UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Determinação de sorotipos capsulares de *Streptococcus*
pneumoniae por Multiplex-PCR sequencial

Silvia Regina dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Titular Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2011

Silvia Regina dos Santos

Determinação de sorotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*
por Multiplex-PCR sequencial

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Marina Baquerizo Martinez
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

À minha querida mãe Diná e a meu querido pai Antônio (in memorian),

....que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade,

Faço da minha conquista o instrumento de gratidão por tudo que recebi de vocês e ambos são meu exemplo de coragem, no qual me guio para dar continuidade aos meus ideais.

Aos meus amados irmãos, sobrinhos e à todos os familiares

Dedico com muito amor este trabalho.

*À Professora Titular Marina Baquerizo Martinez,
orientadora a quem serei sempre grata pela
oportunidade, confiança, pelos ensinamentos e
pelo carinho e amizade concedidos.*

Agradecimentos

À minha querida e grande amiga Lilian Ferri Passadore pela presença, amizade, carinho, companheirismo, paciência e ensinamentos.

*Perguntei a um sábio, a diferença que havia
entre amor e amizade, ele me disse essa verdade...*

O Amor é mais sensível, a Amizade mais segura.

O Amor nos dá asas, a Amizade o chão.

No Amor há mais carinho, na Amizade compreensão.

*O Amor é plantado e com carinho cultivado,
a Amizade vem faceira, e com troca de alegria e tristeza,
torna-se uma grande e querida companheira.*

*Mas quando o Amor é sincero
ele vem com um grande amigo,
e quando a Amizade é concreta,
ela é cheia de amor e carinho.*

*Quando se tem um amigo
ou uma grande paixão,
ambos sentimentos coexistem
dentro do seu coração.*

William Shakespeare

À amiga Elisabete Harummyy pela ajuda, ensinamentos nos momentos difíceis, minha gratidão.

À professora associado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Dra. Maria Tereza Destro por disponibilizar o laboratório para a realização do PFGE.

Às amigas Stella, Cristiane, Angélica, Neide, Fátima e Heniqueta pela ajuda, por estarem sempre me apoiando, pelo incentivo, amizade e carinho.

Às amigas Isabel, Monica, Lara, Juliana, Lucas, Hadassa, Renee, Silvia e Carla agradeço pela disposição e carinho que sempre me trataram.

À amiga Marisa Moreira pela ajuda pelo carinho com que sempre me acolheu.

Aos meus queridos amigos e família agradeço a compreensão com minha ausência em função da elaboração deste trabalho.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho.

RESUMO

Santos, S. R. **Determinação de sorotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* por Multiplex-PCR sequencial.** 2011 Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2011.

S. pneumoniae coloniza a nasofaringe e é um dos principais agente de otite média, pneumonia, bacteremia e meningite com altas taxas de morbidade e mortalidade. Estima-se que 1,6 milhões de pessoas morram de doença pneumocócica por ano, a maioria crianças menores de cinco anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento. A cápsula polissarídica antifagocitária é o principal fator de virulência deste microrganismo e determina os 93 sorotipos conhecidos, sendo o alvo de vacinas pneumocócicas. No presente trabalho foi padronizada a tipagem molecular por Multiplex PCR de *S. pneumoniae*, que compreende 30 pares de iniciadores agrupados em seis reações sequenciais. Foram tipadas 270 cepas de pneumococo isoladas entre janeiro de 2005 a setembro de 2011, proveniente de líquido (13%), sangue (76%) e líquido pleural (11%) de 232 pacientes atendidos no Hospital Universitário da USP. Além disso, a caracterização dessas amostras quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e à diversidade foi realizada, segundo o CLSI 2011 e a genotipagem molecular pelas técnicas de Multilocus Sequence Typing Scheme (MLST) e Pulsed Field Eletrophoresis Gel (PFGE), respectivamente. A tipagem por Multiplex PCR detectou 24 sorotipos/sorogrupos diferentes, que foram: 14 (22%), 5 (12%), 12F/A (11%), 6A/B/C (10%), 7F/A (5%), 1 (4%), 3 (4%), 10A (4%), 19A (4%), 18 A/B/C/F (3%), 4 (3%), 8 (3%), 23F (3%), 19F (3%) e outros (9%) (9V/A, 9N/L, 15A, 22F, 11A/D, 31, 38, 34, 16F, 17F e não tipável). Este método apresentou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade para determinação de sorogrupos e 66% para sorotipos. Os sorotipos 14, 6B, 5 e 19F foram significativamente mais comuns em criança até dois anos, já entre adultos, os sorotipos 5 e 12F foram os predominantes. O perfil de sensibilidade em infecções não meníngeas foi de 99% de sensibilidade e 1% de resistência intermediária para penicilina e ceftriaxona. Para infecções meníngeas os resultados mostraram 73%

de sensibilidade e 27% de resistência para penicilina e 88% de sensibilidade e 12% de resistência intermediária para ceftriaxona. A resistência aos beta-lactâmicos está ligada principalmente ao sorotipo 14 que foi o sorotipo mais isolado com 52 cepas e dessas foram realizados MLST e PFGE. No MLST encontramos 51 cepas pertencentes ao clone Spain^{9v}-3 (ST 156) que é predominante na região sul e sudeste do Brasil e uma cepa com um tipo de sequência ainda não depositada. Pela técnica de PFGE foram detectados três clusters e quatro amostras não relacionadas, o cluster A foi predominante com 41(79%) cepas com 81,7% de similaridade entre elas. A técnica de Multiplex PCR demonstrou ser excelente ferramenta para a detecção dos sorotipos/sorogrupos de *S. pneumoniae*. Não foi detectada resistência plena à penicilina e ceftriaxona em infecções não meningéas consolidando a importância do uso da penicilina no tratamento da doença pneumocócica não meningéa. Houve grande similaridade genética entre cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 14.

Palavras chaves: *Streptococcus pneumoniae*, Multiplex-PCR, MLST, PFGE, resistência

ABSTRACT

Santos, S. R. **Determination of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by Multiplex-PCR sequence.** 2011 Dissertation (Master) -

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2011.

S.pneumoniae colonizes the nasopharynx and is a major agent of otitis media, pneumonia, bacteremia and meningitis with high morbidity and mortality. It is estimated that 1.6 million people die of pneumococcal disease every year, mostly children under five years old, mainly in developing countries. The antiphagocytic polysaccharide capsule is the main virulence factor of this organism and determine the 93 serotypes known for being the target of pneumococcal vaccines. In the present study was standardized molecular typing by Multiplex PCR molecular typing, which comprises 30 primer pairs grouped into six sequential reactions. We performed antimicrobial susceptibility profile, according to the CLSI 2011 and the most frequent serotype was made by molecular genotyping techniques Multilocus Sequence Typing (MLST) and pulsed-field gel Electrophoresis (PFGE). We studied 270 pneumococcal strains isolated from 2005 to September 2011, from CSF (13%), blood (76%) and pleural fluid (11%) of 232 patients attended at University Hospital of USP. Typing by Multiplex PCR detected 24 serotypes / serogroups different, which were: 14 (22%), 5 (12%), 12F / A (11%), 6A/B/C (10%), 7F / A (5 %), 1 (4%), 3 (4%), 10A (4%), 19A (4%), 18 A / B / C / F (3%), 4 (3%), 8 (3%), 23F (3%), 19F (3%) and others (9%) (9V / A, 9N / L, 15A, 22F, 11A / D, 31, 38, 34, 16F, 17F and nontypable). This method showed 100% specificity and 98% sensitivity for the determination of 66% for serogroups and serotypes. Serotypes significantly more common in children under two years were: 14, 6B, 5 and 19F among adults serotypes 5 e 12F were predominant. The sensitivity profile in non-meningeal infections was 99% sensitivity and 1% penicillin intermediate resistance to ceftriaxone. For meningeal infections the results showed 73% sensitivity and 27% resistance to penicillin and 88% sensitivity

and 12% intermediate resistance to ceftriaxone. Resistance to beta-lactams is linked mainly to serotype 14 was the serotype most isolated, and of these 52 strains were performed MLST and PFGE. MLST found in 51 strains belonging to clone Spain9V-3 (ST 156) which is prevalent in south and southeastern Brazil and a strain with a type of sequence is not deposited. The technique of PFGE found three clusters and four non-related samples, cluster A predominated with 41 (79%) strains with 81.7% similarity between them. Multiplex PCR technique proved to be an excellent tool for the detection of serotypes/serogroups of *S. pneumoniae*. We did not detect full resistance to penicillin and ceftriaxone in non-meningeal infections showing the importance of use of penicillin in the treatment of pneumococcal non-meningeal disease. There was great genetic similarity among strains of *S. pneumoniae* serotype 14.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, Multiplex-PCR, MLST, PFGE, resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema para a tipagem molecular capsular de cepas de <i>S. pneumoniae</i> . São indicadas as seis reações e os sorotipos detectados em cada reação (PAI et al., 2006); (DIAS et al.,2007)	37
Figura 2 - Distribuição das amostras de acordo o material biológico.	43
Figura 3 - Porcentagem de cepas de 2005 a 2009 tipadas por reação de Multiplex PCR.....	44
Figura 4 – Porcentagem de cepas de 2010 a 2011 tipadas por reação de Multiplex PCR.....	45
Figura 5 - Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> de acordo com o material biológico estudado durante o período de 2005 a 2011.	47
Figura 6 - Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> de acordo com a doença pneumocócica invasiva.	47
Figura 7 – Distribuição de cepas isoladas de <i>S. pneumoniae</i> por sexo.	48
Figura 8 – Distribuição porcentual dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> pelas faixas etárias menor de 2 anos, de 2 a 4 anos e de 5 a 14 anos.	49
Figura 9 – Distribuição porcentual dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> pelas faixas etárias menor de 15 a 59 anos e maior de 60 anos.	49
Figura 10 - Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> entre 2005 e 2011.	50
Figura 11 - Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> em crianças menores de 2 anos no período de 2005 a 2011. N corresponde ao número de isolados por ano nessa faixa etária.	53
Figura 12 – Porcentagem de isolados de <i>S. pneumoniae</i> por faixa etária no período de 2005 a 2011. N - número total de isolados por ano.....	53
Figura 13 - Perfil de sensibilidade da penicilina para isolados de infecção meningea e não meningea	55
Figura 14 - Perfil de sensibilidade da ceftriaxona para isolados de infecção meningea e não meningea.....	55
Figura 15 – Perfil de sensibilidade da penicilina dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> ...	60
Figura 16 – Perfil de sensibilidade da ceftriaxona dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i>	60
Figura 17 – Dendograma de similaridade genética entre as 52 cepas de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14 (PFGE), método de agrupamento UPGMA (Coeficiente de Dice).....	63

Figura 18- Principais características das 41 cepas de *S. pneumoniae* pertencentes ao cluster A analisadas por PFGE**64**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sorotipos incluídos nas vacinas conjugadas pneumocócicas.....	14
Tabela 2: Padronização do CLSI para penicilina antes e após 2008.....	20
Tabela 3 – Reação Multiplex PCR 1	32
Tabela 4 – Reação Multiplex PCR 2	32
Tabela 5 – Reação Multiplex PCR 3	33
Tabela 6 - Reação Multiplex PCR 4.....	33
Tabela 7– Reação Multiplex PCR 5	33
Tabela 8 - Reação Multiplex PCR 6.....	34
Tabela 9 – Reações, sorotipos, sequência de iniciadores e produto de PCR	35
Tabela 10 - Iniciadores do MLST <i>Streptococcus pneumoniae</i>	38
Tabela 11 – Tipos capsulares de 232 amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> determinados por Multiplex-PCR.....	45
Tabela 12 – Distribuição dos 10 sorotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> vacinais por faixa etária e ano.....	51
Tabela 13 – Distribuição dos sorotipos não vacinais de <i>S. pneumoniae</i> por idade e por ano	52
Tabela 14 - Perfil de sensibilidade e CIM das cepas de <i>S.pneumoniae</i> à penicilina por faixa etária, por sorotipo e por ano em infecção meningea.....	56
Tabela 15 - Perfil de sensibilidade de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> à ceftriaxona por faixa etária, sorotipo e por ano em infecção meningea	57
Tabela 16 - Perfil de sensibilidade de <i>Streptococcus pneumoniae</i> à penicilina em isolados de infecção não meningea por faixa etária, sorotipo e ano.....	58
Tabela 17 - Perfil de sensibilidade de <i>Streptococcus pneumoniae</i> à ceftriaxona em isolados de infecções não meningea por faixa etária, sorotipo e ano.	59
Tabela 18- Perfil de sensibilidade de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aos antibióticos pelo método de disco-difusão.....	61
Tabela 19 - Resultado do MLST	61
Tabela 20 - Análise dos resultados do PFGE	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EUA	Estados Unidos da América
DNA	ácido desoxirribonucleico
LytA	Autolisina
GPI	Cartão de identificação de Gram-positivos
GP	Cartão de identificação de Gram-positivos
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
CIM	concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
SDS	dodecil sulfato de sódio
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
PAF	fator ativador de plaquetas
TNF	fator de necrose tumoral
F	Forward
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
°C	Grau Celsius
IgA	imunoglobulina A
IAL	Instituto Adolfo Lutz
Kb	Kilo pares de base
LCR	Líquido cefalorraquidiano
µg/ml	Microgramas por mililitro
µL	microlitros
mg/mL	miligrama (s) por mililitro (s)
mg/dL	miligrama(s) por decilitro (S(
mM	Milimolar
M	Molar
MLST	Multilocus Sequence Typing
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
pb	pares de base
%	Porcentagem
SIREVA	Projeto Sistema Regional de Vacinas
PspA	Proteína pneumocócica A de superfície
PspC	Proteína pneumocócica C de superfície
PBP	proteínas ligadoras de penicilina

PCR	reação da cadeia de polimerase
R	Reverse
s	segundo (s)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ST	tipo de sequência
PCV7	vacina pneumocócica heptavalente
V/cm	Voltagem por centímetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fatores de virulência	2
1.2. Epidemiologia.....	8
1.3. Vacina.....	13
1.4. Susceptibilidade aos antimicrobianos	17
1.5. Tipagem Molecular.....	24
1.6. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	24
1.7. Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE)	26
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 – Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Cepas bacterianas.....	29
3.2. Condições de armazenamento	29
3.3. Reação Sorotipagem pelo método de Quellung.....	30
3.4. Extração do DNA genômico	30
3.5. Tipagem Molecular.....	30
3.6. Eletroforese em gel de agarose	31
3.7. Multilocus Sequence Typing (MLST) – <i>S. pneumoniae</i>	38
3.7.1. Reação de PCR para MLST	38
3.7.2. Condições da PCR para MLST	39
3.8. Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE)	39
3.9. Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Amostras de <i>S. pneumoniae</i> isoladas de diferentes materiais clínicos.....	43
4.2. Padronização da sorotipagem por Multiplex PCR.....	43
4.3. Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> de acordo com a doença pneumocócica invasiva (DPI) e material biológico estudado durante o período de 2005 a 2011	46
4.4. Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> de acordo com o sexo.....	48
4.5. Distribuição dos sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> por faixa etária	48
4.6. Distribuição dos sorotipos por ano.....	50
4.7. Perfil de sensibilidade aos beta-lactâmicos de amostras de <i>S. pneumoniae</i>	53
4.7.1. Perfil de sensibilidade à penicilina	54
4.7.2. Perfil de sensibilidade à ceftriaxona	55
4.8. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	61
4.9. Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE)	61
5. Discussão.....	65
6. Conclusão	70

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....71

ANEXOS84

1. INTRODUÇÃO

Normalmente comensal, *Streptococcus pneumoniae* é um patógeno oportunista e uma importante causa de morbidade e mortalidade em humanos. Naturalmente competentes, *S. pneumoniae* possuem habilidade para adquirir um DNA externo e integrá-lo em seu cromossomo. Essa plasticidade genética possibilita uma grande flexibilidade que resulta em uma grande capacidade de adaptação às mudanças no meio ambiente (SILVA et al., 2006; CLAVERYS et al., 1999).

Foi isolado pela primeira vez em 1880 concomitantemente por Pasteur na França e Sternberg nos Estados Unidos da América (EUA). Desde sua descoberta até hoje muito já foi descrito da ecologia do *S. pneumoniae* na saúde e na doença. Estudos demonstraram que a colonização do trato respiratório humano acontece após um dia do nascimento e que uma criança pode ser colonizada simultaneamente por até quatro tipos capsulares diferentes e que, durante um período de vários anos, por um ou mais de 12 diferentes tipos capsulares. Em adultos saudáveis já foi observada a presença de um tipo capsular por um período de três anos (TOUMANEN, E.J.(Ed), 2004)

Em ágar sangue, apresenta colônia alfa-hemolítica com o centro côncavo e às vezes mucóide. Apresentam-se como cocos Gram-positivos isolados e aos pares, com morfologia afilada (“chama de vela”), catalase negativa, sensível a optoquina e bile-solubilidade positiva. Os métodos convencionais permitem identificar a maioria dos isolados, mas há relatos onde se observa *S. pneumoniae* produzindo reações atípicas para os testes padrões, incluindo cepas resistentes à optoquina e insolúvel a bile, assim um bom método de identificação é a combinação de ambos os testes (MUSHER, 2005).

S. pneumoniae é o principal agente de pneumonia bacteriana, bacteremia e meningite sendo causa de grande morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente em crianças, em idoso e em população com uma doença de base. *S. pneumoniae* é o principal agente de infecções de alta prevalência, como sinusite e otite média. É responsável por 30% a 50% de cada síndrome (PARADISI et al., 2001; TAI, 2006).

S. pneumoniae é uma das 10 principais causas de morte nos Estado Unidos, a meningite pneumocócica possui mortalidade em torno de 30%, e

aproximadamente de 30 a 60% dos sobreviventes apresentam sequelas (ENGELHARD et al., 1997; BOGAERT et al., 2004).

1.1. Fatores de virulência

O *S. pneumoniae* reside na mucosa do trato respiratório superior de humanos. Embora a colonização desse sítio seja assintomática, se o organismo acessa sítios normalmente estéreis causa rapidamente um processo inflamatório (KADIOGLU et al., 2008).

A patogenicidade do *S. pneumoniae* é atribuída a várias estruturas, a maioria situada em sua superfície. A alta morbidade e mortalidade atribuídas a esse microrganismo ainda não foram completamente elucidadas e a totalidade de seus fatores de virulência está longe de estar completa (VELASCO et al., 1995).

Cápsula Polissacarídica

Em 1910, Dochez e Avery detectaram a presença de uma substância solúvel tipo-específica encontrada em filtrado de cultura de *S. pneumoniae* e de urina de coelhos e humanos infectados. Essa substância solúvel era a cápsula polissacarídica (GARAU; CALBO, 2007).

