penicilina: na região Norte foi de 1,4%, na região Nordeste de 9,8%, na região Sudeste foi de 13,8% e na região sul de 8%. Não houve resistência à cefotaxima.

No estado de São Paulo, na cidade de Taubaté, Lucarevschi e colaboradores (2003) encontraram uma taxa de portadores de 21,1%, em pesquisa realizada com 987 crianças usuárias de creche, com idade variando de 8-71 meses. Os sorotipos mais comuns foram: 19F (14.8%), 6A (11.1%), 6B (10.4%), 18C (7.4%), 23F (7.4%), 9V (6.7%), 14 (5.2%).

Velasquez e colaboradores (2009) realizaram um estudo com 212 crianças usuárias de creches, com faixa etária de três meses a seis anos, no município de Umuarama, Paraná, e encontraram uma taxa de portadores de 43,4%. A taxa de resistência à penicilina observada foi de 57,6%, com 34,8% dos isolados apresentando resistência intermediária e 22,8% resistência plena. Não foi observada resistência à levofloxacina. Em um trabalho recente, Franco e colaboradores (2010), encontraram uma taxa de portadores de 57,6%, em crianças usuárias de 62 creches, em todo o Brasil, com uma taxa de resistência à penicilina de 25,9%.

Rey e colaboradores (2002) realizaram um trabalho em Fortaleza, em 1998, com 213 crianças usuárias de creches e encontraram uma taxa de portadores de 72%, com taxa de resistência à penicilina de 55%, com 49% dos isolados demonstrando resistência intermediária e 6% resistência plena, enquanto que a resistência à ceftriaxona foi de 4%, com 3% dos isolados demonstrando resistência intermediária e 1% resistência plena. Os sorogrupos mais comuns encontrados, respectivamente, são os 6, 19, 23 e 14.

Analisando os trabalhos citados, é possível observar uma grande variação na taxa de portadores sadios em todo o mundo. É possível afirmar, também, que o presente estudo, realizado com crianças portadoras usuárias de creches, está entre as mais altas do mundo relatadas até o momento, com apenas um estudo, realizado na Gâmbia, mostrando uma taxa de colonização maior (ADEGBOLA et al, 2001). O presente estudo, como foi realizado com crianças portadoras usuárias de creches, em Fortaleza, nos permitem comparar nossos dados com os dados encontrados por Rey e colaboradores (2002) em 1998. A taxa de portadores praticamente não se alterou, mostrando que ainda é alta em crianças usuárias de creches. Esses dados são corroborados com alguns trabalhos que pontuam as creches, devido ao confinamento de várias crianças em um determinado local, como fator de risco para adquirir a condição de portador de *S. pneumoniae* (REY et al, 2002; BOGAERT et al, 2004; NUNES et

al, 2005; BRICKS; BEREZIN, 2006; CHEN et al, 2007; KATSAROLIS et al, 2009; VELASQUEZ et al, 2009).

Nosso trabalho não encontrou nenhuma relação entre o sexo e estado de portador, visto que o número de crianças portadoras do sexo masculino foi semelhante ao número de portadoras do sexo feminino, resultado também encontrado por outros autores (REY et al, 2002; LUCAREVSCHI, 2003; BOGAERT et al, 2004; OZDEMIR et al, 2008; ARTAN et al, 2008; VELASQUEZ et al, 2009).

Também foi observado no nosso estudo que a taxa de portadores tende a ser maior em crianças menores de dois anos, corroborando com alguns autores, que inclusive consideram que a taxa de portador é inversamente proporcional à faixa etária (CHIU et al, 2001; HAMER et al, 2002; CHEN et al, 2007; MONTEROS et al, 2007; ROCHE et al, 2007). Nossos resultados são discordantes de outros autores que relataram em seus estudos que a faixa etária que apresenta maior taxa de colonização está entre dois e cinco anos de idade (LO et al, 2003; VELASQUEZ et al, 2009).

Com base nos trabalhos acima citados, é possível observar que as taxas de resistência aos antimicrobianos variam de acordo com as características da população estudada, dentre elas, a região geográfica, o material clínico e o padrão local de uso dos antimicrobianos (SCOTT et al., 1998).

Como ocorre na taxa de colonização, há uma grande variação em todo o mundo nas taxas de resistência a antibióticos em trabalhos realizados com crianças portadoras, pois há trabalhos em que não foi relatada resistência à penicilina (ROCHE et al, 2007), o que é raro, trabalhos que apresentaram apenas resistência intermediária à penicilina (ROSSI et al, 2001; JOLOBA et al, 2001; MASUDA et al, 2002; BAYRAKTAR et al, 2005) e ainda há trabalhos que relatam, além da resistência intermediária, a resistência plena (CHIU et al, 2001; REY et al, 2002; NUNES et al, 2005; RIVERA-OLIVERO et al, 2007; VELASQUEZ et al, 2009).

Em nosso estudo, em crianças portadoras usuárias de cheches, foi possível observar uma taxa de resistência à penicilina (71%) muito elevada, ficando atrás apenas de dois trabalhos realizados, um em Uganda (JOLOBA et al, 2001) que demonstrou uma taxa de resistência de 83,5%, porém todos os isolados apresentaram somente resistência intermediária, e outro no Norte de Taiwan (LO et al, 2003), que relatou uma taxa de resistência de 89,5%. Outros autores apresentaram uma taxa de resistência à penicilina alta, que variou de 55% a 63,3% (CHIU et al, 2001; MASUDA et al, 2002; REY et al, 2002; MONTEROS et al, 2007; VELASQUEZ et al, 2009), mas não tão alta quanto a observada por nós, e alguns autores relatam uma taxa de resistência à penicilina menor ou igual a 22%

(ROSSI et al, 2001; BAYRAKTAR et al, 2005; NUNES et al, 2005; STRATCHOUNSKI et al, 2006; ASLAN et al, 2007; RIVERA-OLIVERO et al, 2007)

Nossa taxa de resistência intermediária (52%) é equiparada à relatada por outros autores (REY et al, 2002; LO et al, 2003; MONTEROS et al, 2007), já a taxa de resistência plena à penicilina (19%) é considerada bastante alta, uma vez que apenas dois estudos relataram uma taxa maior, um de 40% no Norte de Taiwan (LO et al, 2003) e outro de 26,1% em Hong Kong, na China (CHIU et al, 2001).

Se comparado ao estudo de Rey e colaboradores (2002), realizado em Fortaleza, a resistência plena à penicilina aumentou três vezes mais, o que demonstra uma tendência a aumentar a resistência à penicilina, uma vez que não há controle no uso dos antibióticos, principalmente em crianças, um fator de risco para o aumento da resistência já relatado por outros autores (BRANDILEONE et al, 2006; KATSAROLIS et al, 2009; VELASQUEZ et al, 2009).

A taxa de resistência à ceftriaxona, em crianças portadoras usuárias de creches, observada no presente estudo, que é de 21% (9% dos isolados com resistência intermediária e 12% com resistência plena), não foi encontrado em nenhum outro trabalho, que houvesse sido testado a ceftriaxona ou outra cefalosporina de 3ª geração (ROSSI et al, 2001; REY et al, 2002; LO et al, 2003; NUNES et al, 2005; KATSAROLIS et al, 2009), realizado com crianças portadoras, em nossa revisão de literatura. Na comparação com o trabalho realizado por Rey e colaboradores (2002) em Fortaleza, houve um aumento bastante significativo no número de isolados com resistência à ceftriaxona, tanto na resistência intermediária, quanto na plena, 3 e 12 vezes mais. Isso se deve ao fato de que a resistência à penicilina está associada com uma sensibilidade diminuída a outros β -lactâmicos, inclusive à ceftriaxona (TAVARES, 2000; PALLARES et al, 2003). Esse fato também foi observado em nosso estudo, pois todos os isolados resistentes à ceftriaxona, eram resistente à penicilina.

Não foi observada resistência à levofloxacina neste trabalho, estando de acordo com outros autores presentes na literatura (BAYRAKTAR et al, 2005; STRATCHOUNSKI et al, 2006; RIVERA-OLIVERO et al, 2007; VELASQUEZ et al, 2009). Porém, alguns autores relataram em seus trabalhos resistência às fluoroquinolonas, inclusive a levofloxacina. (PALLARES et al, 2003; PLETZ et al, 2004).

Apesar de existir mais de 90 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae* (HAUSDORFF et al, 2005), 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 maioria dos trabalhos utiliza para determinar os sorotipos mais comuns a sorotipagem convencional (Reação de Quellung), baseada na capacidade de o soro hiperimune específico reagir com a cápsula da bactéria em suspensão (LUCAREVSCHI et al, 2003; LO et al, 2003; BAYRAKTAR et al, 2005; NUNES et al, 2005; ASLAN et al, 2007; CHEN et al, 2007; ROCHE et al, 2007; VELASQUEZ et al, 2009). Porém, o alto custo do antissoro, a subjetividade na interpretação e as dificuldades intrínsecas da técnica da sorotipagem convencional limitam o seu uso a poucos laboratórios altamente especializados (PAI et al, 2006).

O desenvolvimento de sistemas de genotipagem baseados em *PCR* tem o potencial de superar algumas dificuldades associadas à sorologia convencional, pois além de ser uma abordagem simples, apresenta um melhor custo-benefício (PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007). Por ser uma técnica nova, ainda existem poucos trabalhos publicados que se utilizam dela para determinar os sorotipos capsulares (MORENO et al, 2005; PAI et al, 2006; DIAS et al, 2007; MORAIS et al, 2007; ANTONIO et al, 2009).

Em nosso trabalho, para isolados de portadores que apresentaram resistência plena, foi realizada a genotipagem, através da técnica de multiplex *PCR*, para identificar os sorotipos capsulares, sem que houvesse sido feita antes a sorotipagem convencional. Uma tentativa que ainda não foi mencionada por nenhum outro autor, uma vez que os autores acima citados usaram a técnica como comparativo com a reação de Quellung, a fim de padronizarem a técnica.

Apesar de obter sucesso na identificação de sorotipos capsulares de apenas seis isolados, dos 26 selecionados, os sorotipos encontrados (19F, 19A e 14) estão entre os mais frequentes relatados por alguns autores, no Brasil e na América Latina (DI FABIO et al, 2001; REY et al, 2002; CAMARGOS et al, 2006).

Como todos os isolados amplificaram o gene *cps A*, que é o gene que confirma a identificação, provavelmente nosso insucesso na identificação dos sorotipos capsulares dos isolados que apresentaram resistência plena tenha sido pelo simples fato de que os nossos sorotipos sejam diferentes dos sorotipos existentes padronizados por Dias e colaboradores (2007) para serem amplificados na reação de multiplex para América Latina. Dessa maneira, temos a intenção de identificar os sorotipos capsulares de todos os 137 isolados por multiplex *PCR*, e inclusive repetir a genotipagem dos isolados com resistência plena, para confirmar essa hipótese.

Hausdorff e colaboradores, em um estudo de revisão realizado em 2007, relataram que a incidência anual de doença invasiva pneumocócica (DIP) varia aproximadamente de 10-100 casos/100.000 hab. No presente estudo a frequência de isolados de DIP encontrada está muito abaixo da média relatada, porém essa frequência poderia ser maior se houvesse uma vigilância das DIP mais abrangente, uma vez que os isolados cedidos pelo LACEN-CE foram recuperados apenas de dois locais.

Muitos autores voltam suas atenções para isolados de doença sistêmica, uma vez que a infecção sistêmica pneumocócica é responsável por muitas mortes em todo o globo. Os isolados considerados de doença sistêmica são aqueles recuperados a partir de sítios normalmente estéreis, como líquido cefalorraquidiano, sangue, líquido pleural, líquido sinovial e outros líquidos estéreis. (FRASER et al, 2001, MANTESE et al, 2003; NASCIMENTO-CARVALHO et al, 2003; BRANDILEONE et al, 2006; LIN et al, 2006; MYERS; GERVAIX 2007; TZANAKAKI; MASTRANTONIO, 2007; VIEIRA et al, 2007; ROSSONI et al, 2008; HSIEH et al, 2009). No presente estudo, a maioria dos isolados sistêmicos foram recuperados de LCR e sangue, corroborando com os autores citados.

No presente estudo, os isolados foram recuperados de pacientes com infecção sistêmica de idades variadas, com a maioria do pacientes com a faixa etária entre vinte e trinta anos de idade, diferente de muitos autores, que encontraram em seus trabalhos a maioria dos pacientes com infecção sistêmica com faixa etária entre zero e quinze anos. (MANTESE et al, 2003; BRANDILEONE et al, 2006; LIN et al, 2006; PARASKAKIS et al, 2006; VIEIRA et al, 2007; LAGOS et al, 2008).

Nos últimos dez anos tem sido cada vez mais frequente, em diversas partes do mundo, o relato de casos de infecção causada por pneumococo com sensibilidade diminuída, ou até mesmo totalmente resistente à penicilina e/ou a outros antimicrobianos utilizados no tratamento dessa infecção, inclusive no Brasil (NASCIMENTO-CARVALHO et al, 2003).

Dentre os países da Europa, se observa na Espanha (LATORRE et al, 2004) uma alta taxa de resistência à penicilina em isolados recuperados de pacientes com infecção sistêmica, que é de 49%, sendo 38,6% de resistência intermediária e de 10,4% de resistência plena, e uma taxa de resistência à cefotaxima de 20,8%. Na França (DECOUSSER et al, 2004), a taxa de resistência à penicilina também é alta, 47,5%, sendo 31,5% de resistência intermediária e 16% de resistência plena, já a resistência à ceftriaxona é baixa, 0,4%. Na Grécia (PARASKAKIS, et al 2006) a taxa de resistência à penicilina é de 17,2% e à ceftriaxona de 1,1%. Na Turquia (YALCIN et al, 2006) e na Itália (BOCCIA et al, 2004) as taxas de resistência à penicilina são, respectivamente, de 36% e 11,4%.