A cápsula é a camada mais externa da célula de *S. pneumoniae* e tem aproximadamente de 200 a 400 nm de espessura. Exceto no sorotipo 3 e possivelmente em outros, a cápsula é covalentemente ligada à camada externa da parede celular de peptidoglicano (KADIOGLU et al., 2008).

A cápsula consiste de um polímero de alto peso molecular composto por unidades repetidas de oligossacarídeo, o qual contém de dois a oito monossacarídeos (VELASCO et al., 1995)

A cápsula modula a passagem de moléculas e íons para dentro da parede celular bacteriana, a aderência bacteriana, a superfícies orgânicas e inorgânicas bem como a formação de biofilmes e microcolônias (GARAU; CALBO, 2007). Este é o fator de virulência mais importante de *S. pneumoniae*, que permite a resistência à fagocitose e pode determinar a afinidade de *S. pneumoniae* ao epitélio pulmonar. A presença de anticorpos capsulares protege de doenças invasivas (GARAU; CALBO, 2007; PLETZ). Experimentos realizados comparando a letalidade de cepas

capsuladas e não capsuladas demonstraram que cepas capsuladas são pelo menos 100.000 vezes mais letais do que as não capsuladas (VELASCO et al., 1995).

A cápsula polissacarídica de *S. pneumoniae* é utilizada para definir os mais de 90 sorotipos diferentes (CHIOU et al., 2008). A estrutura química da cápsula polissacarídica e sua espessura determinam as diferentes habilidades dos sorotipos em sobreviver na corrente sanguínea e causar doença invasiva (VELASCO et al., 1995). *S. pneumoniae* de diferentes tipos capsulares diferem em sua capacidade de causar doença, possivelmente reflexo da capacidade de resistir a fagocitose bem como diferenças em sua habilidade de induzir a resposta imune humoral (KADIOGLU et al., 2008).

Existem sorotipos que são mais predominantes colonizadores em crianças o 6, 23 e 19, um das explicações para isso é que o sistema imune das crianças é muito lento para a produção de uma resposta imune quando comparado com outros tipos capsulares. Esses sorotipos também permanecem por um período de tempo maior como colonizadores (FREIKIN ; KLUGMAN, 2001).

Muitos estudos exploram a relação entre os sorotipos e a mortalidade em doença pneumocócica invasiva. Os autores Austrian e Gold (1977) fizeram um estudo correlacionando o sorotipo pneumocócico com: idade, doença pré-existente e extensão da doença pulmonar com mortalidade por bacteremia por *S. pneumoniae*. Eles observaram que a mortalidade devido a diferentes sorotipos variavam consideravelmente (GARAU; CALBO, 2007).

Sjöström e colaboradores (2006) realizaram um estudo de meta-análise em 494 adultos de sete diferentes países e concluíram que certos sorotipos como o sorotipo 1 e o 7F estão estreitamente relacionados com doença invasiva e raramente são isolados como colonizadores, porém apresentam uma taxa baixa de mortalidade. Entretanto os sorotipos 3, 6B e 19F, que são predominantemente associados à colonização, são associados a uma alta mortalidade. A explicação para essa diferença é que os sorotipos 1 e 7F possuem capacidade de invadir e causar doença em um indivíduo saudável, não sendo comum a presença de uma doença de base anterior à infecção pneumocócica; já os sorotipos 3, 6B e 19F por serem oportunistas, estão muito mais associados a uma doença prévia, explicando assim as altas taxas de mortalidade associadas a esses sorotipos.

Parede celular

Em contraste com a cápsula polissacarídica, o peptidoglicano purificado da parede celular é um potente indutor de inflamação (CATTERALL, 1999). O peptidoglicano ativa a via alternativa do complemento que leva a um aumento na permeabilidade vascular, degranulação de mastócitos e ativação dos leucócitos polimorfonucleares no sítio da inflamação. Além disso, a parede celular purificada é um potente promotor da interleucina 1 em monócitos humanos que, juntamente com o fator de necrose tumoral, são essenciais para a ocorrência do processo inflamatório (VELASCO et al., 1995). Os componentes da parede celular iniciam a cascata de procoagulação, estimulam a produção de fator ativador de plaquetas (PAF), causam dano direto nos neurônios e alteram o fluxo cerebral sanguíneo e a pressão de perfusão vascular. Os componentes da parede celular liberados pela degradação enzimática são fatores quimiotáticos mais potentes que a parede celular intacta, isso é importante no uso de antibiótico. O ácido teicóico da parede celular aumenta a atividade inflamatória. A presença de fosforilcolina no ácido teicóico é incomum e importante pois é um determinante crítico na bioatividade do PAF (TUOMANEN et al., 2006).

Pneumolisinas

Essa proteína encontrada praticamente em todos os isolados de *S. pneumoniae*, é uma sequência de aminoácidos bem conservada, embora pequenas variações já tenham sido descritas. Pertence à família de citolisinas dependentes de colesterol que são sintetizadas pelas bactérias Gram-positivas (KADIOGLU et al., 2008).

Dentre as proteínas pneumocócicas, a pneumolisina é a mais importante e apresenta funções distintas que intensificam a virulência da cepa de *S. pneumoniae* no início da patogênese da infecção pneumocócica invasiva (RUBINS; JANOFF, 1997).

É uma proteína intracelular que pertence à família de toxinas tiol-ativadas e produz uma série de efeitos tóxicos em diferentes tipos de células. Embora não seja secretada, é liberada quando ocorre a lise das células de *S. pneumoniae* por ação da autolisina (VELASCO et al., 1995).

Pneumolisina é a principal citotoxina formadora de poro que possui a capacidade de romper a barreira mecânica das células epiteliais do trato respiratório. O movimento ciliar das células epiteliais brônquicas representa o principal mecanismo de defesa do hospedeiro; quando ocorre uma aspiração de material do trato respiratório superior, a pneumolisina afeta esse movimento e por consequência a remoção mecânica das bactérias das células brônquicas aumentam a aderência intercelular pneumocócica e rompem o epitélio brônquico, promovendo a propagação da bactéria no trato respiratório inferior (RUBINS; JANOFF, 1997).

A pneumolisina é responsável pelos danos cerebrais causados na meningite pneumocócica. Estudos mostraram que a concentração de pneumolisina aumenta no líquido cefalorraquidiano (LCR) dependendo do antibiótico utilizado. Antibiótico bactericida, como a ceftriaxona, aumenta muito mais a concentração de pneumolisina do que a rifampicina que não é bactericida. (MITCHELL, A; MITCHELL, T, 2010).

Proteína pneumocócica A de superfície (PspA)

A PspA é uma proteína de superfície, expressa em todos os sorotipos clínicos importantes de *S. pneumoniae* e possui um significativo potencial de proteção imunológica. A perda dessa proteína atenua a virulência. PspA se liga à lactoferrina, protegendo assim a bactéria do efeito bactericida da apolactoferrina. (BERGMANN & HAMMERSCHMIDT, 2006).

Esse importante fator de virulência influencia a interação bactéria-hospedeiro através da interferência na fixação do complemento C3. Modelos em ratos demonstraram o poder de proteção dos anticorpos anti-PspA tornando esse um alvo para o desenvolvimento de futuras vacinas (HOLLINGSHEAD et al., 2000).

Proteína pneumocócica C de superfície (PspC)

PspC é encontrada em aproximadamente 75% das cepas de *Streptococcus pneumoniae* (BALACHANDRAN et al., 2002).

Essa molécula também é conhecida como CbpA ou SpsA dependendo da sua função de ligamento com as células epiteliais e/ou imunoglobulina A (IgA), respectivamente. PspC atua como adesina de superfície de célula e desempenha

um importante papel na colonização da nasofaringe (BROOKS-WALTER et al., 1999).

Autolisina (LytA)

A autolisina pneumocócica é uma enzima chamada de N-acetilmuramoil-L-alanina amidase também conhecida como amidase LytA. É composta por dois domínios funcionais, o domínio amino responsável pela atividade catalítica da proteína e o domínio carboxil que contém a ligadora de colina responsável pela ligação da proteína à parede celular. LytA degrada o peptidoglicano presente na parede celular da bactéria e parece estar envolvida no crescimento celular participando da divisão bacteriana em duas células filhas. Essa atividade autolítica está presente em todas as cepas de *S. pneumoniae* e é refletida fenotipicamente pela chanfradura no centro da colônia (TAI, 2006).

A LytA parece mediar liberação da pneumolisina do citoplasma de *S. pneumoniae*. Estudos recentes demonstraram que a autolisina é alvo da lisozima, que é um fator de defesa que atua no processo de infecção e inflamação, entretanto a lisozima induz a lise pneumocócica que leva a um aumento da infecção e inflamação (VELASCO et al., 1995).

Neuroamidase

É uma enzima que cliva o ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico) da mucina, glicoproteínas ou glicolipídios na superfície das células eucarióticas (TAI, 2006).

Causa danos diretos no hospedeiro e observou-se que a perda do ácido siálico, que é resultado da atividade da neuramidase, é acompanhada de uma vantagem de *S. pneumoniae* no tubo de Eustáquio no ouvido médio. A principal atividade da neuroamidase é na colonização e no desenvolvimento de otite média, mas parece não ter influência na meningite (MITCHELL, A; MITCHELL, T, 2010).

Hialuronidase

S. pneumoniae produz a enzima hialuronidase a qual degrada o ácido hialurônico, que é um componente do tecido conectivo. A hialuronidase possibilita

maior acesso do microrganismo e pode atuar na translocação de *S. pneumoniae* entre tecidos, por exemplo do pulmão para o sangue . Assim como possui um papel na integridade do tecido, o ácido hialurônico atua também na resposta inflamatória. Produtos da hialuronidase podem também afetar a resposta no pulmão (MITCHELL, 2000).

Pilus

A presença do pilus na superfície da célula pneumocócica foi observada a primeira vez em 2006, por Barocchi e colaboradores e é decodificado em uma ilha de patogenicidade chamada ilha *rlrA* (PI-1), que compreende sete genes. Bagnoli e colaboradores (2008) demonstraram uma região genômica chamada de PI-2 que é o segundo pilus funcional no *S. pneumoniae*.

Segundo pesquisadores, o pilus P1-I demonstrou participar da invasão pulmonar especificamente pela aderência às células epiteliais, mas não aderiu ao epitélio da nasofaringe (ROSCH et., 2008).

O PI-2 participa da aderência de *S. pneumoniae* às células da nasofaringe, sendo que algumas células são capazes de expressar os dois pilus (MITCHELL, A; MITCHELL, T, 2010).

Além da adesão, o pilus pneumocócico induz uma resposta inflamatória pela produção do fator de necrose tumoral (TNF) (BAROCCHI et al., 2006).

Em um estudo realizado nos EUA, 590 cepas de *S. pneumoniae*, isoladas no período de 1994 a 2006, foram analisadas para identificar a presença da ilha de patogenicidade PI-2, a qual foi detectada em 21% dos isolados (ZÄHNER et al., 2010).

A interação dos diferentes fatores de virulência e como esses diversos fatores atuam em um hospedeiro é um processo muito complexo. Talvez os fatores de virulência devam ser divididos em dois grupos distintos: um com os fatores presentes na superfície intacta de *S. pneumoniae* que tem a capacidade de iniciar uma infecção, principalmente por inibir a fagocitose via inibição do complemento; o segundo seria a partir da lise do *S. pneumoniae* com a ativação do complemento levando à inflamação (GARAU; CALBO, 2007).

Assim a cápsula seria o principal fator de virulência do início da infecção atuando na lesão pulmonar inicial e invasão da corrente sanguínea. A partir desse ponto, os outros fatores que geram uma resposta inflamatória seriam responsáveis pela gravidade da doença e a evolução clínica do paciente (GARAU; CALBO, 2007).

Alanee e colaboradores (2007) detectaram que em pacientes com bacteremia, a evolução da infecção pneumocócica dependia muito mais da resposta do paciente do que do sorotipo da bactéria, o que sugere que nesse estágio da infecção, o preditivo da mortalidade deixa de ser o sorotipo e passa a ser as condições do hospedeiro e os outros fatores de virulência.

1.2. Epidemiologia

Para causar doença um patógeno necessita de uma série de requerimentos básicos. Primeiro, precisa habilidade para aderir na superfície da mucosa e competir com a flora presente nesse sítio. Após a aderência, o microrganismo necessita invadir o hospedeiro e replicar. Para sobreviver nesse ambiente hostil é necessário obter nutrientes e escapar do sistema imune do hospedeiro que é ativado pela presença da bactéria, além disso para ser considerado um patógeno é necessário causar dano ao hospedeiro (MITCHELL, 2000).

Assim como outros microrganismos, *S. pneumoniae* coloniza a nasofaringe de 5% a 10% dos adultos saudáveis e de 40% a 60% de crianças saudáveis. A colonização é sazonal com um aumento no inverno, embora *S. pneumoniae* possa ser isolado em crianças e adultos saudáveis durante todo o ano. A taxa de colonização é maior em crianças, principalmente nos primeiros anos de vida. Em adultos, os fatores de risco da colonização pneumocócica incluem fumo, asma e infecções agudas do trato respiratório superior (MUSHER, 2005).

A principal via transmissão pneumocócica é da criança para os familiares e essa é a principal causa da colonização da nasofaringe e da doença pneumocócica invasiva (DPI) (LYNCH III; ZHANEL, 2010).

A colonização nasofaríngea pneumocócica, varia de acordo com a idade, com a região geográfica, com a densidade populacional, com as condições sanitárias, e com o tamanho da família (SCHRAG et al., 2000).

A incidência de DPI é maior nos extremos da vida (menores de dois anos de vida e maiores de 65 anos), em indivíduos com comorbidades ou imunodeficientes,

e no inverno. Surtos de DPI ocorrem em ambientes com aglomeração de pessoas como escolas, creches, acampamentos militares, prisões, hospitais, e em comunidades fechadas. Diferenças regionais e étnicas de DPI foram observadas globalmente. Crianças de países em desenvolvimento apresentam maior risco e maiores taxas de mortalidade para as infecções pneumocócicas. Em pessoas imunocompetentes, a incidência de DPI está associada a fatores de comorbidade como: abuso de álcool, insuficiência cardíaca congestiva, infecção recente por influenza, diabetes mellitus, asma, institucionalização e exposição à fumaça do cigarro (LYNCH III; ZHANEL, 2010).

O mecanismo pelo qual *S. pneumoniae* migra da nasofaringe para o pulmão, podendo causar pneumonia, ou acessa diretamente a corrente sanguínea levando à bacteremia, septicemia, é muito pouco compreendido. Muitas infecções não ocorrem após um longo período de colonização, mas acontecem logo após a aquisição de um novo sorotipo. Isso sugere que o sistema imune do paciente e a virulência de determinada cepa no momento da colonização, determinará se *S. pneumoniae* permanecerá na nasofaringe ou causará uma doença (VELASCO et al., 1995).

Para ocorrer a conversão de uma colonização assintomática para uma infecção é necessária a produção de fatores de inflamação como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral, como é observado na infecção viral. Essa cascata inflamatória altera o número e tipo de receptores nas células epiteliais e endoteliais. A colina presente na parede celular demonstra um aumento de afinidade para esses receptores que aumentaram de número, o fator ativador de plaquetas (PAF). A ligação com esses receptores induz à internalização de *S. pneumoniae* e promove a migração transcelular, através do epitélio respiratório e do endotélio vascular (BOGAERT et al., 2004). A partir do sangue, o microrganismo pode migrar para as meninges e atingir o espaço sub-aracnóide, Alternativamente, pode acessar a meninge por outras rotas, assim como diretamente da nasofaringe (VELASCO et al., 1995).

A função da protease IgA é aumentar a aderência de *S. pneumoniae* nas células epiteliais pulmonares, isso ocorre por uma ação enzimática, que resulta em uma alteração na carga da superfície celular aumentando a proximidade física entre a colina da parede celular de *S. pneumoniae* com o receptor do fator ativador de plaquetas. Além disso, a proteína A ligadora de colina se liga à porção secretória do

IgA e interage com a via do complemento, interferindo na resposta imune do hospedeiro (BOGAERT *et al.*, 2004).

A livre multiplicação de *S. pneumoniae* nos pulmões, meninges, e ouvido médio resultará na lise pneumocócica, e conseqüentemente na liberação de pneumolisina. A presença de lisozima no sítio da infecção pode contribuir para a lise de *S. pneumoniae* por ativação da autolisina. A lise pneumocócica torna-se um alvo do processo inflamatório, diretamente por atrair e ativar fagócitos e indiretamente pela ativação do complemento. Acredita-se que o processo inflamatório seja responsável pela morbidade e mortalidade das infecções pneumocócicas, isso pode ocorrer pelo fato de que a eliminação de *S. pneumoniae* do sítio de infecção pela antibioticoterapia frequentemente não melhora o curso ou o resultado da doença pneumocócica, pois o efeito bactericida do antibiótico leva à lise do microrganismo (principalmente quando administrado em estados avançados da doença) podendo intensificar o efeito nocivo da doença pneumocócica (VELASCO *et al.*, 1995).

S. pneumoniae são divididos em mais de 90 sorotipos, os quais são definidos por diferenças imunoquímicas de suas cápsulas polissacarídicas. Muitos desses sorotipos são raramente isolados de infecções sérias, aproximadamente 15 sorotipos são responsáveis pela maioria das doenças invasivas (BRUEGGEMANN *et al.*, 2003).

Pelo sistema de numeração norte-americano, os sorotipos são numerados de 1 a 90 na ordem em que foram identificados. A classificação mais amplamente aceita é o sistema de numeração Danish, que distingue grupos de sorotipos de acordo com similaridade antigênica. Por exemplo, pelo sistema de Danish o sorogrupo 19 inclui sorotipos 19F, 19A, 19B e 19C (a letra F indica o primeiro membro do grupo a ser identificado, seguido por A, B, C, etc) o qual no sistema norte-americano seria 19, 57, 58 e 59 respectivamente. Os sorotipos que mais frequentemente causam doenças em seres humanos foram os primeiros a ser identificados, portanto os primeiros a receber um número, o que explica porque os sorotipos de números mais baixos são geralmente os relacionados com doenças humanas. A sorotipagem foi clinicamente relevante na década de 1930 quando anti-soro foi administrado para terapia, mas tem pequena relevância clínica em casos isolados. Contudo, é de grande interesse atualmente na epidemiologia e na saúde pública, pois formulações de vacinas conjugadas de cápsula polissacarídica

pneumocócica são baseadas na prevalência de sorotipos específico da população alvo (MUSHER, 2005).

Atualmente foram documentados 46 sorogrupos e 93 sorotipos, os últimos sorotipos descobertos foram os 6C (PARK et al., 2007), 6D (JIM et al., 2009), e 11E (CALIX; NAHM, 2010), cujas cápsulas polissacarídicas são altamente imunogênicas e são o principal alvo para vacinas pneumocócicas (GLADSTONE et al., 2011).

Diferentes sorotipos possuem propriedades epidemiológicas distintas. Alguns sorotipos são mais associados à colonização da nasofaringe, outros sorotipos raramente são isolados como colonizadores e são normalmente isolados de doenças invasivas. Outros sorotipos possuem uma importância desproporcional em crianças recém-nascidas, em jovens, em imunocomprometidos, ou em idosos. Alguns sorotipos estão associados a um tipo de síndrome particular, como pneumonias em crianças, ou altas taxas de hospitalização em crianças, ou mortalidade em idosos (HAUSDORFF et al., 2005).

Recentes estudos estimam que ocorram 1,6 milhões de mortes causadas por *S. pneumoniae* no mundo por ano. No ano de 2000, ocorreram aproximadamente 14,5 milhões de episódios sérios da doença pneumocócica levando a 826.000 mortes em crianças menores de 5 anos, 61% (440.000) dessas mortes ocorreram nos continentes africano e asiático. De todas as pneumonias que ocorrem nesses países, 7% a 13%, ou aproximadamente 11 a 20 milhões de casos, são severos e necessitam de internação (O'BRIEN et al., 2009; SCHRANZ, 2009; SARTORI et al., 2010).

A incidência de doença pneumocócica em crianças nos EUA e Europa é de 8 a 75 casos em 100.000 habitantes por ano. Já em países em desenvolvimento essa incidência é bem maior, variando entre 100 até mais de 500 casos por 100.000 habitantes. Em populações como os índios navajos americanos, os aborígenes australianos e os nascidos no Alaska essas taxas podem chegar a mais de 1.000 casos por 100.000 habitantes por ano (BRUEGGEMANN et al., 2004).

Em Barcelona, um estudo realizado de 1997 a 2000, obteve o seguinte resultado na epidemiologia de *S. pneumoniae* em crianças: a incidência de *S. pneumoniae* invasivo foi de 76 por 100.000 crianças de 0 a 24 meses de idade; 45 para crianças de 0 a 48 meses e 16,6 para crianças de 0 a 14 anos. Bacteremia foi a manifestação mais frequente da doença pneumocócica invasiva, pneumonia a segunda e meningite a terceira (PINEDA et al., 2002).

Nos Estados Unidos da América (EUA) em 2000, *S. pneumoniae* causou aproximadamente 17.000 casos de doença invasiva em crianças menores de 5 anos, incluindo 700 casos de meningite (PAI et al., 2006).

Em um estudo realizado no Brasil, no período de 2004 a 2005, a doença pneumocócica foi responsável por 34.217 hospitalizações no Sistema Único de Saúde (SUS) o que corresponde a 0,1% de todas as hospitalizações. Dessas hospitalizações, 64,8% foi por pneumonia pneumocócica. Criança menor de 1 ano foi a faixa etária mais frequente e a letalidade foi maior entre os idosos (NOVAES et al., 2011).

Em 2008, segundo o Boletim da Organização Mundial de Saúde, o Brasil está entre os 15 países com maior incidência de pneumonia com 1,8 milhões de casos por ano. Em crianças até cinco anos de idade, *S pneumoniae* é o principal agente de pneumonia bacteriana (YOSHIOKA et al., 2011).

Os dez países com maior número de mortes por doença pneumocócica por ano em crianças até cinco anos são: Índia (142.000), Nigéria (86.000), Etiópia (57.000), República Democrática do Congo (51.000), Afeganistão (31.000), China (30.000), Paquistão (27.000), Bangladesh (21.000), Angola (20.000) e Uganda (19.000). No Brasil estima-se que morram de 10 a 100 crianças menores de cinco anos por 100.000 crianças menores de cinco anos (O'BRIEN et al., 2009)

Um conceito que precisa ser esclarecido é que a capacidade de invasão não equivale a virulência (letalidade), pois as cepas menos invasivas quando causam doença é por falha do sistema imune do hospedeiro como ocorre em crianças muito jovens, em idosos e pacientes com o sistema imune comprometido, ou ainda pacientes com uma doença prévia. Nesse tipo de paciente é que essas cepas oportunistas causam o maior número de casos fatais. Já os sorotipos mais invasivos são normalmente isolados de pacientes jovens e imunocompetentes e apresentam baixa taxa de mortalidade (PLETZ et al., 2010).

Em concordância com o estudo de Pletz (2010), Bruggemann e colaboradores (2004) realizaram um estudo de meta-análise comparando 7 estudos de diferentes países e observaram que os sorotipos 1 e 7F são isolados, na maioria das vezes, em doenças e raramente isolados como colonizadores, enquanto os sorotipos 19F e 23F são, na maioria das vezes, isolados como colonizadores.

Os sorotipos 3, 6B e 19F estão mais associados à mortalidade (25%), em comparação à mortalidade associada a infecções causadas pelos sorotipos 1 e 7F (SJÖSTRÖM et al., 2005).

Mundialmente 20 sorotipos são responsáveis por 80% das DPI: 14, 4, 1, 6A, 6B, 3, 8, 7F, 23B, 23F, 18C, 19F, e 9V. Em crianças os sorogrupos são mais limitados e os predominantes são: 6, 14, 18, 19, e 23. A distribuição dos sorotipos varia de acordo com a região e os sorotipos 1 e 5 são comuns em países em desenvolvimento, e raros nos EUA e Europa. (LYNCH III; ZHANEL, 2010).

A cápsula é o alvo para imunidade protetora induzida pela vacina conjugada, e a escolha dos sorotipos presentes na vacina foi realizada com base na frequência que causam DPI. Entretanto, estudos demonstraram que o sorotipo mais frequentemente isolado pode ser que seja, não por sua capacidade de invadir, e sim pela alta frequência como colonizador. Em contrapartida, existem sorotipos que dificilmente são isolados como colonizadores e são capazes de causar doença logo após a sua aquisição, e como não são muito frequentes na população possuem uma baixa frequência de isolamento, sendo erroneamente classificado como menos invasivos (BRUEGGEMANN et al., 2004).

1.3. Vacina

Para controlar a doença pneumocócica foi introduzida há 25 anos a vacina polissacarídica 23 valente (PPV, Pneumovax: Merck), que é utilizada até hoje em adultos de alto risco e idosos. Em estudo recente realizado na Inglaterra, demonstrou que essa vacina não foi eficiente para idosos. Além disso, esse tipo de vacina, por requisitar uma resposta imune independente das células T não tem resposta em crianças menores de 2 anos (GLADSTONE et al., 2011; RIJKERS et al., 2010).

Para as vacinas se tornarem eficientes para crianças menores de 2 anos, que possuem as células B imaturas, os polissacarídeos foram quimicamente ligados às proteínas e dessa forma foram criadas as vacinas conjugada 7 à 13 valente com os sorotipos mais prevalentes. Esses conjugados ativam a célula T possibilitando a produção de anticorpos e estimulando a memória imunológica. Em 2000 foi introduzida nos EUA a vacina pneumocócica heptavalente (PCV7 Prevnar® Wyeth Pharmaceuticals, Maidenhead, Reino Unido) contemplando os sorotipos 4, 6B,

9V, 14, 18C, 19F e 23F no programa de imunização infantil (HAUSDORFF et al., 2005). Nessa vacina, os sorotipos capsulares são conjugados individualmente à proteína não tóxica CRM₁₉₇, produzida por mutante de *Corynebacterium diphtheriae* (MANTESE et al., 2009).

Uma revisão realizada com mais de 70 estudos concluiu que 10 sorogrupos causam a maioria das doenças pneumocócicas invasivas. Essa análise demonstrou que ocorrem variações nas proporções dos sorotipos que estão cobertos pela PCV7. Em crianças, a maior cobertura (80-90%), é observada nos EUA, Canada e Austrália, seguido pela Europa e África com (70-75%), América Latina (65%) e então a Ásia com aproximadamente 50% (HAUSDORFF et al., 2005).

Houve a necessidade de vacinas com maior cobertura para sorotipos que causam a doença pneumocócica. Atualmente existem duas novas vacinas para *S. pneumoniae*, a 10 valente (Synflorix, GlaxoSmithKline Biological, Rixensart, Bélgica) e a 13 valente (Prevenar 13, Wyeth Pharmaceuticeuticals, Maidenhead, Reino Unido). A vacina 10 valente cobre todos os sorotipos da 7 valente com acréscimo dos sorotipos: 1, 5 e 7F e foi introduzida em 2010 no Programa Nacional de Imunização no Brasil para crianças até 2 anos de idade, como demonstrado na tabela 1. A vacina 13 valente amplia a cobertura para os sorotipos: 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A (YOSHIOKA *et al.*, 2011). A vacina 10 valente é constituída de três diferentes carreadores: proteína D do *Haemophilus influenzae* não tipável (que se liga individualmente ao policassacarídeo capsular dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F), o toxóide tetânico (que liga ao 18C) e o toxóide diftérico (que liga o sorotipo 19F). Devido à inclusão da proteína D do *Haemophilus influenzae* não tipável, espera-se que ocorra proteção contra essa bactéria. A vacina 13 valente é constituída pela proteína carreadora CRM₁₉₇ (MANTESE et al., 2009).

Tabela 1- Sorotipos incluídos nas vacinas conjugadas pneumocócicas

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

No Brasil, a PCV7 foi introduzida no sistema de saúde a partir de 2004, mas apenas para crianças com menos de 5 anos e com alto risco de doença pneumocócica. Essa estratégia resultou em um baixo índice de vacinação, sendo que menos de 5% das crianças menores de 12 meses haviam sido vacinadas em 2009 (SARTORI et al., 2010).

Após a introdução da PCV 7 nos EUA, ocorreu uma redução significativa da doença pneumocócica. Com a vacinação com a vacina PCV 7 foi observada a diminuição drástica dos sorotipos vacinais (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) tanto na população de crianças que recebeu a vacina, como no grupo que não recebeu a vacina, o que resultou em grande benefício para saúde pública (WEINBERGER et al., 2011).

Antes da introdução generalizada da vacina pneumocócica heptavalente em crianças menores de 2 anos nos EUA em 2000 e na Europa em 2001, sete sorotipos vacinais (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) eram responsáveis por 80% da doença pneumocócica invasiva (DPI), incluindo bacteremia, meningite e pneumonia nos EUA e responsáveis por 89% dos isolados resistentes à penicilina. Na Europa, esses sorotipos eram responsáveis por 72% das DPI em crianças menores de 2 anos. Quando os sorotipos 6B e 19F foram selecionados para a vacina PCV 7 acreditava-se que os anticorpos produzidos para esses sorotipos apresentariam reação cruzada para os sorotipos 6A e 19A respectivamente (REINERT et al., 2010).

Após a introdução da vacina heptavalente em larga escala nos EUA, o sorotipo 19A tornou-se a principal causa de pneumonia pneumocócica. Esse fato foi uma surpresa pois, até o momento, prevalecia o paradigma que sorotipos de um mesmo sorogrupo conferiam proteção cruzada. Nos EUA, antes da introdução da PCV 7, o sorotipo 19A não era o oitavo sorotipo mais prevalente e sim o décimo oitavo (RIJKERS et al., 2010).

Vários autores relatam a abrupta diminuição das DPI causadas pelos sorotipos vacinais, e essa diminuição ocorre rapidamente após a introdução da vacinação, não apenas no público vacinado, nesse caso crianças, mas em todas as faixas etárias (GREENBERG, 2009; BRUEGGEMANN, 2007; HO, 2011).

Greenberg, em 2009 observou um aumento significativo no número de casos de DPI ocasionados por sorotipos não vacinais em adultos com idade entre 16 a 64 anos. Foi observado a introdução de novos sorotipos que pode ocorrer de dois modos distintos. O primeiro mecanismo é pela introdução de sorotipos com alto

potencial de causar doenças, que não competem com os sorotipos endêmicos incluídos na vacina, pelo mesmo nicho (nasofaringe). Os sorotipos 1 e 5 possuem alto potencial de causar otite média e DPI (GREENBERG, 2009).

O outro mecanismo é o aumento de sorotipos endêmicos não vacinais chamado de “fenômeno de substituição”, em alguns países o principal sorotipo que surgiu após a introdução da vacina PVC 7 foi o 19A (GREENBERG, 2009).

O fenômeno da substituição pode ocorrer de duas maneiras; uma seria a simples diminuição de um sorotipo presente na vacina seguida pelo aumento de um sorotipo não presente na vacina. O outro mecanismo, muito mais complexo, é a comutação capsular que ocorre quando genes que codificam para um tipo capsular são trocados, via transformação ou recombinação, por genes que codificam um tipo capsular diferente (BRUEGGEMANN et al., 2007).

Algumas características do sorotipo 19A podem ter sido responsáveis pelo sucesso desse sorotipo após a introdução da PVC7. Primeiro, o 19A tem, relativamente, grande propensão a colonizar a nasofaringe, maximizando a transmissão, e causar doença invasiva. Segundo, o sorotipo 19A está associado com resistência antimicrobiana, principalmente os antibióticos utilizados para as infecções do trato respiratório superior, e leva vantagem sobre outros sorotipos mais sensíveis quando exposto a esses agentes (MOORE, 2009).

Tarragó e colaboradores (2011) acreditam que a expansão do sorotipo 19A é multifatorial, e se baseia na resistência aos antimicrobianos, na ausência deste sorotipo na vacina PVC7, na sua capacidade de causar doença invasiva, na otite média e na colonização nasofaríngea, contribuindo para a comutação capsular. Todos esses fatores contribuíram para a diversidade genética desse sorotipo, providenciando vantagens na sobrevivência e tornando esse sorotipo o mais prevalente entre os isolados invasivos,

Como a perda da sensibilidade à penicilina está relacionada com os sorotipos e os sorotipos mais resistentes estão presentes na PCV7, foi observado que entre 1999 e 2001 a taxa de doenças causadas por cepas não sensíveis à penicilina diminuíram 35% (WHITNEY et al., 2003).

1.4. Susceptibilidade aos antimicrobianos

Beta-lactâmicos

O primeiro isolado clínico de *S. pneumoniae* resistente à penicilina foi em 1967 em Papua, Nova Guiné. Entre 1967 a 1977, esporádicos isolados clínicos resistentes à penicilina foram publicados em várias partes do mundo. O primeiro surto de *S. pneumoniae* resistente à penicilina aconteceu em 1977 na África do Sul (TOMASZ, 1997).

A resistência à penicilina ocorre devido a uma alteração nos genes que decodificam proteínas de alto peso molecular chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBP) (SMITH et al., 1993).

Na célula de *S. pneumoniae* existem seis PBPs: PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b, PBP2x, e PBP3 das quais PBP2x e PBP2b são essenciais para o crescimento celular por participarem da síntese da parede celular. Os genes *pbp* possuem uma estrutura de mosaico que pode sofrer recombinações inter e intraespécies (TRZCINSKI et al., 2004).

A clonalidade da resistência à penicilina foi confirmada e expandida mecanicamente pelas investigações realizadas no laboratório de Brian Spratt e foi no laboratório de Regine Hakenbeck, que clonou muitas vezes os determinantes genéticos das PBPs e reconheceu a natureza “mosaico única nos genes PBPs das cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina (TOMASZ, 1997).

O termo “mosaico” é referente à presença de sequências de nucleotídeos no gene PBP que parecem ser heterogêneas, ou seja, de natureza não pneumocócica. A explicação mais razoável para esse tipo de diversidade é que a cepa de *S. pneumoniae* importa sequências heterólogas de DNA e essas sequências são inseridas nos genes da PBP através de recombinações. É provável que a maioria das propriedades pleomórficas observadas em cepas de *S. pneumoniae* resistente a penicilina sejam consequência dos genes mosaicos (TOMASZ, 1997).

Os antibióticos beta-lactâmicos tem como alvo as PBPs, o antimicrobiano se liga à PBP exercendo assim a atividade antimicrobiana. Mudanças nas PBPs resultando em uma afinidade reduzida entre o alvo e seus antibióticos respectivos, isso resulta na necessidade de uma grande concentração de antibiótico para que

haja a ligação com a PBP e a sua inativação. As alterações nas PBPs ocorrem como resultado de dois processos: mutação cromossomal e transformação. No processo de transformação *S. pneumoniae* e os outros estreptococos orais como, *S. mitis*, trocam informações genéticas. A alteração de PBP acarreta um aumento da CIM gradual de sensível para intermediário e depois para resistente. Existe um limite na alteração das PBPs, pois elas precisam manter suas funções para que o microrganismo sobreviva (SMITH et al., 2001; MANDELL, 2005).

A produção de PBP com baixa afinidade à penicilina, apesar de essencial não é suficiente para proteger *S. pneumoniae* contra a ação inibitória da penicilina. A resistência à penicilina requer a presença de uma proteína recentemente identificada, a MurM que junto com a MurN está envolvida na síntese de ramos peptídeos curtos na parede celular pneumocócica. Os pesquisadores observaram que a inativação de um pequeno operon *murMN* que é o determinante das enzimas de parede celular MurM e MurN, resultou não apenas na eliminação das pontes cruzadas da parede celular de *S. pneumoniae* mas também na perda completa da resistência à penicilina sem afetar o crescimento bacteriano. Esse efeito poderia ser utilizado associando inibidores de MurM como um potente sinergista da ação da penicilina (FISER et al., 2003)

Para uma cepa ser resistente aos beta-lactâmicos é necessário que haja pelo menos uma alteração ou na PBP2x ou na PBP2b. Modificações que acarretem uma baixa afinidade a PBP2x já são suficientes para a bactéria começar a se tornar não sensível a cefalosporinas e à penicilina. A resistência à penicilina necessita modificação em pelo menos na PBP1a e na PBP2x. A presença das formas modificadas de PBP2b, PBP2a e MurM aumentam o nível de resistência aos beta-lactâmicos (TRZCINSKI et al., 2004).