Nos países europeus escandinavos, como Dinamarca e Suécia, a frequência de resistência à penicilina em isolados de infecção sistêmica é baixa, 1 a 2% (JEFFERSON et al, 2006). Isto se deve à política restritiva aos antibióticos nesses países (BERGAN, 2001).

Dentre os países localizados no Oriente Médio, o Líbano (UWAYDAH et al, 2006) apresenta, em isolados de infecção sistêmica, uma taxa de resistência à penicilina de 69,9%, sendo 56,1% de resistência intermediária e 13,8% de resistência plena. A Arábia Saudita (SHIBL, 2008) apresenta uma taxa de resistência à penicilina de 54% (42% de resistência intermediária e 12% de resistência plena) e à cefotaxima de 6%.

Em Taiwan, Lin e colaboradores (2006), realizaram um estudo de vigilância com isolados de *S. pneumoniae* recuperados de infecção sistêmica, no período de 1999-2004, e obtiveram uma taxa de resistência à penicilina de 76,2%, sendo 50,7% de resistência intermediária e 25,5% de resistência plena, e uma taxa de resistência à cefotaxima de 42%, sendo 30,8% de resistência intermediária e 11,2% de resistência plena.

Na África, em um estudo realizado por Wasfy e colaboradores (2005), no Egito, foi encontrada uma taxa de resistência à penicilina, em isolados recuperados de infecção sistêmica, de 49%, sendo 46% de resistência intermediária e 3% de resistência plena. Na Gâmbia (ADEGBOLA et al, 2006) a taxa de resistência intermediária em isolados de amostras sistêmicas foi de aproximadamente 7%, não sendo encontrada resistência plena.

Na América do Sul, em um estudo de vigilância realizado por Agudelo e colaboradores (2006), na Colômbia, no período de 1994-2004, foi relatada uma taxa de resistência à penicilina, em isolados de infecção sistêmica de 29,8%.

No Brasil, em 2003 foram realizados dois estudos relacionados a isolados de *S. pneumoniae* invasivos, um em Salvador, realizado por Nascimento-Carvalho e colaboradores e o outro em Uberlândia, Minas Gerais, realizado por Mantese e colaboradores. No primeiro foi encontrada uma taxa de resistência à penicilina de 20% e à cefotaxima de 1,5%. No segundo, foi detectada uma taxa de resistência à penicilina de 15,5% (12,8% de resistência intermediária e 2,7% de resistência plena) e à cefotaxima de apenas 2%.

Vieira e colaboradores (2007), estudando apenas amostras de LCR, no Distrito Federal, estocadas no período de 1995-2004, relataram uma taxa de resistência intermediária à penicilina de 20,26%, não encontrando resistência à cefotaxima. Rossoni e colaboradores (2008) realizaram um trabalho similar, no Paraná, com isolados recuperados de LCR, no período de 2001-2002, encontraram 15% de resistência à penicilina (14% de resistência intermediária e 1% de resistência plena) e 1% de resistência à ceftriaxona.

Brandileone e colaboradores (2006), em um estudo multicêntrico, realizado no Brasil, no período entre 1993-2004, relataram um aumento da taxa de resistência dos isolados de *S.*

pneumoniae, recuperados de pacientes com infecção sistêmica, de 10,2% para 27,9%. Foi observado um aumento na resistência intermediária e plena de 9,1% e 1,1%, respectivamente, para 22% e 5,9%. Foi relatado, ainda nesse trabalho, que no Nordeste, no período de 2000-2004, a taxa de resistência intermediária e plena à penicilina foi respectivamente, de 15,4% e 0,7%.

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

Através dos estudos acima citados é possível afirmar que a taxa de resistência dos isolados invasivos de *S. pneumoniae* varia bastante em todo o mundo. No presente estudo a taxa de resistência à penicilina fica próxima à de alguns países, como Espanha (LATORRE et al, 2004), França (DECOUSSER et al, 2004), Turquia (YALCIN et al, 2006) e Egito (WASFY et al, 2005), fica muito abaixo de países como Taiwan (LIN et al, 2006), Líbano (UWAYDAH et al, 2006) e Arábia Saudita (SHIBL, 2008). Se levar em conta os estudos realizados na América Latina, o nosso estudo apresentou a maior taxa de resistência dos isolados invasivos de *S. pneumoniae* à penicilina, inclusive, muito maior do que a relatada em um estudo multicêntrico, realizado por Brandileone e colaboradores (2006), no Brasil, que apresentou uma taxa de resistência no Nordeste muito diferente da realidade encontrada em nosso estudo, em Fortaleza.

Em relação às cefalosporinas de 3ª geração, que no nosso caso foi testada a ceftriaxona, o presente estudo tem uma taxa de resistência dos isolados invasivos de *S. pneumoniae* maior que a maioria dos trabalhos citados, ficando com uma taxa de resistência menor, apenas, da Espanha (LATORRE et al, 2004) e Taiwan (LIN et al, 2006).

O perfil de sorotipos mais prevalentes difere de uma região para outra e a imunidade induzida aparentemente é sorotipo-específica. Portanto, para o amplo uso da vacina pneumocócica conjugada, é necessário o adequado conhecimento da distribuição dos sorotipos mais prevalentes em cada região.

Em um estudo de revisão, realizado em 16 países da Europa, Jefferson e colaboradores (2006) citaram que os sorogrupos mais comuns de *S. pneumoniae* encontrados foram os 14, 6, 19 e 23, com cobertura da vacina conjugada 7-valente de 75,32%.

Na Ásia, em um estudo multicêntrico realizado na China por Yao e colaboradores (2006), foi observado que os sorogrupos de *S. pneumoniae* mais freqüentes são os 19, 23, 6, 14 e 15, sendo cobertos pela vacina conjugada 7-valente 57,6% do total dos sorotipos. Em Taiwan, os sorotipos de *S. pneumoniae* mais comuns foram 14, 23F, 6B, 19F e 3, dos quais

85% são cobertos pela vacina conjugada 7-valente (LIN et al, 2006). Na Arábia Saudita, os sorotipos mais comuns de *S. pneumoniae* foram os 14, 23F, 6B e 19F, com potencial cobertura da vacina 7-valente de 83% (SHIBL, 2008).

No continente africano, os sorotipos de *S. pneumoniae* mais frequentes no Egito são os 6B, 1, 19A, 23F e 6A, sendo a cobertura da vacina conjugada 7-valente de apenas 29% (WASFY et al, 2006). Na Gâmbia os sorotipos mais comuns são os 1, 5, 14, 6A 19A e 23F, com a cobertura da vacina conjugada 7-valente sobre os sorotipos de 23,9% (ADEGBOLA et al, 2006).

Na América Latina, Camargos e colaboradores (2006), em um estudo de revisão, observaram que os sorotipos de *S. pneumoniae* mais comuns no continente foram os 14, 5, 1, 6A/B, 23F, 7F, 9V, 19F, 18C, 19A e 9N, com pequenas diferenças entre os países, sendo o sorotipo 14 mais associado com a resistência plena, e observaram também que a vacina conjugada 7-valente cobria 58% dos sorotipos encontrados.