Diferentes beta-lactâmicos apresentam diferentes afinidades com as PBPs. Assim as mutações que reduzem a sensibilidade a um beta-lactâmico não obrigatoriamente afetam a afinidade com outro (GREBE & HAKENBECK, 1996). Muitos estudos correlacionam a resistência à penicilina com determinados sorotipos, o locus que codifica a cápsula, o *cps* de *S. pneumoniae* é flanqueado pelos genes *pbp2x* e *pbp1a*, que decodificam as PBPs. Essa proximidade permite que a transformação que provoca a resistência a beta-lactâmicos possa também levar a uma alteração de tipo capsular. Com o objetivo de verificar essa possibilidade, o pesquisador Krzysztof Trzcinski e colaboradores, em 2004, realizaram em uma só

etapa a transformação de uma cepa TIGR4 sensível à penicilina em uma cepa de *S. pneumoniae* 19F resistente à penicilina. O êxito nesse experimento sugere que na seleção natural realizada pelo sistema imune do hospedeiro e a pressão seletiva exercida pelo uso de antibiótico beta-lactâmico possa levar a essa transformação pela proximidade que há entre o determinante de resistência e o locus que codifica o tipo capsular.

Em 1993, com a participação de seis países (entre eles, o Brasil) foi criado o Projeto Sistema Regional de Vacinas (SIREVA) pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) com o objetivo de monitorar o padrão de resistência aos antimicrobianos e os sorotipos de *S. pneumoniae* na América Latina. A partir de 2004, o programa foi ampliado estudando além de *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* e aumentando os países participantes (número atual de 20), passando a ser designado SIREVA II. É um programa de vigilância laboratorial onde são contabilizadas e descritos os sorotipos e os padrões de resistência dessas cepas (MANTESE et al., 2009).

Foram analisadas 6470 cepas de *S. pneumoniae* em um estudo realizado pelo Projeto SIREVA entre 1993 e 2004, das quais 19,1% com diagnóstico de pneumonia e verificou-se que as cepas resistentes à penicilina aumentaram de 10,2 para 27,9%(BRANDILEONE et al.,2006).

No estudo realizado pelo Projeto SIREVA II foram analisadas 8993 cepas de *S. pneumoniae* isolados de crianças menores de seis anos com infecções invasivas de 10 países da América Latina e Caribe entre os anos de 2000 e 2005, das quais 3277 (36,4%) eram de pneumonia, 3213 (35,7%) de meningite, 2155 (24%) de sepsis e bacteremia e 348 (3,9%) de outras enfermidades. Verificou-se que 22,1% das cepas foram intermediárias e 15,7% resistentes à penicilina (AGUDELO et al., 2009).

Os pontos de corte da concentração inibitória mínima (CIM) para penicilina foram estabelecidos no final dos anos 1970 pois havia a necessidade de se assegurar o sucesso no tratamento da meningite pneumocócica. O aumento da CIM da penicilina para as cepas de *S. pneumoniae* foi observado nas últimas três décadas e com isso cresceu a porcentagem de cepas com sensibilidade intermediária e resistentes à penicilina. Esse aumento resultou na diminuição do uso da penicilina tanto como tratamento empírico como na terapia direcionada após o

resultado do antibiograma em pneumonias adquiridas na comunidade (WEINSTEIN et al., 2009).

O aumento da resistência à penicilina resultou na sua substituição por antibióticos mais caros e de amplo espectro. Entretanto, estudos retrospectivos e prospectivos envolvendo adultos e crianças com pneumonia pneumocócica causadas por cepas não sensíveis à penicilina demonstraram que os resultados do tratamento com penicilina não diferiam dos resultados obtidos com outros antimicrobianos, sugerindo que os pontos de corte utilizados para meningite não se aplicavam para a pneumonia. Outros estudos multicêntricos confirmaram esses resultados (WEINSTEIN et al., 2009).

Esses resultados, assim como uma revisão e reavaliação dos dados de microbiologia, farmacocinética e farmacodinâmica forneceram suporte para a revisão dos pontos de corte para infecções pneumocócicas não meníngeas, levando o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) estabelecer um grupo de trabalho para reconsiderar os pontos de corte de penicilina para *S. pneumoniae*, sendo que em 2008 os pontos de corte foram redefinidos, diferenciando-os de acordo com o sítio de infecção que estão demonstrados na Tabela 2 (WEINSTEIN et al., 2009).

Tabela 2: Padronização do CLSI para penicilina antes e após 2008

Período, síndrome e via de administração	CIM µg/mL		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Antes de 2008, qualquer síndrome e via de administração	≤ 0,06	0,12 - 1	≥2
Após 2008 – meningite admin. venosa	≤ 0,06		≥0,12
Após 2008 – não meningite admin. venosa	≤2	4	≥8
Após 2008 – não meningite via oral	≤0,06	0,12 - 1	≥2

Fluorquinolonas

As quinolonas e fluorquinolonas são alternativas para o tratamento de pneumonias causadas por *S. pneumoniae* resistentes à penicilina. O mecanismo de

ação desses antibióticos é feito através da inibição da síntese do DNA, o qual leva à morte da célula bacteriana. Os principais alvos desses antibióticos são a DNA girase e a topoisomerase IV (CHARPENTIER & TUOMANEN, 2000).

A DNA girase é responsável pela catálise da super-helicoidação da molécula de DNA bacteriano e a topoisomerase IV é responsável pela separação das fitas de DNA durante a replicação bacteriana.

A DNA girase é o principal alvo das bactérias Gram-negativas e a topoisomerase IV é o principal alvo dos cocos Gram-positivos. Essas duas enzimas são tetrâmeros, sendo que a DNA girase possui duas subunidades A e duas subunidades B, que são codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente, no caso da topoisomerase IV os genes que decodificam o tetrâmero estão nos genes *parC* e *parE*. A resistência de *S. pneumoniae* à fluorquinolona ocorre por mudança de alvo causada por mutação nos genes *parC* e *gyrA*. Já foram relatadas alterações nos genes *parE* e *gyrB* mas a participação desses genes para a resistência ainda não foi bem elucidada (MANDELL, 2005).

Recentemente foi identificado o sistema dependente de energia que é a bomba de efluxo, mas a participação desse mecanismo na resistência à fluorquinolona ainda não está bem definido (CHARPENTIER & TOUMAMEN, 2000).

No passado, a introdução de ciprofloxacina foi associada a um rápido aparecimento de cepas resistentes porém o mesmo não foi observado para as novas fluorquinolonas, como levofloxacina e gatifloxacina. Os prováveis motivos para essa diferença na aquisição da resistência são: a farmacocinética e farmacodinâmica da concentração das novas fluorquinolonas atingida em relação à CIM, que aumenta a eficácia bactericida da droga, evitando assim a pressão seletiva para a resistência em *S. pneumoniae*. O outro motivo é que para adquirir a resistência a essas drogas é necessária a ocorrência simultânea de duas mutações em pontos diferentes do gene alterando as enzimas GyrA e ParC (PATEL et al., 2011)

Macrolídeos

Os principais mecanismos de resistência pneumocócica aos macrolídeos são: a alteração do alvo e a bomba de efluxo (APPELBAUM, 2002).

O gene *ermAM* que confere resistência do pneumococo aos macrolídeos também confere resistência à lincosamida e estreptograminaB (MLS) (KLUGMAN, 1990). Essas três classes de antibióticos exercem seu efeito inibindo o alongamento da cadeia de peptídeos, impedindo a síntese proteica e atuam na subunidade 50S do ribossomo bacteriano, em contrapartida a resistência bacteriana é realizada por alteração desse alvo. A mudança de alvo é resultado da aquisição de um gene chamado *ermB* que está associado a altos níveis de resistência (MANDELL, 2005).

O segundo mecanismo pelo qual *S. pneumoniae* pode desenvolver resistência à eritromicina é via uma bomba de efluxo ATP dependente que é decodificado pelo gene *mefE* e produz baixo nível de resistência e o microrganismo permanece sensível à clindamicina. Por esse mecanismo, só os macrolídeos se tornam resistentes, não afetando a lincosamina nem a estreptomicina (APPELBAUM, 2002).

Cloranfenicol

A resistência de *S. pneumoniae* ao cloranfenicol ocorre devido à produção de uma enzima a acetiltransferase cloranfenicol que catalisa a conversão do cloranfenicol em derivados que não são capazes de se ligar a sub-unidade 50S ribossomal (CHARPENTIER & TOUMAMEN, 2000).

Tetraciclina

O gene *tetM* decodifica a resistência à tetraciclina em *S. pneumoniae*. Esse gene *tetM* está presente no cromossomo de várias espécies de estreptococos e acreditava-se que esse gene só era encontrado em coco Gram-positivo. Esse gene já foi encontrado em cepas resistentes das espécies *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Gardnerella*, em espécies de *Neisseria* e de um grande número de bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. O mecanismo de resistência mediado pelo gene *tetM* é a produção de uma proteína que se liga ao ribossomo impedindo a ação da tetraciclina na síntese proteica (KLUGMAN, 1990).

Trimetoprim-sulfonamida

A resistência pneumocócica a esse antibiótico é atribuída a uma resistência específica ao trimetoprim,. Mutações no gene dihidrofolato transferase que leva a uma diminuição da afinidade do trimetoprim pela sua enzima alvo a dihidrofolato transferase (APPELBAUM, 2002).

Glicopeptídeos

Os antibióticos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, exercem sua ação antimicrobiana pela prevenção de ambas reações a transglicosilação e a transpeptidação, que participam da síntese da parede celular. Os glicopeptídeos são considerados o último recurso no tratamento de infecções por cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina. Até o momento não foi isolada cepa de *S. pneumoniae* resistente a glicopeptídeos (CHARPENTIER & TOUMAMEN, 2000).

Embora cepas resistentes à vancomicina não tenham sido isoladas, recentemente ocorreram indícios da emergência de cepas de *S. pneumoniae* tolerantes à vancomicina (RODRIGUEZ et al., 2004). Esse fenômeno geneticamente adquirido, chamado de tolerância, muda a atividade do antibiótico de bactericida para bacteriostático (TOMAZS et al., 1970; TOUMATEN et al., 1986).

Cepas tolerantes a um antibiótico param de crescer e diminuem drasticamente a taxa de mortalidade e voltam a crescer com a retirada do antibiótico. O mecanismo de tolerância é diferente do de resistência pois na resistência a bactéria é capaz de se multiplicar na presença do antibiótico (RODRIGUES et al., 2004).

Cepas isoladas que apresentaram tolerância à vancomicina foram isoladas na Colômbia e na Coreia. As quatro cepas coreanas foram isoladas de meningite e foram associadas à falência terapêutica, essas cepas também eram resistentes à penicilina e cefotaxima (HIDALGO et al., 2003; SUNG et al., 2006).

Um grande estudo retrospectivo foi realizado com 215 cepas de nasofaringe e 113 cepas isoladas de meningite para testar o poder bactericida da vancomicina e tiveram como resultado que 10,6% das cepas invasivas e 3,7% das cepas colonizadoras apresentaram tolerância à vancomicina. Este estudo demonstra que a tolerância existe em populações de *S. pneumoniae* e que em meningite há a

necessidade de um efeito bactericida do antibiótico para ocorrer a cura (RODRIGUEZ et al., 2004).

1.5. Tipagem Molecular

A capacidade de *S. pneumoniae* em causar doença está diretamente relacionada com seu tipo capsular e embora sejam capazes de produzir mais de 90 tipos capsulares diferentes, apenas alguns sorotipos são responsáveis pela maioria das doenças invasivas (BRITO et al., 2003).

Para otimizar o desenvolvimento de novas vacinas, bem como monitorar a eficácia das existentes, é necessário o conhecimento da epidemiologia sorogrupo específica de *S. pneumoniae* e a sua associação aos tipos de doença. O monitoramento contínuo dos sorotipos de *S. pneumoniae* é essencial uma vez que já foi demonstrado que os sorotipos causadores de doença podem ser alterados com o tempo (BRITO et al., 2003).

A técnica de Quellung realiza a sorotipagem através anticorpos monoclonais específicos para cada tipo capsular e a determinação é realizada pela observação do intumescimento capsular ao microscópio. Essa técnica continua sendo o padrão ouro para a sorotipagem pneumocócica, porém apresenta algumas desvantagens: o alto custo do antissoro, a necessidade de técnicos treinados e a subjetividade na interpretação. Essas limitações restringem essa técnica a alguns laboratórios de referência (JOURDAN et al., 2011).

Para superar essas dificuldades da sorotipagem, Pai e colaboradores (2006) desenvolveram uma análise baseada no Multiplex PCR Sequencial. A produção da cápsula é controlada pelo gene localizado no locus *cps*, que normalmente são flanqueados pela região conservada *dexA* e *aliA*. Os quatro primeiros genes são conservados em quase todos sorotipos, já na parte central estão localizados os genes sorotipo-específico que servem de base para a diferenciação pneumocócica baseada em PCR.

1.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Estudos epidemiológicos que ocorrem em um curto espaço de tempo são simples de analisar, se o clone é devido a mesma amostra, haverá muita pouca

variação entre as amostras, e qualquer método discriminatório fornecerá uma resposta correta (SPRATT, 1999).

Já a comparação entre cepas isoladas em um grande período de tempo e que compreendem uma grande área geográfica, por exemplo surtos de doenças que ocorreram por duas décadas em diferentes países, são bem mais difíceis de ser esclarecidos. As cepas isoladas podem ter um ancestral comum e podem ter acumulado variações significantes (ENRIGHT; SPRAT, 1998).

MLST de *S. pneumoniae* se baseia no sequenciamento de DNA de fragmentos de sete genes de locus conservados (housekeeping) (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, e *ddl*) (ENRIGHT; SPRAT, 1998). O MLST é realizado pela amplificação por PCR dos fragmentos internos dos genes housekeeping. Cada alelo amplificado é sequenciado e a sequência comparada com alelos conhecidos que estão disponíveis em uma base de dados “online”(www.mlst.net). As diferenças nas sequências (sempre é um único nucleotídeo de diferença) geram um número de alelo diferente. O tipo de sequência (ST) é composto pelos sete números de alelos da cepa (ELBERSE et al., 2011).

MLST é um método conveniente e inequívoco de caracterizar cepas de *S. pneumoniae*. A principal vantagem de outro métodos é que a cepa pode ser classificada como um clone conhecido, ou como um novo clone sem haver a necessidade da obtenção de uma referência de cada amostra, basta comparar o perfil dos alelos com as referências das amostras depositadas no banco de base mundial (ENRIGHT; SPRAT, 1998).

Diferentes sequências (sempre um único nucleotídeo diferente) resultam em um número de alelo diferente. Os sete alelos juntos formam um perfil ou uma tipo sequência (ST). Apesar de ser uma técnica cara, pois é necessário realizar o sequenciamento, ela tem a vantagem de ser reprodutível, inequívoca, e com portabilidade permitindo a comparação intra-laboratorial, sendo um método adequado para a criação de um banco de dados internacional (ELBRESE et al., 2011).

A rede internacional Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) foi estabelecida em 1997 com o patrocínio da União Internacional de Sociedades de Microbiologia com o objetivo de padronizar a nomenclatura e classificação de clones de *S. pneumoniae* resistentes no mundo inteiro. Até o momento, foram descritos 43 clones de *S. pneumoniae*. O sistema usado para

nomear um clone é o seguinte: país^{primeiro sorotipo identificado} -numeração sequencial, como exemplo, Spain^{23F}-1, Espanha é o país onde o clone foi identificado pela primeira vez (publicação), 23F é o sorotipo do clone que foi o primeiro ser identificado, e 1 é o número do clone (McGEE et al., 2001).

1.7. Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE)

Essa técnica foi desenvolvida em 1984 por Schwartz e Cantor com DNA de *Saccharomyces cerevisiae*.

PFGE consiste em incorporar o organismo em agarose, e então lisar o organismo no local, digerir o cromossomo com uma enzima de restrição de corte raro que produz um número limitado de fragmentos de alto peso molecular. Os fragmentos são separados por eletroforese, na qual a orientação da corrente elétrica muda periodicamente, permitindo que os fragmentos grandes sejam efetivamente separados por tamanho. O padrão de bandas de DNA são comparados entre os isolados (ELBERSE et al., 2011).

Tenover e colaboradores (1995) descreveram um critério de interpretação do PFGE:

- Os isolados são considerados indistinguíveis quando o padrão de restrição possui o mesmo número de bandas e elas são do mesmo tamanho.
- Intimamente relacionada: os isolados são assim considerados quando a diferença entre os isolados corresponde a apenas um evento genético, ou seja, um ponto de mutação que pode ser uma inserção ou deleção de DNA. Esse tipo de mutação resulta em duas a três bandas de diferença.
- Possivelmente relacionadas: um isolado é considerado possivelmente relacionado pertencente a um clone se ocorrerem dois eventos genéticos distintos que gera de quatro a seis bandas de diferença.
- Não relacionados: é quando ocorrerem três ou mais eventos genéticos independentes, geralmente ocorrem mais de sete bandas diferentes

PFGE tem como vantagens de possuir tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório, além do custo de materiais e equipamentos ser relativamente

baixo. Entretanto, é um método trabalhoso que pode gerar resultados ambíguos se não realizado por técnicos treinados. A portabilidade entre laboratórios não é simples mas pode ser realizada se o mesmo protocolo for seguido (ELBERSE et al., 2011)

Diferentes técnicas moleculares apresentam um poder discriminatório diferente também. O método menos discriminatório é a tipagem molecular pois não fornece informações sobre a genética bacteriana. O MLST possui mais capacidade de discriminar que a tipagem molecular, porém PFGE é dos três métodos o que possui maior poder discriminatório (HERIQUES-NOMARK et al., 2008).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Validar e implantar a tipagem molecular de *S. pneumoniae* com cepas invasivas isoladas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

2.2 – Objetivos específicos

- Padronizar reações sequenciais PCR-Multiplex para a determinação de sorotipos capsulares de *S. pneumoniae*.
- Analisar a relação entre os diferentes tipos capsulares de *S. pneumoniae* e os seus perfis de sensibilidade aos antimicrobianos.
- Analisar a relação entre os diferentes tipos capsulares de *S. pneumoniae* entre as diferentes faixas etárias e o sexo.
- Analisar a diversidade genética dos isolados de *S. pneumoniae* do sorotipo 14 pelas técnicas de MLST e PFGE.
- Comparar a frequência dos sorotipos de *S. pneumoniae* isolados das doenças pneumocócicas invasivas na nossa comunidade antes e depois da implantação da vacina pneumocócica 10 valente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas

As cepas de *S. pneumoniae* foram isoladas de sítios estéreis (líquor, líquido pleural e sangue) no laboratório de microbiologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo de 2005 a setembro de 2011. As cepas foram isoladas em ágar sangue desfibrinado de carneiro (5%) e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . A identificação foi realizada pelo método automatizado inicialmente com o equipamento Vitek, BioMérieux®. A partir de outubro de 2009 o equipamento utilizado foi o Vitek 2, BioMérieux® utilizando-se cartão GPI e GP, que contém provas bioquímicas convencionais, sendo que as mudanças de equipamento e cartão de identificação não afetaram os resultados obtidos. A leitura é realizada através de densidade óptica e mudança de cor das reações bioquímicas. Estes testes foram complementados pelos testes de suscetibilidade à optoquina e de bile-solubilidade.

O antibiograma foi realizado pelo método de disco difusão segundo padronização do CLSI (documento M02-A10), o meio de cultura utilizado foi o Ágar Mueller Hinton com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Plastlabor PL 1162, Rio de Janeiro – RJ, BR). Os discos de antibióticos utilizados foram da marca Oxoid (Cambridge, UK) a saber: clindamicina (CTO 64B), cloranfenicol (CTO 013B), eritromicina (CTO020B), levofloxacina (CT 1587B), rifampicina (CTO 207B), tetraciclina (CTO 054B) e sulfametoxazol-trimetoprim (CTO 052B).

A determinação do CIM da penicilina e ceftriaxona foi realizada com fitas Etest® (AB bioMérieux, Solna, Suíça), penicilina (502508) e ceftriaxona (51000708).

3.2. Condições de armazenamento

As cepas isoladas e identificadas foram armazenadas em solução de leite desnatado a 10% e congeladas à -80°C até o momento de uso. A reativação das cepas do estoque, quando necessário, foi realizada pela semeadura em ágar sangue e incubação por 24h a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 .

3.3. Reação Sorotipagem pelo método de Quellung

Todas as cepas foram sorotipadas no Instituto Adolfo Lutz pela reação de Quellung. Através do teste de Neufeld. Resumidamente, uma gota de amostra é misturada com uma gota de soro de aglutinação, uma lamínula é colocada sobre a mistura e a preparação é examinada por microscopia. A reação positiva ocorre quando o anticorpo de tipo específico se liga à cápsula de *S. pneumoniae*, que causando uma alteração no seu índice de refração dando o aspecto de "inchada" e mais visível. A reação de Quellung foi introduzida por Neufeld e Etinger – Tulczynska como o método padrão para tipagem de *S. pneumoniae* em 1932. (HARE et al.,2009).

3.4. Extração do DNA genômico

Os isolados bacterianos foram cultivados a partir do estoque em placas de ágar sangue e incubados por uma noite a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2 . As células bacterianas foram ressuspensas em 250 μL de tampão TE (10mM tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) e a turbidez ajustada para 1,0 da escala de MacFarland . As suspensões foram submetidas a um choque térmico, 5 minutos em água fervente e em seguida, pelo mesmo período de tempo, a -20°C . Esses lisados foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

3.5. Tipagem Molecular

A tipagem molecular capsular de *S. pneumoniae* foi realizada pela técnica de multiplex PCR segundo PAI e colaboradores (2006) e DIAS e colaboradores (2007) e Protocolo CDC (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-Latin-Amer-clinical-specimens.pdf>). As reações multiplex sequenciais foram realizadas para a identificação dos sorotipos, as condições das reações estão descritas nas tabelas de 3 a 8. Foram utilizados 30 pares de iniciadores (Tabela 9) que foram agrupados em seis reações sequenciais de multiplex PCR. As reações de multiplex foram estabelecidas para incluir sequencialmente os sorogrupos-sorotipos invasivos mais frequentes na América Latina. Iniciadores para o locus *cpsA*, presente em todos *S.*

pneumoniae (*cpsA-f* e *cpsA-r*), foram incluídos como controle interno específico em todas as reações.

A padronização das reações foram realizadas com cepas gentilmente cedidas pela Dra. Fabiana Pimenta do CDC, foi enviada uma cepa de cada sorotipo presente em cada reação.

A reação foi realizada em um volume final de 20µL e cada mix da reação conteve 1X da solução tampão 10X, 200µM de cada desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), a concentração de MgCl₂ variando 2,0 a 3,5mM, 2,0 U de *Taq* DNA polimerase, iniciadores na concentração de 0,1 a 0,7µM, conforme os esquemas abaixo.

Os ciclos seguiram as seguintes condições: 95°C por 15 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos e 54°C por 90 segundos e 72°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese.

3.6. Eletroforese em gel de agarose

Para visualização e análise do fragmento de DNA amplificado na reação de PCR, gel de agarose foi preparado a 2,0% em tampão 1 X TAE. Para a verificação dos tamanhos dos produtos de PCR, alíquotas destas amostras, assim como um padrão de massa molecular conhecido, misturados a uma solução tampão foram submetidas à separação eletroforética por cerca de 1 hora e 30 minutos a 100 volts. O gel foi corado com solução de brometo de etídio ou gel red e as bandas foram visualizadas sob luz violeta (UV) e a imagem registrada por fotografia digital.

Tabela 3 – Reação Multiplex PCR 1

Reagentes	Estoque	Final	Produto PCR (BP)
H ₂ O Miliq			
Tampão	10X	1X	
MgCl ₂	25mM	2,0 mM	
dNTP	2,5mM	0,2 mM	
Primer cps Fwd	40µM	0,1 µM	160
Primer cps Rev	40µM	0,1 µM	
Primer 6A/B/C Fwd	40µM	0,3 µM	250
Primer 6A/B/C Rev	40µM	0,3 µM	
Primer 9V (9A) Fwd	40µM	0,5 µM	753
Primer 9V (9A) Rev	40µM	0,5 µM	
Primer 14 Fwd	40µM	0,3 µM	189
Primer 14 Rev	40µM	0,3 µM	
Primer 19F Fwd	40µM	0,5 µM	304
Primer 19F Rev	40µM	0,5 µM	
Primer 23F Fwd	40µM	0,5 µM	384
Primer 23F Rev	40µM	0,5 µM	
Taq	5 U/µL	2 U/µL	
Dna	~10ng/µ	~1ng/µL	

6B	250 bp
9V	753 bp
14	189 bp
19F	304 bp
23F	384 bp
6B	250 bp

Tabela 4 – Reação Multiplex PCR 2

Reagentes	Estoque	Final	Produto PCR (bp)
H ₂ O Miliq			
Tampão	10X	1X	
MgCl ₂	25mM	3,5mM	
dNTP	2,5mM	0,2mM	
Primer cps Fwd	40µM	0,1µM	160
Primer cps Rev	40µM	0,1µM	
Primer 1 Fwd	40µM	0,3µM	280
Primer 1 Rev	40µM	0,3µM	
Primer 4 Fwd	40µM	0,3µM	430
Primer 4 Rev	40µM	0,3µM	
Primer 5 Fwd	40µM	0,3µM	362
Primer 5 Rev	40µM	0,3µM	
Primer 18C Fwd	40µM	0,3µM	573
Primer 18C Rev	40µM	0,3µM	
Primer 19A Fwd	40µM	0,3µM	478
Primer 19A Rev	40µM	0,3µM	
Taq	5U/µL	2U/µL	
Dna	~10ng/µL	~1ng/µL	

1	280 bp
4	430 bp
5	362 bp
18C	573 bp
19A	478 bp

Tabela 5 – Reação Multiplex PCR 3

Reagentes	Estoque	Final	Produto de PCR (bp)	
H ₂ O Miliq				
Tampão	10X	1X		
MgCl ₂	25mM	3,0mM		1000 bp
dNTP	2,5mM	0,2mM		
Primer cps Fwd	40μM	0,1μM	160	500 bp
Primer cps Rev	40μM	0,1μM		
Primer B Fwd	40μM	0,3μM	371	200 bp
Primer B Rev	40μM	0,3μM		
Primer 7 Fwd	40μM	0,7μM	826	
Primer 7 Rev	40μM	0,7μM		
Primer 9 Fwd	40μM	0,5μM	516	
Primer 9 Rev	40μM	0,5μM		
Primer 10A Fwd	40μM	0,5μM	628	
Primer 10A Rev	40μM	0,5μM		
Primer 11A Fwd	40μM	0,3μM	463	
Primer 11A Rev	40μM	0,3μM		
Taq	5U/μL	2U/μL		
Dna	~10ng/μL	~1ng/μL

3 7F 9N 10A 11A B

→ cps

3	371 bp
7F	826 bp
9N	516 bp
10A	628 bp
11A	463 bp

Tabela 6 - Reação Multiplex PCR 4

Reagentes	Estoque	Final	Produto de PCR (bp)	
H ₂ O Miliq				
Tampão	10X	1X		
MgCl ₂	25mM	2,5mM		1000 bp
dNTP	2,5mM	0,2mM		
Primer cps Fwd	40μM	0,1μM	160	500 bp
Primer cps Rev	40μM	0,1μM		
Primer 7C Fwd	40μM	0,5μM	260	200 bp
Primer 7C Rev	40μM	0,5μM		
Primer 12F Fwd	40μM	0,5μM	376	
Primer 12F Rev	40μM	0,5μM		
Primer 15B/C Fwd	40μM	0,3μM	496	
Primer 15B/C Rev	40μM	0,3μM		
Primer 17F Fwd	40μM	0,7μM	693	
Primer 17F Rev	40μM	0,7μM		
Primer 38 Fwd	40μM	0,2μM	574	
Primer 38 Rev	40μM	0,2μM		
Taq	5U/μL	2U/μL		
Dna	~10ng/μL	~1ng/μL

7C 12F 15B 17F 38 B

→ cps

7C	260 bp
12F	376 bp
15B	496 bp
17F	693 bp
38	574 bp

Tabela 7– Reação Multiplex PCR 5

Reagentes	Estoque	Final	Produto de PCR (bp)	
H ₂ O Miliq				
Tampão	10X	1X		
MgCl ₂	25mM	3,5mM		1000 bp
dNTP	2,5mM	0,2mM		
Primer cps Fwd	40μM	0,1μM	160	500 bp
Primer cps Rev	40μM	0,1μM		
Primer 20 Fwd	40μM	0,2μM	294	200 bp
Primer 20 Rev	40μM	0,2μM		
Primer 22F Fwd	40μM	0,3μM	514	
Primer 22F Rev	40μM	0,3μM		
Primer 22F Fwd	40μM	0,5μM	643	
Primer 22F Rev	40μM	0,5μM		
Primer 31 Fwd	40μM	0,5μM	701	
Primer 31 Rev	40μM	0,5μM		
Primer 34 Fwd	40μM	0,3μM	408	
Primer 34 Rev	40μM	0,3μM		
Taq	5U/μL	2U/μL		
Dna	~10ng/μL	~1ng/μL

8 20 22F 31 34 B

← cps

8	294 bp
20	514 bp
22F	643 bp
31	701 bp
34	408 bp

Tabela 8 - Reação Multiplex PCR 6

Reagentes	Estoque	Final	Produto de PCR (bp)
H ₂ O	Miliq		
Tampão	10X	1X	
MgCl ₂	25mM	3,5mM	
dNTP	2,5mM	0,2mM	
Primer cpsFwd	40μM	0,1μM	160
Primer cpsRev	40μM	0,1μM	
Primer 15AFwd	40μM	0,3μM	436
Primer 15ARev	40μM	0,3μM	
Primer 16FFwd	40μM	0,5μM	988
Primer 16FRev	40μM	0,5μM	
Primer 33FFwd	40μM	0,3μM	338
Primer 33FRev	40μM	0,3μM	
Primer 35FFwd	40μM	0,3μM	517
Primer 35FRev	40μM	0,3μM	
Primer 35BFwd	40μM	0,5μM	677
Primer 35BRev	40μM	0,5μM	
Taq	5U/μL	2U/μL	
Dna	~10ng/μL	~1ng/μL

15A 16F 33F 35F 35B B

15A 436 bp
16F 988 bp
33F 338 bp
35F 517 bp
35B 677 bp

→ cps

Tabela 9 – Reações, sorotipos, sequência de iniciadores e produto de PCR

Reações	Sorotipos	Seqüência de iniciadores (5' → 3')	Produto PCR (bp)
Reação 1	6A/ 6B/ 6C/ 6D	f AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG r TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	250
	9V/(9A)	f CTT CGT TAG TTA AAA TTC TAA ATT TTT CTA AG r GTC CCA ATA CCA GTC CTT GCA ACA CAA G	753
	14	f GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT r GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT	189
	19F	f GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C r GTA ATA GTT CTT TAG GGC GTT TAT GGA GAT AG	304
	23F	f GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC r CAC AAC ACC TAA CAC ACG ATG GCT ATA TGA TTC	384
	<i>cpsA</i>	f GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC r GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	160
	1	f CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA r CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	280
	4	f CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G r GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	430
	5	f ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG r GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	362
	18C/(18A 18B, 18F)	f CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC r TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	573
Reação 2	19A	f GTT AGT CCT GTT TTA GAT TTA TTT GGT GAT GT r GAG CAG TCA ATA AGA TGA GAC GAT AGT TAG	478
	<i>cpsA</i>	f GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC r GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	160
	3	f ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G r CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	371
	7F/(7A)	f CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG r CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC	826
	9N/9L	f GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC r ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T	516
	10A	f GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC r GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	628
	11A/(11D)	f GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G r GAT TAT GAG TGT ATT TTA TTC CAA CTT CTC CC	463
	<i>cpsA</i>	f GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC r GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	160
Reação 3			

Tabela 9 - Continuação

Reações	Sorotipos	Sequência de iniciadores	Produto
		(5'➡ 3')	PCR (BP)
Reação 4	7C/(7B,40)	f CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A r GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	260
	12F/(12A)	f GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G r CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	376
	15B/15C	f TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA r CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	496
	17F	f TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG r GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	693
	38	f CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG r ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	574
	cpsA	f GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC r GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	160
	8	f GAT GCC ATG AAT CAA GCA GTG GCT ATA AAT C r ATC CTC GTG TAT AAT TTC AGG TAT GCC ACC	294
	20	f GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G r CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	514
	22F/(22A)	f GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC r CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	643
	31	f GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC r CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	701
Reação 5	34	f GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC r CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	408
	cpsA	f GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC r GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	160
	15A	f ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C r GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	436
	16F	f CTG TTC AGA TAG GCC ATT TAC AGC TTT AAA TC r CAT TCC TTT TGT ATA TAG TGC TAG TTC ATC C	988
	33F/(33A, 37)	f GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG r CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	338
	35F/(47)	f GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A r GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	517
Reação 6	35B	f GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG r CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	677
	cpsA	f GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC r GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	160

Figura 1 - Esquema para a tipagem molecular capsular de cepas de *S. pneumoniae*. São indicadas as seis reações e os sorotipos detectados em cada reação (PAI et al., 2006); (DIAS et al., 2007)

3.7. Multilocus Sequence Typing (MLST) – *S. pneumoniae*

A reação de MLST foi realizada para todas as cepas sorotipo 14 segundo a padronização de Enright e Sprat (1998).

A extração do DNA para o MLST foi realizada da mesma forma da utilizada para a tipagem molecular. Os iniciadores estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Iniciadores do MLST *S. pneumoniae*

Enzima/Gene	Alelo	Sequência dos iniciadores 5' – 3'	Fragmentos bp
Shikimate desidrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> up	GCCTTTGAGGCGACAGC	405
	<i>aroE</i> dn	TGCAGTTCARAAACATWTTCTAA	
Glicose-6-fosfatodeidrogenase (<i>gdh</i>)	<i>gdh</i> up	ATGGACAAACCAGCNAGYTT	439
	<i>gdh</i> dn	GCTTGAGGTCCCATRCTNCC	
Glicose kinase (<i>gki</i>)	<i>gki</i> up	GGCATTGGAATGGGATCACC'	483
	<i>gki</i> dn	TCTCCCGCAGCTGACAC	
Transquelotase (<i>recP</i>)	<i>recP</i> up	GCCAACTCAGGTCATCCAGG	448
	<i>recP</i> dn	TGCAACCGTAGCATTGTAAC	
Sinal da peptidase I (<i>spi</i>)	<i>spi</i> up	TTATTCCTCCTGATTCTGTC'	472
	<i>spi</i> dn	GTGATTGGCCAGAAGCGGAA	
Xantinafosforiboziltransferase (<i>xpt</i>)	<i>xpt</i> up	TTATTAGAAGAGCGCATCCT	486
	<i>xpt</i> dn	AGATCTGCCTCCTTAAATAC	
Ligase D-alanina/D-alanina (<i>ddl</i>)	<i>ddl</i> up	TGCYCAAGTTCCTTATGTGG	441
	<i>ddl</i> dn	CACTGGGTRAAACCWGGCAT'	

3.7.1. Reação de PCR para MLST

A reação foi realizada com volume final de 30µL (exceto para os alelos *ddl* e *xpt* com volume final de 50µL), utilizou-se 1X de solução tampão 10X; 2,5 a 3,0 mM de MgSO₄; 160µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 0,4µM de cada iniciador, exceto para os alelos *ddl* e *xpt* com 0,6µM de cada iniciador); e 0,1 unidade de *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen) e 2,5µL da amostra.

3.7.2. Condições da PCR para MLST

a) Alelos *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP* e *spi*

A reação foi executada com denaturação inicial 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, seguida por anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos e finalizada com uma etapa de extensão 72°C por 5 minutos.

b) Alelos *xpt* e *ddl*

A reação foi executada com denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 51°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 30 segundos e finalizada com uma etapa de extensão a 68°C por 5 minutos.

c) Análise dos resultados das sequências

Após a amplificação os fragmentos de DNA foram purificados usando o kit para preparação de amostras de DNA GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Helthcare, Reino Unido), e foram sequenciados em cada direção usando os iniciadores utilizados para a amplificação.

As amostras foram sequenciadas pela técnica de Sanger no Centro de Genoma Humano da USP e a qualidade dos resultados analisados no programa on-line “Electropherogram Quality Analysis” Da Embrapa no endereço: <http://.asparagin.cenargen.embrapa.br>

3.8. Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE)

As cepas caracterizadas por MLST foram também por PFGE segundo o protocolo de Durmaz e colaboradores (2009). A aplicação do método de PFGE para estudos de isolados de *S. pneumoniae* é bastante complicada, devido principalmente à facilidade de autólise do microrganismo. Sendo assim, apesar do protocolo do método ser amplamente difundido, optamos por descrever o protocolo

utilizado neste estudo, pois sabemos das dificuldades em se ter sucesso na realização do ensaio.

1) Preparação da agarose Low Melting

Preparar o gel de agarose a 2% (Low Melting Point) em CSB que deve ser completamente fundida em micro-ondas. Após fusão adicionar dodecil sulfato de sódio (SDS) em uma concentração final de 1%.

A agarose preparada é distribuída, aproximadamente 1,0mL, em tubos de 1,5mL e mantidas em termobloco (Eppendorf) a 45°C.

2) Suspensão bacteriana

As cepas foram isoladas em ágar sangue (5% de sangue de carneiro) e incubadas a 35°C $\pm$ 1 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por um período máximo de 15 horas.