Lagos e colaboradores (2008), em um trabalho realizado no Chile, entre 1994 e 2007, verificaram que os sorotipos mais prevalentes em isolados de infecção sistêmica de *S. pneumoniae* foram os 14, 1 e 5.

Em dois trabalhos, realizados no Brasil, onde foram recuperados isolados de *S. pneumoniae* apenas de LCR, os sorotipos mais frequentes encontrados no Distrito Federal foram os 14, 6B, 18C, 5, 19F, 23F, 9V e 6A, tendo cobertura da vacina conjugada 7-valente de 51,8% dos isolados, com os sorotipos 14, 6B, 23F e 19F relacionados com resistência à penicilina (VIEIRA et al, 2007), enquanto que no Paraná foram mais comuns foram os 14, 23F, 3, 19F, 18C, 7F, 6A e 6B, com os sorotipos 14, 23F, 6B e 5 relacionados com resistência à penicilina (ROSSONI et al, 2008).

Em Salvador (NASCIMENTO-CARVALHO et al, 2003), os sorotipos de isolados invasivos de *S. pneumoniae* mais frequentes foram os 14, 5, 6A, 6B, 19F, 9V, 18C e 23F, com cobertura de 67,2% pela vacina 7-valente e com os sorotipos 14, 6B e 19F relacionados com resistência à penicilina. Em Uberlândia (MANTESE et al, 2003), Minas Gerais, os sorotipos mais prevalentes de isolados de *S. pneumoniae* recuperados de infecções sistêmicas são 14, 3, 1, 5, 6A, 6B, 18C, 19F e 9V, com a cobertura de 46,7% dos sorotipos cobertos pela vacina 7-valente e com os sorotipos 14, 23F, 19A e 6B relacionados com resistência à penicilina.

Em São Paulo, em um trabalho realizado por Berezin e colaboradores (2007), no período de Junho de 1997 a Maio de 2001, em foi observado que os sorotipos de isolados invasivos de *S. pneumoniae* mais frequentes foram os 14, 1, 23F e 5, com cobertura, estimada, da vacina conjugada 7-valente de mais de 66%.

Em um estudo multicêntrico, realizado no Brasil, com isolados de *S. pneumoniae* recuperados de pacientes com infecção sistêmica, no período entre 1977-2000, os sorotipos mais comuns foram 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, com cobertura, estimada, da vacina 7-valente de 58,2% dos sorotipos (BRANDILEONE et al, 2003).

Laval e colaboradores (2006), em Goiânia, encontraram em um estudo comparativo entre isolados de crianças portadores e isolados de crianças com infecção sistêmica uma maior frequência dos sorotipos, respectivamente, 14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F, 18C, 19A e 9N, e 14, 6B, 18C, 19F, 5, 23F, 4, 6A e 9V, ou seja, diferem em poucos sorotipos mais comuns, possuindo os mesmos sorotipos relacionados com a resistência: 14, 6B, 19F, 23F e 19A. A cobertura da vacina 7-valente entre os sorotipos de isolados de portadores é de 52,2%, enquanto que a cobertura dos sorotipos dos isolados invasivos é de 62,4%.

No presente estudo, os sorotipos mais comuns de isolados de *S. pneumoniae* de infecções sistêmicas são semelhantes aos sorotipos mais comuns encontrados na Europa (JEFFERSON et al, 2006) e Ásia (LIN et al, 2006; YAO et al, 2006; SHIBL, 2008). Porém, nos países da África (WASFY et al, 2005; ADEGBOLA et al, 2006) e América Latina, inclusive no Brasil, (BRANDILEONE et al, 2003; MANTESE et al, 2003; NASCIMENTO-CARVALHO et al, 2003; BEREZIN et al, 2007; CAMARGOS et al, 2007; VIEIRA et al, 2007; LAGOS et al, 2008) há uma discordância, pois estudos nesse continentes relatam os sorotipos 1 e 5 entre os mais comuns causando doença invasiva, e no nosso estudo não foi encontrado nenhum isolado correspondente a esses sorotipos. No Brasil, muitos trabalhos anteriormente citados, relatam entre os isolados invasivos de *S. pneumoniae*, o sorotipo 1 e 5 entre os mais comuns encontrados.

Já os sorotipos relacionados com a resistência à penicilina observados por nós estão de acordo com todos os trabalhos anteriormente citados, exceto o de Rossoni e colaboradores (2008), que relataram o sorotipo 5 entre os resistente à penicilina.

Em relação à cobertura, estimada, da vacina conjugada 7-valente, que, no presente estudo, é a mesma da vacina conjugada 10-valente (31,8%), se comparado aos outros trabalhos que estimaram a cobertura pela vacina 7-valente, foi baixa, corroborando com os resultados encontrados nos países da África, 29% e 23,9%(ADEGBOLA et al, 2006; WASFY et al, 2005). Em todos os outros trabalhos anteriormente citados a cobertura é próxima ou maior que 50%, mostrando que a vacina seria uma boa medida profilática para prevenção da doença pneumocócica. Essa baixa cobertura da vacina conjugada 10-valente, se dá também por não haver nenhum isolado em nosso estudo com sorotipo 1 ou 5, que é muito comum serem relatados em outros trabalhos, uma vez que os dois sorotipos estão na formulação da vacina.

O presente estudo gerou dados sobre a prevalência dos isolados de *S. pneumoniae* de crianças saudáveis usuárias de creches, bem como a frequência de isolados de pacientes com infecção sistêmica, em Fortaleza. Também revelou a sensibilidade dos isolados frente à droga de escolha para o tratamento das doenças pneumocócicas, a penicilina, e a outras drogas escolhidas para substituí-la, em caso de resistência elevada, da mesma, na região, o que é importante para guiar o tratamento das doenças pneumocócicas, uma vez que na maioria das vezes ele é empírico. Gerou dados também sobre os sorotipos presentes entre os isolados de *S. pneumoniae* de pacientes com infecção sistêmica, o que contribuiu para avaliar a cobertura da vacina conjugada 10-valente, que será introduzida no programa de imunização nacional, pois apesar de apresentar uma cobertura relativamente baixa, a vacina é capaz de cobrir 50% das cepas resistentes encontradas neste estudo.