Foi feita uma suspensão bacteriana em tampão CSB (100mM Tris-HCl [pH 8,0], 10mM EDTA) na escala 4,0 de MacFarland. Esta suspensão foi mantida à temperatura ambiente por um período máximo de 5 minutos e 100µL da suspensão bacteriana é distribuída em tubo de 0,6mL.

3) Preparação dos blocos

Adiciona-se a essa suspensão bacteriana o mesmo volume de agarose Low Melting a 2%(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) homogeneiza-se delicadamente três vezes e 100µL dessa suspensão foi rapidamente distribuída nos moldes de blocos (10mm X 5mm X 1,5mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA).

Os moldes de bloco foram mantidos a 4 °C por 10 minutos.

4) Solução de lise 1 das células em bloco agarose

Cada bloco foi retirado do molde e colocado em um tubo de 1,5mL que continha 500µL da solução de lise de célula 1 (CLS-1; 50mM Tris-HCl [pH 8,0], 50mM EDTA, lisozima [2,5mg/mL], proteinase K [1,5mg/mL])(Invitrogen, NY, USA) e incubado a 37°C por 60 minutos em termobloco.

5) Solução de lise 2

Os blocos foram transferidos para um tubo de 1,5mL contendo 500µL da solução de lise 2 (CLS-2; 0,5M EDTA [pH 8,0], 1% de sarcosyl e proteinase K [400mg/mL]) e incubadas a 55°C em termobloco por 120 minutos.

6) Lavagem dos blocos de agarose

A suspensão de lise foi cuidadosamente removida dos blocos o qual foi lavado três vezes com água estéril ultrapura e três vezes 1mL para cada tubo em cada lavagem. Cada uma dessas lavagens foi feita a 55°C em termobloco por 15 minutos. Após a ultima lavagem 1mL de tampão TE foi adicionado e os blocos mantidos a 4°C até o momento do uso

7) Digestão do DNA no bloco de agarose com a enzima de restrição *Sma*I fast (Fermentans, Maryland, USA)

Cada bloco foi cortado pela metade com a ajuda de bisturi e colocado em um tubo de 0,6mL contendo 100µL de tampão de enzima (1X) e incubado a 37°C por 10 minutos em banho-maria. Depois dessa incubação o tampão de enzima foi removido e adicionado 100µL de tampão de enzima fresco contendo 2,5 µL da enzima *Sma*I fast e incubado a 37°C por 30 minutos.

8) Durante a digestão da enzima foi preparado o gel de agarose a 1% foi preparado 100mL de tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris base, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA, pH 8,0). Após a completa dissolução da agarose em micro-ondas foi adicionado 2µL de gel red.

9) A agarose, a aproximadamente 50°C, foi despejada dentro da forma para gel com cuidado para evitar a formação de bolhas. O pente foi retirado após a completa solidificação do gel.

- 10) Após a digestão enzimática o bloco foi colocado cuidadosamente dentro dos orifícios formados pela retirada do pente da agarose, nas pontas foi colocado o marcador de peso molecular Lambda DNA Lader para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. Esses orifícios foram vedados com a mesma agarose e após a completa solidificação foi realizada a eletroforese.
- 11) A eletroforese para a separação dos fragmentos de DNA do cromossoma bacteriano clivado pela enzima de restrição *SmaI* foi feita no sistema de CHEF-DR III (Bio Rad Laboratories – USA) com 22 horas de corrida com pulso inicial de 5 segundos e final 30 segundos, voltagem de 6,0 V/cm sob um ângulo de 120° com tampão TBE 0,5X, com temperatura de 13°C.
- 12) O gel foi observado em transluminador de Ultra Violeta (UV) e a imagem registrada por fotografia digital

3.9. Análise Estatística

Avaliações estatísticas foram realizadas usando o software Statistica versão 7.0 analisando a diferença entre duas proporções. Valores do $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Amostras de *S. pneumoniae* isoladas de diferentes materiais clínicos

Foram analisadas 270 cepas de *S. pneumoniae*, isolados entre 2005 e setembro de 2011, provenientes de sangue (179 amostras), liquor (34) e líquido pleural (19) de 232 pacientes. Somente um isolado de *S. pneumoniae* por paciente foi considerado no estudo. Os diagnósticos clínicos foram: pneumonia 154 casos (66%), meningite 37 (16%), bacteremia 32 (14%) e outros 9 (4%). A distribuição de acordo com a amostra biológica está representada na figura 2.

Figura 2 - Distribuição das amostras de acordo o material biológico.

4.2. Padronização da sorotipagem por Multiplex PCR

Foi padronizado o esquema de sorotipagem por Multiplex PCR, tendo como base os esquemas propostos por Pai e colaboradores (2006) e Dias e colaboradores (2007) e Protocolo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-Latin-Amer-clinical-specimens.pdf>). Todas as amostras foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para a sorotipagem pela reação de Quellung, considerada padrão ouro.

Tendo em vista a introdução da vacina anti-pneumocócica na rede pública pelo Ministério da Saúde, apresentaremos os resultados em dois momentos, antes (2005-2009) e depois da vacina (2010-2011). A Figura 3 mostra a porcentagem de

amostras isoladas em cada um das seis reações e as não tipáveis das amostras do período de 2005 a 2009. No total de 181 amostras testadas, 84 (46 %) foram detectadas na primeira reação, 52 (29%) na segunda, 19 (10%) na terceira, 17 (9%) na quarta, três (2%) na quinta, na sexta e não tipável. É interessante ressaltar que 155 (85%) das 181 das amostras testadas foram tipadas nas três primeiras reações.

A Figura 4 mostra a porcentagem de amostras isoladas em cada uma das reações e as não tipáveis das amostras do período de 2010 a 2011. No total de 51 amostras testadas, 7 (14%) foram detectadas na primeira reação, 9 (18%) na segunda, 16 (31%) na terceira, 10 (20%) na quarta, 7 (14%) na quinta, e 1(2%) na sexta reação e não tipável. Nas três primeiras reações foram tipadas 32 (63%) das 51 amostras.

Figura 3 - Porcentagem de cepas de 2005 a 2009 tipadas por reação de Multiplex PCR

Figura 4 – Porcentagem de cepas de 2010 a 2011 tipadas por reação de Multiplex PCR

Das 232 amostras de *S. pneumoniae* estudadas, 153 (66 %) foi possível identificar o tipo capsular pelo método Multiplex-PCR e em 75 (32 %), apenas o sorogrupo. Quatro amostras (2 %) não foram tipadas por este método. (Tabelas 11).

Tabela 11 – Tipos capsulares de 232 amostras de *S. pneumoniae* determinados por Multiplex-PCR

	Multiplex PCR	Reação de Quellung	Total
Sorotipos	14	14	52
	5	5	27
	1	1	10
	3	3	9
	10A	10A	9
	19A	19A	9
	4	4	7
	8	8	6
	19F	19F	6
	23F	23F	6
	15A	15A	3
	11A	11A	2
	22F	22F	2
	31	31	1
	34	34	1
	38	38	1
	16F	16F	1
	17F	17F	1
Sub-total			153 (66%)

Sorogrupos	12F/A	12F	25
	6A/B/C	6B	17
		6A	5
		6A/C	2
	7F/A	7F	12
	18/A/B/C/F	18C	5
		18A	1
		18B	1
		18F	1
	9V/A	9V	3
9N/L	9N	3	
Sub-total		75 (32%)	
Sorotipos/sorotipos	Não tipável	23B	2
		G	1
		13	1
Sub-total		4 (2%)	

A tipagem por Multiplex PCR das 232 amostras mostrou 24 sorotipos/sorogrupos diferentes, que foram: 14 (22%), 5 (12%), 12F/A (11%), 6A/B/C (10%), 7F/A (5%), 1 (4%), 3 (4%), 10A (4%), 19A (4%), 18 A/B/C/F (3%), 4 (3%), 8 (3%), 23F (3%), 19F (3%) e outros (9%) (9V/A, 9N/L, 15A, 22F, 11A/D, 31, 38, 34, 16F, 17F e não tipável).

O método Multiplex-PCR mostra 100 % de especificidade e 98 % sensibilidade para determinação de sorogrupos e 66% para sorotipo.

4.3. Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* de acordo com a doença pneumocócica invasiva (DPI) e material biológico estudado durante o período de 2005 a 2011

O diagnóstico microbiológico das infecções pneumocócicas invasivas (DPI) foi realizado a partir de sangue, LCR e líquido pleural. Os dados obtidos corroboram que a introdução de hemocultura no protocolo clínico aumenta a frequência do isolamento do agente de DPI. Em 179 casos de hemocultura positivas para *S. pneumoniae*, 135 pneumonias e três meningites tiveram a etiologia identificada.

Não foi observado diferenças significativas entre os sorotipos isolados quanto a sua distribuição entre as DPI com exceção do sorotipo 10A (Figura 5 e 6), cuja frequência foi significantivamente maior em casos de meningites ($p = 0,0004$).

Figura 5 - Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* de acordo com o material biológico estudado durante o período de 2005 a 2011.

Figura 6 - Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* de acordo com a doença pneumocócica invasiva.

4.4. Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* de acordo com o sexo

Observa-se que das 232 cepas de *S. pneumoniae*, 144 (62%) foram isoladas em pessoas do sexo masculino e 88 (38%) no sexo feminino (Figura 7), não sendo observada prevalência estatisticamente significativa de nenhum sorotipo entre os sexos.

Figura 7 – Distribuição de cepas isoladas de *S. pneumoniae* por sexo.

4.5. Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* por faixa etária

Houve diferença na distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* de acordo com a faixa etária, como pode ser observado nas Figuras 8 e 9. Na Figura 8, na faixa etária menor de 2 anos, observa-se que apesar de haver 15 sorotipos/sorogrupos diferentes, 75% das amostras foram dos sorotipos/sorogrupos 14, 6A/B/C, 5 e 19A o que demonstra que a grande maioria das DIP nessa faixa etária é causada por um pequeno número de tipos capsulares.

Figura 8 – Distribuição porcentual dos sorotipos de *S. pneumoniae* pelas faixas etárias menor de 2 anos, de 2 a 4 anos e de 5 a 14 anos.

A Figuras 8, a faixa etária de 2 a 14 anos, demonstram a pouca variedade de sorotipos de *S. pneumoniae* que causam DPI.

Figura 9 – Distribuição porcentual dos sorotipos de *S. pneumoniae* pelas faixas etárias menor de 15 a 59 anos e maior de 60 anos.

Pela figura 9 podemos observar aumento da diversidade capsular de *S. pneumoniae* que causam DPI em adultos e idosos.

4.6. Distribuição dos sorotipos por ano

Após a introdução da vacina 10 valente na rede pública em crianças menores de 2 anos em março de 2010 ocorre uma mudança nos sorotipos isolados (Figura 10). Em 2009, mais de 40% dos isolados pertenciam ao sorotipo 14, enquanto que em 2010 foi apenas uma cepa e 2011 este sorotipo não foi isolado.

Figura 10 - Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* entre 2005 e 2011.

Na Tabela 12, estão demonstrados todos os sorotipos que fazem parte da vacina 10 valente que são: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. No período de 2005 a 2011 foram isolados 145 amostras desse grupo. Observa-se uma diminuição no número de isolados a partir de 2010. Na faixa etária menor de dois anos houve diminuição significativa destes sorotipos ($p = 0,009$) e aumento na faixa etária de 15 a 59 anos ($p = 0,003$).

Na tabela 13, encontra-se a distribuição dos sorotipos não vacinais de *S. pneumoniae* por faixa etária entre 2005 e 2011. Observa-se um aumento significativo no número de sorotipos não vacinais a partir de 2010 na faixa etária entre 15 a 59 anos ($p = 0,01$). Enquanto que em crianças menores de dois anos houve diminuição ($p = 0,01$). É importante salientar que os sorotipos 22F, 31 e 38 só foram isolados após 2010.

Tabela 12 – Distribuição dos 10 sorotipos de *S. pneumoniae* vacinais por faixa etária e ano.

Faixa etária	Sorotipo	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total	% do Total
<2 anos	14	3	11	4	14	7	1		40	28%
	6B	1	4	5	1	1	1		13	9%
	5		2	2	1				5	3%
	19F		1	1	1	1			4	3%
	23F			1	1				2	1%
	9V			1			1		2	1%
	7F			1					1	1%
	1		1						1	1%
	4		1						1	1%
Total <2 anos		4	20	15	18	9	3		69	48%
2 a 4 anos	14		2			4			6	4%
	6B		1						1	1%
	5			2	4	1			7	5%
	1			2	1				3	2%
	4		1						1	1%
Total 2 a 4 anos			4	4	5	5			18	12%
5 a 14 anos	6B				1				1	1%
	5		1		1	1			3	2%
	7F						1	1	2	1%
	1			2				1	3	2%
	18C				1	1			2	1%
Total 5 a 14 anos			1	2	3	2	1	2	11	8%
15 a 59 anos	5	3	3	1	1	1	1		10	7%
	7F		1	1	1		2	3	8	6%
	4			2				2	4	3%
	1			2	1				3	2%
	18C		2	1					3	2%
	14		1			1			2	1%
	6B		1		1				2	1%
	19F		1	1					2	1%
	23F				1				1	1%
Total 15 a 59 anos		3	9	8	5	2	3	5	35	24%
>60 anos	14	1	2		1				4	3%
	23F		2				1		3	2%
	5		1		1				2	1%
	7F		1						1	1%
	4						1		1	1%
	9V						1		1	1%
Total >60 anos		1	6		2		3		12	8%
Total Geral		8	40	29	33	18	10	7	145	100%

Tabela 13 – Distribuição dos sorotipos não vacinais de *S. pneumoniae* por idade e por ano

Faixa Etária	Sorotipo	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total	% do Total
<2 anos	19A	1	1	1	1		1		5	6%
	6A	2		1	1			1	5	6%
	10A	2	1					1	4	5%
	12F		1			2			3	3%
	3		1	1				1	3	3%
	23B			1					1	1%
	6A/C					1			1	1%
	18F				1				1	1%
Total <2 anos		5	4	4	3	3	1	3	23	26%
2-4 anos	19A					1			1	1%
	12F		1						1	1%
	23B							1	1	1%
	18B							1	1	1%
Total 2-4 anos			1			1		2	4	5%
5-14 anos	12F							1	1	1%
	3						1		1	1%
	9N						1		1	1%
	11A					1			1	1%
Total 5-14 anos						1	2	1	4	5%
15-59 anos	12F		1	1	5	2	3	5	17	20%
	8		1				3	1	5	6%
	19A					2			2	2%
	3		1					1	2	2%
	15A	1					1		2	2%
	9N		1				1		2	2%
	22F						1	1	2	2%
	10A						1		1	1%
	13			1					1	1%
	38							1	1	1%
	18A							1	1	1%
	G	1							1	1%
Total 15-59 anos		2	4	2	5	4	10	10	37	43%
>60 anos	10A			2	1		1		4	5%
	12F		1	1		1			3	3%
	3		1		1			1	3	3%
	8	1							1	1%
	19A							1	1	1%
	15A				1				1	1%
	6A/C						1		1	1%
	11A			1					1	1%
	31						1		1	1%
	34		1						1	1%
	16F		1						1	1%
	17F		1						1	1%
Total >60 anos		1	5	4	3	1	3	2	19	22%
Total Geral		8	14	10	11	10	16	18	87	100%

Pode-se observar claramente que de 2005 a 2009 o sorotipo 14 de *S. pneumoniae* foi o sorotipo prevalente em crianças menores de dois anos de idade (Figura 11). Além disso, a partir de 2010 observa-se também uma diminuição no número de crianças atendidas que albergavam esta bactéria.

Figura 11- Distribuição dos sorotipos de *S. pneumoniae* em crianças menores de 2 anos no período de 2005 a 2011. N corresponde ao número de isolados por ano nessa faixa etária.

Observa-se ainda, que a partir de 2010 ocorre uma diminuição da porcentagem de cepas isoladas em crianças abaixo de dois anos ($p = 0,01$) e um aumento na faixa etária de 15 a 59 anos ($p = 0,01$) (Figura 12).

Figura 12 – Porcentagem de isolados de *S. pneumoniae* por faixa etária no período de 2005 a 2011. N - número total de isolados por ano.

4.7. Perfil de sensibilidade aos beta-lactâmicos de amostras de *S. pneumoniae*

O perfil de sensibilidade aos beta-lactâmicos foi determinado através da CIM.

Durante o período do nosso estudo ocorreram dois fatos importantes que mudaram o quadro geral e o sentido que caminhava a resistência aos beta-lactâmicos das cepas de *S. pneumoniae*.

A primeira ocorreu em 2008 e foi a alteração dos pontos de corte para o CIM da penicilina, assim foi introduzido um valor para infecções meningéas e outro para as não meningéas, de forma que o valor de corte anterior a 2008 foi mantido para as cepas isoladas de infecções meningéas e uma nova faixa com valores bem mais altos foi introduzida para o tratamento de infecções não meningéas. Esta alteração afetou apenas a penicilina, pois a ceftriaxona já possuía cortes distintos de acordo com o sítio de infecção, com isso a resistência que vinha em franca ascendência em sítios não meningéas diminuiu, possibilitando a utilização da penicilina nessas infecções e preservando a ceftriaxona para infecções mais graves.

O segundo fato ocorrido foi a introdução da vacina 10 valente no Programa Nacional de Imunização em crianças até dois anos. Como já foi dito anteriormente a resistência pneumocócica está diretamente relacionada com os tipos capsulares e na vacina introduzida estão os sorotipos mais resistentes. Em nosso serviço foi observada uma diminuição drástica dos sorotipos presentes na vacina e consequentemente diminuição da resistência das cepas de *S. pneumoniae* isoladas.

4.7.1. Perfil de sensibilidade à penicilina

Na Figura 13 observa-se que o perfil de sensibilidade à penicilina das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de infecções meningéas foi: 73% de sensibilidade e 27% de cepas resistentes. Em isolados de *S. pneumoniae* isolados de infecções não meningéas não houve resistência plena e apenas 1% de resistência intermediária, sendo a grande maioria das cepas (99%) sensível à penicilina nesse tipo de infecção. Os sorotipos vacinais 14, 23F, 6B e 9V apresentaram maior CIM (Figura 15). Os dados obtidos mostram que o sorotipo 19A, que não está incluído na vacina dez valente também apresentou valores de maiores CIM. Duas amostras, uma sorotipo 14 e outra 23F, apresentaram CIM de 4 µg/ml (Tabela 16)

Figura 13 - Perfil de sensibilidade da penicilina para isolados de infecção meningea e não meningea

4.7.2. Perfil de sensibilidade à ceftriaxona

Com relação à ceftriaxona observa-se que não ocorreram cepas com resistência plena. Em isolados meníngeos foram isoladas 12% de cepas com resistência intermediária e 88% de cepas sensíveis. Nos isolados de *S. pneumoniae* de infecções não meníngeas foi observado 99% de sensibilidade e 1% de resistência intermediária (Figura 14).

Figura 14 - Perfil de sensibilidade da ceftriaxona para isolados de infecção meningea e não meningea

Tabela 14 - Perfil de sensibilidade e CIM das cepas de *S.pneumoniae* à penicilina por faixa etária, por sorotipo e por ano em infecção meningea

Faixa etária	CIM	Sorotipo	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total	Interpretação			
<2 anos	≤0,06µg/mL	10A	2	1						5 (42%)	Sensível			
		6A/B/C	1					1						
	>0,12µg/mL	14		2		2	1			7 (58%)	Resistente			
		19A 19F			1		1							
Total <2 anos			3	3	1	2	2	1		12				
5-14 anos	≤0,06µg/mL	11A/D 12F/A					1			4 (100%)	Sensível			
		18(A/B/C/F) 7F/A					1		1					
		Total 5-14 anos						2	2			4		
	15-29 anos	≤0,06µg/mL	3 38 10A							1 1	12 (92%)	Sensível		
12F/A					1	1		2	1					
15A			1											
18(A/B/C/F) 19A				1	1		1							
>0,12µg/mL			12F/A				1						1 (8%)	Resistente
			Total 15-29 anos			1	1	2	2	1				
>60 anos	≤0,06µg/mL	3 5 10A 11A/D		1			1		1	6 (75%)	Sensível			
		16F		1										
		>0,12µg/mL	23F 6A/B/C		1				1			2 (25%)	Resistente	
			Total >60 anos				3	1	2					
	Total Geral			4	7	4	6	5	6	5	37	27 (73%) Sensível 10 (27%) Resistente		

CLSI 2011: ≤ 0,06µg/mL sensível e ≥ 0,012µg/mL

Tabela 15 - Perfil de sensibilidade de cepas de *S. pneumoniae* à ceftriaxona por faixa etária, sorotipo e por ano em infecção meningea

Faixa etária	CIM	Sorotipo	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total	Interpretação
< 2 anos	≤0,5µg/mL	14				2					
		19F					1			4 (67%)	Sensível
		6A/B/C						1			
	1µg/mL	14					1			2 (33%)	Intermediário
		19A			1						
Total < 2 anos					1	2	2	1		6	
5 a 14 anos	≤0,5µg/mL	12F/A							1		
		18A/B/C/F					1			3 (100%)	Sensível
		7F/A							1		
	Total 5 A 14 anos						1		2	3	
15 a 59 anos	≤0,5µg/mL	3							1		
		38							1		
		10A						1		8 (89%)	Sensível
		12F/A			1				1		
		18A/B/C/F			1			2			
	1µg/mL	12F/A				1				1 (11%)	Intermediário
Total 15 a 59 anos					2	1		3	3	9	
> 60 anos	≤0,5µg/mL	3				1					
		5		1							
		10A				1					
		11A/D			1					7 (100%)	Sensível
		16F		1							
		23F		1							
		6A/B/C						1			
Total > 60 anos				3	1	2		1		7	
Total Geral				3	4	5	3	5	5	25	22 (88%) Sensível 3 (12%) Intermediário

CLSI 2011: ≤ 0,5 µg/mL sensível; 1µg/mL intermediário; ≥ 2,0µg/mL resistente

Tabela 16 - Perfil de sensibilidade de *S. pneumoniae* à penicilina em isolados de infecção não meningea por faixa etária, sorotipo e ano.

Faixa etária	CIM	Sorotipo	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total	Interpretação
<2 anos	≤2 µg/mL	14	3	9	4	12	6	1			
		6A/B/C	2	4	6	2	2		1		
		5		2	2	1					
		19A	1	1		1		1			
		19F		1	1	1					
		12F/A		1			2				
		3		1	1				1		
		23F				1				79	(99%) Sensível
		9V/A			1			1			
		18(A/B/C/F)				1					
		10A							1		
		7F/A			1						
		1		1							
		4		1							
NT				1							
4 µg/mL	23F			1					1	(1%) Intermediário	
Total <2 anos		6	21	18	19	10	3	3	81		
2-4 anos	≤2 µg/mL	5			2	4	1				
		14		1			4				
		1		0	2	1					
		6A/B/C		1							
		19A					1			21	(95%) Sensível
		12F/A		1							
		18(A/B/C/F)							1		
		4		1							
		NT							1		
		14 µg/mL	14		1						1
Total 2-4 anos		5	4	5	6			2	22		
5-14 anos	≤2 µg/mL	5		1		1	1				
		1			2				1		
		6A/B/C				1					
		18(A/B/C/F)				1				11	(100%) Sensível
		3						1			
		7F/A						1			
		9N/L						1			
Total 5-14 anos		1	2	3	1	3	1	1	11		
15-49 anos	≤2 µg/mL	12F/A		1		3	2	1	4		
		5	3	3	1	1	1	1			
		7F/A		1	1	1		2	3		
		8		1				3	1		
		4			2				2		
		1			2	1					
		14		1			1				
		6A/B/C		1		1					
		18(A/B/C/F)		1					1	59	(100%) Sensível
		NT	1		1						
		19F		1	1						
		9N/L		1				1			
		22F						1	1		
		19A					1				
		3		1							
23F				1							
15A						1					
Total 15-49 anos		4	12	8	8	5	10	12	59		
>50 anos	≤2 µg/mL	12F/A		1	1		1				
		5				1					
		7F/A		1							
		8	1								
		4						1			
		14	1	2		1					
		19A							1		
		3		1					1	23	(100%) Sensível
		23F		1				1			
		15A				1					
		9V/A						1			
		10A			2						
		34		1							
		17F		1							
31						1					
Total >50 anos		2	8	3	3	1	4	2	24		
Total Geral		12	47	35	38	23	20	20	195	193 (99%) Sensível 2 (1%) Intermediário	

CLSI 2011: ≤ 2,0 µg/mL sensível; 4µg/mL intermediário; 8µg/mL resistente

Tabela 17 - Perfil de sensibilidade de *S. pneumoniae* à ceftriaxona em isolados de infecções não meningea por faixa etária, sorotipo e ano.

Faixa etária	CIM	Sorotipo	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total	Interpretação	
<2 anos	≤1 µg/mL	14		7	4	12	6	1				
		6A/B/C	1	2	6	1	1		1			
		19A	1	1		1		1				
		5		2	2							
		12F/A		1			2					
		19F		1	1							
		3		1	1				1			
		4		1						66 (99%)	Sensível	
		18(A/B/C/F)					1					
		NT			1							
		1		1								
		7F/A			1							
		23F				1						
		9V/A			1							
		10A							1			
Total <2 anos			2	17	18	16	9	2	3	67		
2 a 4 anos	≤1 µg/mL	14		1			4					
		6A/B/C		1								
		19A					1					
		5			2	2	1			17 (100%)	Sensível	
		4		1								
		18(A/B/C/F)						1				
		NT						1				
		1			2							
		Total 2 a 4 anos			3	4	2	6		2	17	
		5 a 14 anos	≤1 µg/mL	1			2				1	
5				1		1						
6A/B/C						1				8 (100%)	Sensível	
3								1				
18(A/B/C/F)						1						
Total 5 a 14 anos			0	1	2	3	0	1	1	8		
15 a 49 anos	≤1 µg/mL	12F/A		1		2	2		4			
		5	1	3	1		1	1				
		7F/A		1	1			2	3			
		4			2				2			
		1			2	1						
		19F		1	1							
		8		1					1			
		9N/L		1				1				
		22F						1	1	46 (100%)	Sensível	
		6A/B/C		1								
		3		1								
		18(A/B/C/F)							1			
		14					1					
		19A						1				
		NT			1							
		23F				1						
		15A							1			
Total 15 a 49 anos			1	10	8	4	5	6	12	46		
>50 anos	≤1 µg/mL	3		1					1			
		12F/A		1	1							
		23F		1				1				
		10A			2							
		7F/A		1								
		14		1						16 (100%)	Sensível	
		19A							1			
		15A				1						
		9V/A						1				
		34		1								
		17F		1								
Total >50 anos				7	3	1		2	2	15		
Total Geral			3	38	35	26	20	11	20	153	152 (99%) Sensível 1 (1%) Intermediário	

CLSI 2011: ≤ 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL intermediário; ≥4 µg/mL resistente

Figura 15 – Perfil de sensibilidade da penicilina dos sorotipos de *S. pneumoniae*

Figura 16 – Perfil de sensibilidade da ceftriaxona dos sorotipos de *S. pneumoniae*

A Figura 15 demonstra todos os sorotipos que apresentaram pelo menos um isolado com CIM de penicilina igual ou maior que 0,12µg/mL. Neste estudo apenas 10 sorotipos apresentaram CIM 0,12µg/mL. Na Figura 16 foi realizado o mesmo estudo

com a ceftriaxona e nela estão demonstrados todos os sorotipos que tiveram pelo menos um isolado com CIM de 1 µg/mL, ou maior.

Tabela 18- Perfil de sensibilidade de *S. pneumoniae* aos antibióticos pelo método de disco-difusão

Antibiótico	Testados	Sensível (n(%))	Intermediário (n(%))	Resistente
Clindamicina	228	219(96%)	8(3,5%)	1(0,5%)
Cloranfenicol	228	226(99%)	0	2(1%)
Eritromicina	228	216(95%)	0	12(5%)
Levofloxacina	194	191(98,5%)	2(1%)	1(0,5%)
Rifampicina	231	231(100%)	0	0
Sulfametoxazol-trimetoprim	231	116(50%)	12(5%)	103(45%)
Tetraciclina	220	197(90%)	8(3%)	15(7%)

Na Tabela 18 está demonstrado o perfil de sensibilidade pelo método de disco-difusão dos antibióticos normalmente testados em nosso serviço. Observa-se que excetuando o sulfametoxazol-trimetoprim os isolados são, na maioria, sensíveis a essas drogas.

4.8. Multilocus Sequence Typing (MLST)

O resultado de todas as cepas sorotipo 14 (52 cepas) das quais foi realizado o MLST encontra-se na Tabela 19 onde podemos observar que das 52 cepas testadas, 51 pertenceram ao ST 156 que é o clone Spain^{9V}-3 que está associado à resistência, e apenas uma cepa apresentou uma ST que ainda não possui depósito.

Tabela 19 - Resultado do MLST

Quantidade de cepas	Número dos alelos							ST
	<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>	
51	7	11	10	1	6	8	1	156
1	8	10	10	16	6	26	1	Não depositado

4.9. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

O PFGE foi realizado em todas as 52 cepas do sorotipo 14, as mesmas nas quais foi realizado o MLST.

Observamos 3 clusters e quatro cepas não relacionadas (Tabela 20), cabe ressaltar que a única cepa que não foi ST156 mostrou não ter similaridade com os outros isolados.

Os padrões de banda do PFGE foram inicialmente analisados visualmente, seguindo os critérios de Tenover e colaboradores (1995), e em seguida foi analisado usando o programa Bionumerics (Applied Maths, versão 6.6, Bélgica). As fotos dos geis foram importadas para programa invertidas e com 8 bits de resolução.

O dendograma foi construído com coeficiente de Dice, otimização 0,7% e tolerância de 2%. Foram considerados clusters isolados com mais de 80% de similaridade (Figura 17).

Os isolados foram definidos como epidemiologicamente relacionados se apresentaram mais do que 80% de similaridade no dendograma e um cluster foi definido como três ou mais isolados.

Tabela 20 - Análise dos resultados do PFGE

Cluster	Porcentagem de similaridade	Número de isolados	Classificação
A	81,7%	41	A1 a A32
B	84,8%	4	B1 a B4
C	83,5%	3	C1 a C3

Figura 17 – Dendrograma de similaridade genética entre as 52 cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 14 (PFGE), método de agrupamento UPGMA (Coeficiente de Dice).

Na Figura 18 podemos observar algumas características do cluster A. Destaca-se que 53% das cepas tiveram o CIM de 1µg/mL para ceftriaxona, que para isolados de infecções meníngeas, é resistência intermediária. Esse fato é preocupante por ser a ceftriaxona a droga de escolha para o tratamento de meningite bacteriana. Quanto a penicilina, para infecções meníngeas, apenas uma cepa apresentou sensibilidade (0,064µg/mL).

Para infecções não meníngeas todos os isolados foram sensíveis à ceftriaxona e para penicilina apenas um isolado apresentou resistência intermediária (4µg/mL).

Na Figura 18 - estão demonstradas as principais características do cluster A, predominante em nosso estudo.

Figura 18- Principais características das 41 cepas de *S. pneumoniae* pertencentes ao cluster A analisadas por PFGE

5. Discussão

S. pneumoniae é o principal patógeno bacteriano predominante como causas de pneumonia adquirida na comunidade, exacerbação aguda de bronquites crônicas, meningite, sinusite e bacteremia, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A cada ano, milhões de pessoas morrem de doenças pneumocócicas. Mesmo em países desenvolvidos, os casos fatais permanecem em grande número, apesar de haver tratamento antimicrobiano disponível, das taxas de resistência pneumocócica para infecções não meníngeas serem baixas e não haver sido relatado caso de falência de tratamento para pneumonia pneumocócica. Um considerável número de pacientes, infectados por *S. pneumoniae*, morrem nas primeiras 48 horas e essas mortes prematuras não podem ser evitadas pelo tratamento antimicrobiano (PLETZ et al., 2010)

Estudos sugerem que existe uma relação entre a epidemiologia da doença pneumocócica e os sorotipos. Sorotipos que possuem uma cápsula mais espessa geralmente são mais prevalentes entre os isolados pediátricos e são menos associados a doenças invasivas, e tendem a causar infecções mais sérias quando invadem. Assim, cápsulas mais espessas seriam úteis na colonização, na persistência da bactéria na nasofaringe, no pulmão e sangue por protegerem a bactéria do sistema imune do hospedeiro, porém este mesmo tipo de cápsula também dificulta a passagem da bactéria através células epiteliais (WEINBERGER et al., 2010).

A cápsula polissacarídea é o principal fator de virulência do pneumococo e confere resistência da bactéria à fagocitose, anticorpos específicos conferem proteção contra doença invasiva. Muitos estudos exploram a relação entre tipo capsular e mortalidade em doenças invasivas. As taxas de mortalidade causadas por diferentes sorotipos mostram variações consideráveis. Há relatos de 8% de casos fatais de bacteremia pneumocócica causada pelo sorotipo 1, enquanto que para o sorotipo 3 foi de 55% (GARAU; CALBO, 2007).

A acurácia na determinação do sorotipo das cepas de *S. pneumoniae* é extremamente importante no desenvolvimento de vacina. O monitoramento dos sorotipos predominantes é importante, antes e após a introdução da vacina, pois permite observar se ocorre a substituição dos sorotipos vacinais por não vacinais.

Como exemplo dessa substituição, nos EUA foi observado aumento do sorotipo 19A isolado de crianças e adultos no período pós-vacina, ressaltando a necessidade da constante vigilância dos sorotipos para determinar a mudança na epidemiologia dessa bactéria (PAI et al., 2006).

Noventa e três tipos capsulares diferentes de *S. pneumoniae* foram detectados até o momento. Apesar dessa grande variedade, apenas um grupo restrito de sorotipos e sorogrupos são responsáveis pela maioria das doenças invasivas, principalmente em crianças e é importante ressaltar que a prevalência dos sorotipos podem variar de acordo com a região demográfica e no período de tempo estudado (BRITO et al., 2003).

A existência dessa quantidade de tipos capsulares diferentes dificulta o desenvolvimento de uma técnica molecular para a realização da tipagem, por esse motivo Pai e colaboradores (2006) desenvolveram um método de tipagem capsular para o qual foram escolhidos os sorotipos e/ou sorogrupos mais frequentemente associados com as doenças invasivas, que foram divididos em sete reações sequenciais multiplex. Com o objetivo de adaptar essa tipagem com os sorotipos frequentemente isolados na América Latina, Dias e colaboradores (2007) modificaram essa reação e utilizaram 30 pares de iniciadores divididos em seis reações sequenciais de Multiplex PCR e em todas reações um controle interno *cpsA* foi incluído.

As seis reações foram padronizadas com cepas controle gentilmente cedidas pela Dra. Fabiana Pimenta do CDC, todos os tipos capsulares presentes nas reações possuíam uma cepa enviada do CDC para a realização da padronização. O processo de padronização foi trabalhoso, pois as reações apresentavam muitas bandas inespecíficas dificultando a determinação dos sorotipos e vários ajustes foram realizados, principalmente na concentração de magnésio. Desta forma foi possível deixar a reação mais estridente e assim facilitar a determinação do tipo capsular, uma vez que o tamanho do produto de amplificação do DNA determina o sorotipo. Recomendamos, para facilitar a determinação do sorotipo, que em todas as reações sejam incluídas cepas controle.

O método Multiplex PCR utilizado neste estudo com iniciadores que possuem como alvo o gene *cps* é muito promissor, pois das 232 cepas de *S. pneumoniae*, em 153 (66%) foi possível identificar o tipo capsular, para 75 (32%) foi possível

identificar o sorogrupo e apenas 4 (2%) amostras não foram tipáveis por este método. A reação apresentou 100% de especificidade.

Embora a técnica de Multiplex PCR não seja capaz de identificar todos os tipos capsulares de *S. pneumoniae*, a informação fornecida pelas reações permite reduzir a utilização do método convencional, a Reação de Quellung, que é uma técnica mais trabalhosa, que necessita de profissionais mais experientes, é mais cara e sua execução é restrita a poucos centros de referência (BRITO et al., 2003).

A escolha dos sorotipos incluídos nas reações sequenciais foi feita com base na prevalência desses sorotipos/sorogrupos na população estudada, o esquema proposto por Dias e colaboradores (2006) foi eficiente para o estudo de nossas cepas, principalmente até a introdução da vacina. Os sorotipos mais frequentes são determinados nas primeiras reações e após a introdução da vacina observamos que ocorreu uma alteração na frequência dos tipos capsulares mais isolados por isso sugerimos mudança na sequência das reações de tipagem.