6. CONCLUSÕES

- A prevalência de *S. pneumoniae* entre as crianças usuárias de creches em Fortaleza é alta, apresentando similaridade à encontrada em outro estudo realizado em 1998 (REY et al, 2002);
- A taxa de portadores tende a ser maior em crianças usuárias de creches menores de 2 anos de idade, concordando com a literatura que coloca essa faixa etária dentro dos fatores de risco;
- A taxa de resistência à penicilina e à ceftriaxona entre os isolados de *S. pneumoniae* de crianças usuárias de creches é muito alta, sendo inclusive três vezes maior para resistência plena à penicilina e três e doze vezes maior para resistência intermediária e plena à ceftriaxona, se comparada ao estudo realizado em 1998 (REY et al, 2002);
- A identificação do sorotipo capsular por multiplex *PCR* não foi efetiva para os isolados de *S. pneumoniae* recuperados de crianças usuárias de creches que apresentaram resistência plena, provavelmente porque os *primers* para identificação dos sorotipos capsulares encontrados por nós não estavam presentes no protocolo adotado para América Latina.
- A frequência dos isolados de doença pneumocócica invasiva foi de 1 caso/100.000 hab., o que mostra uma necessidade de uma vigilância pneumocócica mais abrangente, uma vez que os isolados foram provenientes de apenas dois locais.
- A taxa de resistência à penicilina e à ceftriaxona entre os isolados de *S. pneumoniae* recuperados de indivíduos com infecção sistêmica são as maiores da América Latina, tendo como um dos principais motivos a falta de controle no uso de antibióticos.
- Entre os sorotipos mais comuns de *S. pneumoniae* recuperados de indivíduos com infecção sistêmica não foi encontrado os sorotipos 1 e 5, fugindo ao que foi relatado na literatura da América Latina e do Brasil.
- A cobertura da vacina pneumocócica conjugada 10-valente é relativamente baixa, pois cobre apenas 42,3% dos sorotipos de *S. pneumoniae* isolados de indivíduos com infecção sistêmica, encontrados no presente estudo, no entanto, o número total de amostras foi muito pequeno.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBOLA, R.A. et al. Evaluation of Binax Now *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test in Children in A Community With A High Carriage Rate of Pneumococcus. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, n. 7, p. 18-19, 2001.

ADEGBOLA, R.A. et al. Serotype and antimicrobial susceptibility patterns of isolates of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in The Gambia 1996-2003. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, n.7, p. 1128-1135, 2006.

AGUDELO, C.L. et al. *Streptococcus pneumoniae*: serotype evolution and patterns of antimicrobial susceptibility in invasive isolates from 11 years surveillance (1994 -2004) in Colombia. **Biomedica.**, v. 26, n. 2, p. 234-249, 2006.

ANTONIO, M. et al. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. **J. Med. Microbiol.**, v. 58: p. 296-302, 2009

ARTAN, M.O.; BAYKAN, Z.; ARTAN, C. Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in the oropharynx of healthy pre school children and identification of risk factors. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 61, p. 302:303, 2008.

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

AUSTRIAN, R. Pneumococcus: the first one hundred years. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, n. 2, p. 183-189, 1981.

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

BAQUERO, F. et al. Antibiotic consumption and resistance selection in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, suppl. 2, p. 27-37, 2002.

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

BEREZIN, E. et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 26, n. 7, p. 643-645, 2007.

BERGAN, T. Antibiotic usage in Nordic countries. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 18, n. 3, p. 279–282, 2001.

BOCCIA, D. et al. The geographic relationship between the use of antimicrobial drugs and the pattern of resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Italy. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 60, n. 2, p. 115–119, 2004.

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

BRANDILEONE, M.C.C. et al. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J. Infect. Dis.** v.187, n. 8, p. 1206-1212, 2003.

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

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

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

CARDOZO, D.M. et al. Nasopharyngeal Colonization and Penicillin Resistance Among Pneumococcal Strains: A Worldwide 2004 Update. **Bra. J. Infec. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 293-303, 2006.

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

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

CHEN, C.J. et al. Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children and adults in northern Taiwan. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 59, n. 3. p. 265-269, 2007.

CHIU, S.S. et al. Nasopharyngeal carriage of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* among young children attending 79 kindergartens and day care centers in Hong Kong. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 10, p.2765-2770, 2001.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Approved standard M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2007.

DECOUSSER, J.W. et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* in France: antimicrobial resistance, serotype, and molecular epidemiology findings from a monthly national study in 2000 to 2002. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 9, p. 3636–3639, 2004.

DE SOUSA, M.H.H. et al. Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 7, n. 6, p. 433-434, 1988.

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

DEAN, A.G. et al. Epi Info v.6.04: a world processing, database and statistics program for epidemiology on microcomputers. Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1995.

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

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

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

FADEN, H. et al. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 9, n. 9, p. 623-626, 1990.

FARREL, D.J., et al. Increased Antimicrobial Resistance Among Nonvaccine Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in the Pediatric Population After the Introduction of 7-Valent Pneumococcal Vaccine in the United States. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 26, n. 2, p. 123-128, 2007.

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

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

FRANCO, C.M. et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 29, n. 1, p. 77-79, 2010.

FRASER, D. et al. A Decade (1989–1998) of Pediatric Invasive Pneumococcal Disease in 2 Populations Residing in 1 Geographic Location: Implications for Vaccine Choice. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 4, p. 421-427, 2001.

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

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

HAMER, D.H. et al. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test in Children with Nasopharyngeal Pneumococcal Carriage. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 7, p. 1025-1028, 2002.

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

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

HENRICHSEN, J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. **J. Infect. Dis.**, v.1, p. 31-37, 1979.

HENRICHSEN, J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.2759-2762, 1995.

HSIEH, Y. C. et al. Characterization of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* among Taiwanese children. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, n. 11, p. 991-996, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) (14 de agosto de 2009). Página visitada em 14 de agosto de 2009. Estimativas da população para 1º de julho de 2009.

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

JOLOBA, M.L. et al. High prevalence of carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children in Kampala Uganda. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 17, n. 5, p. 395-400, 2001.

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

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

KLUGMAN, K.P. Pneumococcal resistance antibiotics. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, n. 2, p.171-196, 1990.

KONEMAN et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 666-758, 2008.

LAGOS, R. et al. Age- and Serotype-Specific Pediatric Invasive Pneumococcal Disease: Insights from Systematic Surveillance in Santiago, Chile, 1994–2007. **J. Infect. Dis.**, v. 198, n. 12, p. 1809-1817, 2008.

LATORRE, C. et al. Characterisation of invasive pneumococcal isolates in Catalan children up to 5 years of age, 1989–2000. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. p. 177–81, 2004.

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

- LAVAL, C.B. et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.12, n. 1, p. 50-55, 2006.
- LIN, W.J. et al. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from children in Taiwan from 1999 to 2004. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 56, n. 2, p. 189-196, 2006.
- LO, W-T. et al. Rate of nasopharyngeal carriage, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* among children in northern Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v.36, n. 3, p.175-181, 2003
- LUCAREVSCHI, B.R. et al. Oropharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by children attending day care centers in Taubate, SP: correlation between serotypes and the conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. **J. Pediatr. (Rio J)**., v. 79, n. 3, p. 215-220, 2003.
- LUND, E. On the nomenclature of the pneumococcal types. **Intern. Jour. System Bacter.**, v.20, p.321, 1970.
- MALFROOT, A. et al. A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. **Clin. Microbiol. Infect.**, p. 10, n. 9, p. 797-803, 2004.
- MANTESE, O.C. et al. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. **J. Pediatr. (Rio J)**., v.79, n. 6, p. 537-542, 2003.
- MASUDA, K. et al. Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. **Pediatr. Int.**, v.44, n.4, p. 376-380, 2002.
- MATSUMOTO, A. et al. The emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and host risk factors for carriage of drug-resistant genes in Northeastern Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, n. 1, p. 10-13 2007.
- MONTEROS, L.E.E. et al. *Streptococcus pneumoniae* isolates in healthy children attending day-care centers in 12 states in Mexico. **Salud Publica Mex.**, v. 49, n. 4, p. 249-255, 2007.
- MORAIS, L. et al. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. **J. Med. Microbiol.**, v.56, n. 9, p. 1181-1184, 2007.
- MORENO, J; CASTAÑEDA, E. Caracterización molecular de aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina recuperados de pacientes adultos. **Bioméd.** v. 23, n. 1, p. 77-86, 2003.
- MORENO, J. et al. E. Detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal samples by PCR-Based multiplex assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 12, p. 6152-6154, 2005.
- MYERS, C.; GERVAIX, A. *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia in children. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 30, supl. 1, p. 24-28, 2007.

NASCIMENTO-CARVALHO, C.M. et al. Cepas invasivas de pneumococo isoladas de crianças e adolescentes em Salvador. **J. Pediatr. (Rio J)**, v. 79, n. 3, p. 209-214, 2003.

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

OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p.98-104, 2002.

OCHOA, T.J. et al. Penicillin resistance and serotype/serogroups of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children younger than 2 years in Lima, Peru. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 52, p. 59-64, 2005.

OZDEMIR, B. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Turkish infants. **J. Infect.**, v. 56, n. 5, p. 332-339, 2008.

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

PALLARES, R.; FENOLL, A.; LINÁRES, J. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, supl. 1, p. 15-24, 2003.

PARASKAKIS, I. et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001–2004. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.12, n. 5, p. 490-493, 2006.

PINOS, J.L.J.D.; RIGÓ, M.A.; SALA, J.R. Levofloxacin, fluorquinolona de tercera generación. **Farm. Hosp.**, v. 24, n. 5, p.288-295, 2000.

PLETZ, M.W.R. et al. Levofloxacin-Resistant Invasive *Streptococcus pneumoniae* in the United States: Evidence for Clonal Spread and the Impact of Conjugate Pneumococcal Vaccine. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 48, n. 9, p. 3491-3497, 2004.

PLETZ, M.W.R. et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 32, n. 3, p. 199-206, 2008.

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

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

ROCHE, A. et al. Prevalence of nasopharyngeal carriage of pneumococcus in preschool children attending day care in London. **Arch. Dis. Child.**, v. 92, n. 12, p. 1073-1086, 2007.

- ROGERS, P.D. et al. Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, n. 4, p. 616-626, 2007.
- ROSSI, F. et al. Susceptibility of *S. pneumoniae* to various antibiotics among strains isolated from patients and healthy carriers in different regions of Brazil (1999-2000). **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 6, p. 305-312, 2001.
- ROSSONI, A.M.O. et al. Acute bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* resistant to the antimicrobial agents and their serotypes. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 66, n. 3^a, p. 509-515, 2008.
- SCHULTZ, C. Changes in nasal carriage of drug-resistance *Streptococcus pneumoniae* in urban and rural Vietnamese schoolchildren. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, n. 5, p. 484-492, 2006.
- SCOTT, J.A.G et al. Serotypes distribution and prevalence of resistance to benzyl penicillin in the three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. **Clin. Infect. Dis.**, v.27, p.1442-50, 1998.
- SHIBL, A.M. Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive pneumococcal disease isolates among children less than five years old in Saudi Arabia (2000–2004). **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, p. 876–879, 2008.
- SONG, J.H. et al. High incidence of resistance to multiple antimicrobials in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. **Clin. Infect. Dis.**, v.28, n. 6, p.1206-11, 1999.
- STRATCHOUNSKI, L. S. et al. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from daycare centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, n. 9, p. 853-866, 2006.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, n. 3, p. 281-301, 2000.
- TZANAKAKI, G.; MASTRANTONIO, P. Aetiology of bacterial meningitis and resistance to antibiotics of causative pathogens in Europe and in the Mediterranean region. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, n. 6, p. 621-629, 2007.
- UWAYDAH, M. et al. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Lebanon: the first national widestudy. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 27, n.3, p. 242-246, 2006.
- VELASCO, E.A. et al. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 591-603,1995.
- VELASQUEZ, P.A.G. et al. High prevalence of children colonized with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in public day-care centers. **J. Pediatr. (Rio J)**, v. 85, n. 6, p. 516-522, 2009.
- VIEIRA, A.C. et al. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. **J. Pediatr. (Rio J)**, v. 83, n. 1, p. 71-78, 2007.

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

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

WEISER, J.N. et al. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n.7 p. 4215–4220, 2003.

YALCIN, I. et al. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive *S. pneumoniae* disease isolates from children in Turkey, 2001–2004. **Eur. J. Pediatr.**, v. 165, n.9, p. 654-657, 2006.

YAO, K.H. et al. Serotype distribution and resistance to β -lactams of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Beijing, Shanghai and Guangzhou, 2000–2002. **Chin. J. Pediatr.**, v. 44, n.12, p. 928-932, 2006.

ZETTLER, E.W. et al. Polymerase chain reaction used to detect *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin. **J. Bras. Pneumol.**, v. 30, n. 6, p. 521-527, 2004.

ANEXOS

Anexo I - Questionário

VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA DO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
QUESTIONÁRIO DE PORTADORES SADIOS
ID do entrevistador (ID): <input type="text"/>
Número de identificação da ficha (NUMID): <input type="text"/>

1. Identificação

1.1 Data da coleta (DATACOLE): <input type="text"/>
1.2 LOCAL DA COLETA DE MATERIAL (LOCOLET): <input type="text"/>
1 Posto de Vacinação 2 Creche Municipal 3 Outro: <input type="text"/>
1.3 Nome da criança: <input type="text"/> SEXO (M,F): <input type="text"/>
1.4 Data de nascimento (DATANAS): <input type="text"/>
1.5 Idade (IDADE): <input type="text"/> anos <input type="text"/> meses
1.6 Quantas crianças moram na casa (CRIACASA): <input type="text"/>

2. Dados clínicos

2.1. A Sra. deu algum remédio para seu filho de hoje há 30 dias atrás (DEUREMED): <input type="text"/>
1 Sim 2 Não 9 Não Sabe
2.2. A Sra pode dizer o(s) nome(s) do(s) remédio(s) que seu filho tomou (se puder, mostrar a embalagem): <input type="text"/>
NOME DO REMÉDIO <input type="text"/>
<input type="text"/>
<input type="text"/>

2.3. Onde a criança passa o dia quando ela está boa (CRIANFIC): <input type="text"/>
1 Casa 2 Creche 3 Casa de parentes, vizinhos 4 Outro local <input type="text"/>

Anexo II - Sequência dos *primers* e tamanho dos amplicons

Primer	GenBank /Sanger No.	Sequência (5' - 3')	Posição do nucleotídeo	Tamanho (pb)
CPSA-F	AF057294	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	2314	160
CPSA-R		GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	2473	
**Novo 14-F2	34359?	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT		189
**Novo 14-R2		GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT		
6A/B-R	AF316640	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	8656	250
6A/B-F		TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	8877	
19F-F	U09239	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	7828	304
19F-R		GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	8100	
23F-F	AF057294	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	12118	384
23F-R		CAC AAC ACC TAA CAC ACG ATG GCT ATA TGA TTC	12566	
9V-F	980/68	CTT CGT TAG TTA AAA TTC TAA ATT TTT CTA AG	12345	753
9V-R		GTC CCA ATA CCA GTC CTT GCA ACA CAA G	13070	
1-F	Z83335	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	10469	280
1-R		CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	10715	
5-F	AY336008	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	6123	362
5-R		GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	6450	

Primer	GenBank /Sanger No.	Sequência (5' - 3')	Posição do nucleotídeo	Tamanho (pb)
4-F	AF316639	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	9558	430
4-R		GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	9957	
19A-F	AF094575	GTT AGT CCT GTT TTA GAT TTA TTT GGT GAT GT	12118	478
19A-R		GAG CAG TCA ATA AGA TGA GAC GAT AGT TAG	12566	
Sg18-F	4593/40	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	12687	573
Sg18-R		TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	13230	
3-F	Z47210	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	9179	371
3-R		CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	9519	
11A-F	1813/39	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	11640	463
11A-R		GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	12071	
*New9L/N-F		GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC		516
*New9L/N-R		ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T		
10A-F	1006/38	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	12423	628
10A-R		GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	13021	
7F-F	554/62	CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG	13356	826
7F-R		CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC	14150	

Primer	GenBank /Sanger No.	Sequência (5' - 3')	Posição do nucleotídeo	Tamanho (pb)
7C-F	Sutcliff	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	9438	260
7C-R		GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	9665	
12F-F	6312	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	14407	376
12F-R		CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	14753	
15B/C-F	7904/39	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	7314	463
15B/C-R		CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	7779	
38-F	9687/39	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	13848	574
38-R		ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	14392	
17F-F	Rose (AM) vac.	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	10484	693
17F-R		GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	11145	
8new-F	573/62	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	8084	201
8new-R		CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT	8348	
34-F	676/74	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	7350	408
34-R		CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	7725	
20-F	34365 (AM)	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	9567	514
20-R		CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	10048	

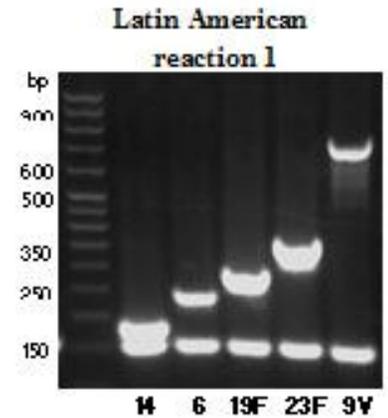
Primer	GenBank /Sanger No.	Sequência (5' - 3')	Posição do nucleotídeo	Tamanho (pb)
22F-F	1772/40 (da)	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	11055	643
22F-R		CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	11666	
31-F	Nr.34374 (am)	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	9144	701
31-R		CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	9815	
33F-F	AY163221	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	181	338
33F-R		CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	488	
15A-F	389/39	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	7114	436
15A-R		GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	8313	
35F-F	361/39 (da)	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	7374	517
35F-R		GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	7858	
35B-F	4356/39 (da)	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	10556	677
35B-R		CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	11199	
16F-F	Nr.34361	CTG TTC AGA TAG GCC ATT TAC AGC TTT AAA TC	11521	988
16F-R		CAT TCC TTT TGT ATA TAG TGC TAG TTC ATC C	12478	
6C-F		CAT TTT AGT GAA GTT GGC GGT GGA GTT		727
6C-R		AGC TTC GAA GCC CAT ACT CTT CAA TTA		

Primer	GenBank /Sanger No.	Sequência (5' - 3')	Posição do nucleotídeo	Tamanho (pb)
23A-Fnew		TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G		712
23A-Rnew		CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC		
New 2-F		TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC		290
New 2-R		ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT		

Anexo III-Esquema de Multiplex PCR

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

		Para 25 µM		Conc. (µM)	1 rx	PB
Reação 1 (Primer ID)	Concentração original (µM)	Primer (µL)	Tampão TE (µL)			
CPSA-F (419100)	303,97	20,56	229,44	0,1		160
CPSA-R (507012)	407,42	15,34	234,66	0,1		
New 14-F2 (705182)	406,59	15,37	234,63	0,3		189
New 14-R2 (705183)	250,65	24,94	225,06	0,3		
6A/B/C-R (613642)	397,1	15,74	234,26	0,3		250
6A/B/C-F (613641)	394,43	15,85	234,15	0,3		
19F-F (508752)	418,99	14,92	235,08	0,5		304
19F-R (508753)	460,06	13,59	236,41	0,5		
23F-F (705202)	241,38	25,89	224,11	0,5		384
23F-R (705203)	398,88	15,67	234,33	0,5		
9V-F (613649)	405,55	15,41	234,59	0,5		753
9V-R (613650)	373,75	16,72	233,28	0,5		



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

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

Conc. (μM)
1 rx
0,1
0,1
0,3

PB

160

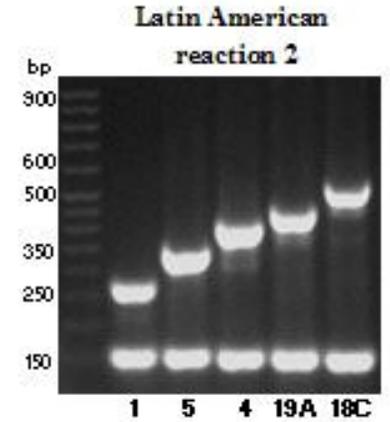
280

362

430

478

573



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

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

Conc. (µM)
1 rx
0,1
0,1
0,3
0,3
0,3
0,3
0,5
0,5
0,5
0,5
0,7
0,7

PB

160

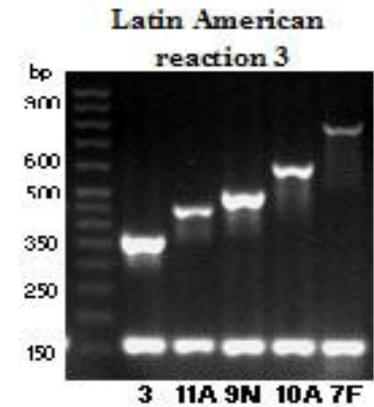
371

463

516

628

826



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

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

Conc. (µM)
1 rx
0,1
0,1
0,3
0,3
0,5
0,5
0,3
0,3
0,3
0,3
0,5
0,5

PB

160

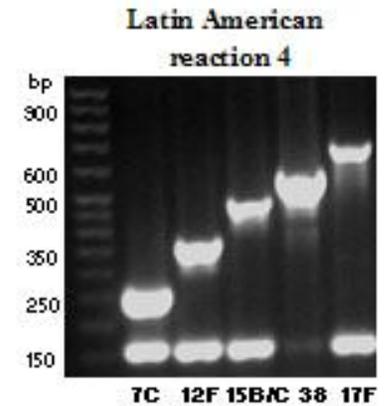
260

376

463

574

693



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

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

Conc. (µM)
1 rx
0,1
0,1
0,2
0,2
0,3
0,3
0,3
0,3
0,5
0,5
0,5
0,5

PB

160

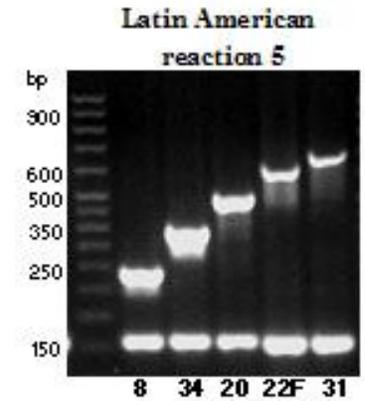
201

408

514

643

701



REAÇÃO 6 (Sorotipos 33F; 15A; 35F; 35B; 16F)

Reação 6 (Primer ID)	Para 25 µM		
	Concentração original µM	Primer (µL)	Tampão TE (µL)
CPSA-F (419100)	303,97	20,56	229,44
CPSA-R (507012)	407,42	15,34	234,66
33F-F (803223)	440,13	14,20	235,80
33F-R (803224)	434,71	14,38	235,62
15A-F (705184)	302,44	20,67	229,33
15A-R (705185)	253,13	24,69	225,31
35F-F (705212)	315,64	19,80	230,20
35F-R (705213)	381,85	16,37	233,63
35B-F (705210)	322,71	19,37	230,63
35B-R (705211)	370,57	16,87	233,13
16F-F (501386)	247,15	25,29	224,71
16F-R (501387)	315,76	19,79	230,21

Conc. (µM)
1 rx
0,1
0,1
0,3
0,5
0,5
0,5
0,5

PB

160

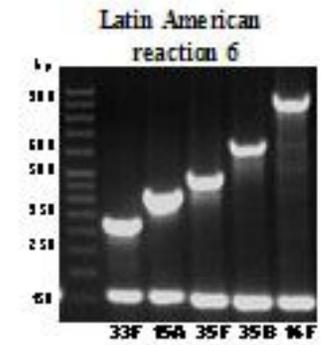
338

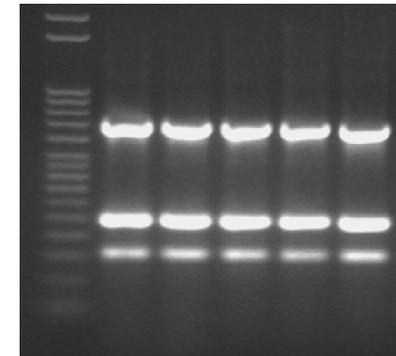
436

517

677

988



6C Reaction

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

Conc. (μ M)
1 rx
0,1
0,1
0,3
0,3
0,5
0,5

PB

160

250

727

ANEXO IV-Componentes da Reação

Reagentes	Volume (μL)	Concentração Final
H ₂ O para PCR	Variável	Variável
5 X PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 M dithiothreitol, 0,5% Tween 20; Nonidet P-40) (Promega)	5,0	
dNTPs (5mM) (New England Biolabs)	1	200 μM
MgCl ₂ (25mM)	3,5 μL	3,5 mM
F-primer (25 μM)	Pool de primers	Ver Anexo III
R-primer (25 μM)	Pool de primers	Ver Anexo III
Taq DNA polymerase (Promega)	0.4 μL	2.0 U
DNA (extrato bruto)	2,5 μL	
Volume total	25 μL	

Anexo V- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento

Consentimento para Participar no Estudo Prospectivo de Suscetibilidade antimicrobiana e sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* isolados de crianças saudáveis e indivíduos com infecção sistêmica em Fortaleza, Brasil.

O que estamos tentando encontrar:

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

O que acontecerá:

O estudo tem dois grupos participando:

- A. O grupo de indivíduos com doença grave, de onde serão colhidos materiais como sangue e líquido espinhal ou de derrame para encontrar a bactéria que nós estamos estudando.
- B. O grupo de crianças saudáveis frequentando as creches da Prefeitura de Fortaleza .

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

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

Benefícios:

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

Riscos:

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

Alternativas

A sua criança continuará a receber todas as vacinas ou a atenção da creche normalmente caso não participe do estudo.

Confidencialidade

Todas as informações sobre sua criança serão guardadas de maneira confidencial em respeito à privacidade pessoal dela. Somente os investigadores, os membros do Comitê de Ética e pessoas ligadas ao financiamento do estudo terão acesso dados do questionário ou do resultado do laboratório. Além disso, o nome de seu(sua) filho(a) ficará protegido das pessoas e substituído por um número de identificação.

Para quem ligar:

Se você tiver : (1) dúvidas sobre o estudo, por favor ligar para Dr. Bruno Jaegger (telefone 88986088 ou 33668303), Dr. Luis Carlos Rey (tel. 99823925), Dra. Cibele Barreto (99139440) ou à Dra. Lúcia Duarte da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital São José (telefone 34527881).

Direitos de saída do estudo:

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

Número total de participantes e duração do participante no estudo:

O número total estimado de participantes sadios é de 250 crianças sadias, e cada uma será examinada e terá uma amostra colhida somente uma vez.

Página de assinaturas

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

Nome da criança (letra de forma)

Nome do representante legal (letra de forma)

_____ Data: __/ __/ __ Hora _____

Assinatura do representante legal

Pessoa que obteve o consentimento

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

Nome da pessoa que obteve o consentimento (ou carimbo)

Testemunha imparcial

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

Nome da testemunha (letra de forma)

Assinatura da testemunha

Anexo VI- Aprovação do Comitê de Ética



ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA SAÚDE



HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS
INFECCIOSAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)

Ofício N.º 047/2007

Fortaleza, 17 de outubro de 2007

Referente ao Protocolo nº. 020/2007

Folha de Rosto: 147711

Título do Projeto: "Susceptibilidade antimicrobiana e sorotipos de Streptococcus pneumoniae isolados de indivíduos saudáveis e com infecção sistêmica em Fortaleza, Brasil"

Instituições envolvidas: Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) – SESA-CE e Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade do Ceará – UFC.

Pesquisadora responsável: Dr. Luis Carlos Rey

Senhora Diretora,

Levamos ao conhecimento de V. Sa. que, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas (CEP-HSJ), dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução Nº. 196 de outubro de 1996, publicada no Diário Oficial da União em 16 de outubro de 1996, **aprovou** o projeto em apreço, em 15 de outubro de 2007.

Atenciosamente,

Dra. Maria Lúcia Duarte Pereira
Coordenadora do CEP/HSJ

Ilma. Sra.

Dra. Maria Airtes Vieira Vitoriano

Diretora Geral do HSJ

Nesta