Para a melhor visualização das mudanças que a introdução da vacina ocasionou, o período estudado foi dividido em dois momentos, antes da introdução da vacina (2005 a 2009) e depois (2010 a 2011). No período de 2005 a 2009, 85% das cepas foram tipadas nas três primeiras reações, sendo 46% na primeira reação, 29% na segunda e 10% na terceira. No período de 2010 a 2011, 63% foram tipadas nas três primeiras reações, porém apenas 14% das amostras foram detectadas na primeira reação, isso se deve ao fato de que todos os tipos capsulares, que fazem parte dessa reação, são vacinais, 18% na segunda reação e 31% na terceira. Em nosso estudo, no período de 2010 a 2011, a reação 3 foi a que mais determinou os tipos capsulares e a reação 4, com 19% dos isolados, foi a segunda. Com isso podemos concluir que com apenas a mudança na ordem da sequência das reações a determinação do tipo capsular será mais rápida e com menor custo.

O mecanismo de resistência à penicilinas em *S. pneumoniae* ocorre a partir de mudanças estruturais nos alvos da penicilina, proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) 1A, 2X e 2B. Essas alterações resultam em redução da afinidade para penicilina, bem como para os outros beta-lactâmicos (LIÑHARES et al., 2010).

Apesar dos 93 sorotipos descritos, a resistência à penicilina é mundialmente associada a poucos sorotipos: 6B, 6A, 9V, 14, 15A, 19F, 19A e 23F, que são chamados “sorotipos pediátricos”. Nos anos 2000 vários países introduziram a vacinação anti-pneumocócica com a vacina 7 valente que contém os seguintes

sorotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23 F. O resultado obtido por esses países foi um declínio acentuado nos índices de resistência à penicilina em cepas de *S. pneumoniae* (LIÑHARES et al., 2010; WHITNEY et al., 2003; AGUIAR et al., 2008; DAGAN; KLUGMAN, 2008).

Em nosso estudo observamos o mesmo, com a introdução da vacina houve uma diminuição dos sorotipos 14, 23F, 6B, e 9V, que são associados a resistência aos beta-lactâmicos, e estão presentes na vacina adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Em 2009, 54% das cepas de *S. pneumoniae* apresentaram CIM entre 0,12 a 2 µg/mL, em 2010 caiu para 19% e em 2011 apenas 4% das cepas isoladas apresentaram esse CIM. Com a ceftriaxona o mesmo ocorreu, em 2009 39% das cepas isoladas de *S. pneumoniae* apresentaram CIM de 1 µg/mL, em 2010 apenas 4% e em 2011 nenhuma cepa com esse perfil foi isolado de DPI.

A distribuição das cepas de *S. pneumoniae* entre os sexos foi observada no nosso estudo, sendo maior a frequência em pessoas do sexo masculino (62 %), esses resultados são semelhantes ao encontrados por Weisberg, 2007. Até o momento não foram encontrados fatores que justifiquem essa diferença.

A distribuição dos sorotipos/sorogrupos encontrados em nosso estudo foi semelhante aos achados de outros autores (Scott e colaboradores em 1996, Imöhl e colaboradores em 2010), a diversidade de sorotipos causadores de DPI em crianças foi menor e esses sorotipos são relacionados com a resistência aos beta-lactâmicos (14, 6A/B/C, 18A/B/C, 19A).

Em adultos encontramos uma maior variedade de sorotipos associados a DPI. A faixa etária de 15 a 59 anos teve 56% dos isolados concentrados nos sorotipos/sorogrupos 12F/A, 5, 7F/A e 8, já a faixa etária maior de 60 anos o sorotipo 14 foi o mais frequente, mas diferentemente das crianças, outros tipos capsulares se destacaram.

Em um amplo levantamento bibliográfico realizado por Freikin e Klugman (2001) os autores acompanharam a trajetória dos sorotipos predominantes ao longo do tempo. Os sorotipos 1, 3 e 5 foram os mais frequentes em 1936 e eram considerados “epidêmicos” pois sempre foram acompanhados de surtos entre pessoas que residiam próximas. Apesar de sua prevalência esses sorotipos raramente eram isolados de colonização. Com a introdução da penicilina e com o passar dos anos, até a metade do século XX as infecções pneumocócicas haviam

desaparecido dos EUA. O uso de antibiótico era grande e exerceu uma pressão seletiva que favoreceu a colonização do trato respiratório superior por cepas que apresentassem algum grau de resistência em pacientes que estivessem tomando antibiótico. A pressão seletiva é mais ativa em pessoas colonizadas que infectadas e é esse tipo de pressão é que leva a resistência bacteriana aos antibióticos, pois quando ocorre uma doença invasiva, a dose do antibiótico é maior e adequada para o tipo de infecção e normalmente elimina a bactéria, isso explica a resistência das cepas colonizadoras e suas escolhas como alvos para o desenvolvimento de vacinas polissacarídeas (FREIKIN ; KLUGMAN, 2001).

Em nosso estudo foi analisada a diversidade genética de todas as cepas do sorotipo 14. Esse sorotipo foi escolhido por ter sido o mais frequente em nosso serviço (52 cepas) e por estar associado à resistência.

Pela técnica de MLST, 51 das 52 cepas foram classificadas como ST 156 (Spain^{9V}-3), esse clone está disseminado mundialmente e normalmente é composto pelos sorotipos 14 ou 9V, surgiu na Espanha nos anos 1980 e permaneceu como causa comum de infecções em diversos países como França, Dinamarca, Alemanha e Holanda (VICKERS et al., 2011).

Os nossos resultados estão em concordância com Brandileone e colaboradores (1998) que afirmou que este clone é predominante no Brasil e foi relatado no Brasil, em meados dos anos 1990, em crianças com DPI e mais recentemente em nasofaringe de adultos portadores da Síndrome Imunodeficiência Adquirida (SIDA). (NICOLETTI et al., 2007)

Klugman (2002) relatou que dentro de uma área geográfica circulam um pequeno número de clones multi-resistentes, esse dado é compatível com nossos achados, pois a grande maioria de nossas amostras pertencem a um clone e a nossa população estudada é de uma região restrita da cidade de São Paulo.

Esse fato justifica também a pouca variação de clusters encontrada pela técnica de PFGE, onde encontramos que 79% das amostras pertencem a um mesmo cluster (A).

6. Conclusão

A técnica de Multiplex PCR mostrou ser excelente ferramenta para a detecção dos sorotipos/sorogrupos de *S. pneumoniae* apenas quatro cepas não foram tipadas por esse método e apresentou excelente especificidade.

Essa técnica possui limitação com relação a alguns sorotipos pois só é possível determinar o sorogrupo, e no desenvolvimento de novas vacinas e na avaliação da eficácia da vacina é importante a determinação do sorotipo.

Existe uma relação entre os sorotipos e o perfil de sensibilidade das cepas de *S. pneumoniae*, como existe também uma relação entre os sorotipos e a faixa etária, porém não em relação ao sexo.

O estudo da diversidade genética demonstrou grande similaridade entre cepas de pneumococo sorotipo 14 tanto pela técnica de MLST como por PFGE.

Foi observada a diminuição dos sorotipos vacinais e o aumento de sorotipos não vacinais, ocorreu também a diminuição da resistência aos beta-lactâmicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO, C. I.; CASTAÑEDA, E.; CORSO, A.; REGUEIRA, M.; BRANDILEONE, M.C.C.; BRANDÃO, A.P.; MALDONADO, A.; HORMAZABAL, J. C.; TAMARGO, I.; AVILES, G.E.; SOTO, A.; VIVEROS, M.G.; HERNÁNDEZ, I.; CHAMORRO, G.; WEILER, N.; SÁNCHEZ, J.; FERIS, J.M.; CAMOU, T.; GARCIA, G.; SPADOLA, E.; PAYARES, D.; GABASTOU, J.M.; FABIO, J.L.D.; E O GRUPO SIREVA II. Resistencia a antibióticos no betalactámicos de aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* en niños latino-americanos. SIREVA II, 2000-2005. **Revista Panamericana Salude Publica**, v. 25, n. 4, p. 305-313, 2009.

AGUIAR, S.I.; SERRANO, I.; PINTO, F.R.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine. **Clinical Microbiol Infect.** v 14, p. 835-843, 2008.

ALANEE, S. R. J.; MCGEE, L.; JACKSON, D.; CHIOU, C.C.; FELDMAN, C.; MORRIS, A. J.; ORTQVIST, A.; RELLO, J.; LUNA, C.M.; BADDOUR, L.M.; IP, M.; YU, V.L.; KLUGMAN, K.P. Association of Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with Disease Severity and Outcome in Adult: An International Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 46-51, 2007.

ANSALDI, F.; CANEPA, P.; FLORENTIIS, D.; BANDETTINI, R.; DURANDO, P.; ICARDI, G. Increasing Incidence of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A and Emergence of Two Vaccine Escape Recombinant ST695 Strains in Liguria, Italy, 7 Years after Implementation of the 7-Valent Conjugated Vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, n. 2, p. 343-345, 2011.

APPELBAUM, P.C. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Drug Selection. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1613-1620, 2002.

BALACHANDRAN, P.; WALTER, A.B.; JULKUNEN, A.V.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E. Role of Pneumococcal Surface Protein C in Nasopharyngeal Carriage and Pneumonia and Its Ability To Elicit Protection against Carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2526-2534, 2002.

BAROCCHI, M. A.; RIES, J; ZOGAJ, X.; HEMSLEY, C.; ALBIGER, B.; KANTH, A.; DAHLBERG, S.; FERNEBRO, J.; MOSCHIONI, M.; MASIGNANI, V.; HULTENBY, K.; TADDEI, A.R.; BEITER, K.; WARTHA, F.; EULER, A. V.; COVACCI, A.; HOLDEN, D.W.; NORMARK, S.; RAPPUOLI, R.; NORMARK, B. H. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n. 8, p. 2857-2862, 2006.

BERGMANN, S.; HAMMERSCHMIDT, S. Versatility of pneumococcal surface proteins. **Microbiology**, v. 152, n. 2, p. 295-303, 2006.

BOGARET, D.; GROOT, D.B; HERMANS, P.W. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases**. V.4, p. 144-154, 2004,

BRANDILEONE, M. C. C.; CASAGRANDE, S.T.; GUERRA, M.L.L.S.; ZANELLA, R.C.; ANDRADE, A. L. S. S.; DI FABIO, J. L. Increase in numbers of β -lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 567-574, 2006.

BRITO, D.A.; RAMIREZ, M.; LENCASTRE, H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2378-2384, 2003.

BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K. The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* Encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross reactive antibodies to PspA and provides Immunity to pneumococcal bacteremia. **Infection and Immunity**. V. 67, n. 12, p. 6533-6542, 1999.

BRUEGGEMANN, A. B.; GRIFFITHS, D. T.; MEATS, E.; PETO, T.; CROOK, D.W.; SPRATT, B.G. Clonal Relationships between Invasive and Carriage *Streptococcus pneumoniae* and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potencial. **The Journal of Infection Diseases**, v. 187, n. 9, p. 1424-1432, 2003.

BRUEGGEMANN, A. B.; PETO, T. E. A.; CROOK, D. W.; BUTLER, J. C.; KRISTINSSON, K. G.; SPRATT, B.G. Temporal and Geographic Stability of the Serogroup-Specific Invasive Disease Potencial of *Streptococcus pneumoniae* in Children. **The Journal of Infection Disease**, v. 190, n. 7, p. 1203-1211, 2004.

CALIX, J.J; NAHM, M.H. A New Pneumococcal Serotype, 11E, Has a Variably Inactivated *wcjE* Gene. **The Journal of Infection Diseases**, v. 202, n. 1, p. 29-38, 2010.

CATTERALL, J.R. *Streptococcus pneumoniae*. **Lung Infections**, v. 54, p. 929-937, 1999.

CHARPENTIER, E.; TUOMANEN, E. Mechanisms of antibiotics resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1855-1864, 2000.

CHIOU, A. C.; ANDRADE, S. S.; ALMEIDA S. C. G.; ZANELLA, R. C.; ANDRADE, A. L.; BRANDILEONE, M.C.C. Molecular assessment of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in Brazil: evidence of clonal replacement. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 839-844, 2008.

CLAVERY, J.P.; PRUDHOMME, M.; BARRIÈRE, I.M.; MARTIN, B. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? **Molecular Microbiology**. V. 35, n. 2, p. 251-259, 2000.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty first informational supplement. CLSI Publication M100-S21, v. 31, n. 1, 2011.

DAGAN, R.; KLUGMAN, K.P. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. **Lancet Infection Disease**, v. 8, p. 785-795, 2008.

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

DURMAZ, R.; OTLU, B.; KOKSAL, F.; HOSOGLU, S.; OZTURK, R.; ERSOY, Y.; AKTAS, E.; GURSOY, N. C.; CALISKAN, A. The optimization of a rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **The Journal of Infection Disease**, v. 62, n. 5, p. 372-377, 2009.

ELBERSE, K.E.M.; NUNES, S.; SÁ-LEÃO, R.; HEIDE, G.J.; SHOULDERS, L.M. Multi-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. 1-8, 2011.

ENGELHARD, DAN.; POMERANZ, S.; GALLITY, R.; STRAUSS, N.; TUOMANEN, E. Serotype-related differences in inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in experimental meningitides. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 4, p. 979- 982, 1997.

ENRIGHT M.C.; SPRATT, B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiology**. V.144, p. 3049-3060, 1998.

FEIKIN, D.R.; KLUGMAN, K.P. Historical changes in pneumococcal serogroup distribution: implications for the era of pneumococcal conjugate vaccines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 547-555, 2002.

GARAU, J.; CALBO E. Capsular Types and Predicting Patient Outcomes in Pneumococcal Bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 52-54, 2007.

GLADSTONE, R. A.; JEFFERIES, J. M.; FAUST, S.N.; CLARKE, S.C. Continued control of pneumococcal disease in the UK – the impact of vaccination. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2011.

GREBE, T.; HAKENBECK, R. Penicillin-Binding Proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* Are Primary Resistance Determinants for Different Classes of β -Lactam Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 4, p. 829-834, 1996.

GREENBERG, D. The Shifting Dynamics of Pneumococcal Invasive Disease after the Introduction of the Pneumococcal 7-Valent Conjugated Vaccine: Toward the New Pneumococcal Conjugated Vaccines, **Clin Infect Dis**, Oxford, v. 49, p. 213-215, 2009.

HAUSDORFF, W.P.; FEIKIN, D.R.; KLUGMAN, K.P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 83-93, 2005.

HIDALGO, M.; CASTAÑEDA, E.; ARIAS, C. A.; ARIAS, C. A. Tolerance to vancomycin in a multiresistant, Colombian isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 300-302, 2003.

HO, P.L.; CHIU, S.S.; ANG, I.; LAU, Y.L. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine, Hong Kong, 1995-2009. **Vaccine**, v. 29, p. 3270-3275, 2011.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: Mosaic Genes and Evidence for Past Recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5889-5900, 2000.

IMÖHL, M.; REINERT, R.R.; OCKLENBURG, C.; LINDEN, M., Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with age, invasive pneumococcal diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1291-1296, 2010.

JIN, P.; KONG, F.; XIAO, M.; OFTADEH, S.; ZHOU, F.; LIU, C.; RUSSELL, F.; GILBERT G. L. First Report of Putative *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6D among Nasofaringeal Isolates from Fijian Children. **The Journal of Infection Disease**, v. 200, n. 9, p. 1375-1380, 2009.

JOURDAIN, S.; DRÈZE, P.A.; VANDEVEN, J.; VERHAEGEN, J.; MELDEREN, L.V.; SMEESTERS, P.R. Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *S. pneumoniae*. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 1-9, 2011.

KADIOGLU, A.; WEISER, J.N.; PATON, J.C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature**, v. 6, n. 4, p. 287-301, 2008.

KLUGMAN, K.P. Pneumococcal Resistance to Antibiotic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 2, p. 171-196, 1990.

KLUGMAN, K.P. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 1-5, 2002.

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

LYNCH III, J.L.; ZHANEL, G.G. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 3, p. 217-225, 2010.

MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E., URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH K.; CAUGANT, D.A.; FEAVERS, I.M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MANDELL, L.A. Antimicrobial Resistance and Treatment of Community-Acquired Pneumonia. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v. 26, p. 57-64, 2005.

MANTESSE, O. C.; PAULA, A.; ALMEIDA, V. V. P.; AGUIAR, P. A. D. F.; WOLKERS, P. C. B.; ALVARES, J. R.; ALMEIDA, S.C . G.; GUERRA, M.L.L.S.; BRANDIONE, M. C. C. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 6, p. 495-502, 2009.

McGEE, L.; McDOUGAL, L.; ZHOU, J.; SPRAT, B.G.; TENOVER, F.C.; GEORGE, R.; HAKENBECK, R.; HRYNIEWWICZ, W.; LEFÉVRE, J.C.; TOMASZ, A.; KLUGMAN, K.P. Nomenclature of major antimicrobial resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 7, p. 2565-2571, 2001.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Taufkirchen, v. 16, n. 5 p. 411-418, 2010.

MITCHELL, T.J. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 413-419, 2000.

MOORE, M.R. Rethinking Replacement and Resistance. **The Journal of Infection Diseases**, Boston, v. 199, p. 771-773, 2009.

MUSHER, D.M. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell, G.I.; Bennedett, J.E.; Dolin, R. (Ed). Mandell, Douglas and Bennett's **Principles and Praticce of Infection Diseases**. 6th ed. Phifadelphia: Elsevier Churchill Livingtone, 2005. P. 2392-2411.

NICOLETTI, C.N.; BRANDILEONE, M.C.C.; GUERRA, M.L.S.; LEVIN, A.S. Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV-infected adults. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 259-265, 2007.

NORMARK, B.H.; BLOMBERG, C.; DAGERHAMN, J.; BÄTTING, P.; NORMARK, S. The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 6, p. 827-837.

NOVAES, H.M.D.; SARTORI, A.M.C.; SOÁREZ, P.C. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004-2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, p. 539-547, 2011.

Ó BRIEN, K. L.; WOLFON, L. J.; WATT, J. P.; HENKLE, E.; KNOLL, M. D.; MCCALL, N.; LEE, E.; MULHOLLAND, K.; LEVINE, O. S.; CHERIAN, T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, 2009.

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

PARADISI, F.; CORTI, G.; CINELLI, R. *Streptococcus pneumoniae* as a nosocomial infection: treatment in the era of penicillin-resistant strains. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious & Disease**, v. 7, p. 34-42, 2001.

PARK, I. H.; PRITCHARD, D. G.; CARTEE, R.; BRANDÃO, A.; BRANDILEONE, M. C. C.; NAHM, M. H. Discovery of a New Capsular (6C) within Serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1225-1233, 2007.

PATEL, S. N.; MCGEER, A.; MELANO, R.; TYRRELL, G. J.; GREEN, K.; PILLAI, D. R.; LOW, D. E. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to Fluoroquinolones in

Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3703-3708, 2011.

PINEDA, V.; FONTANALS, D.; LARRAMONA, H.; DOMINGO, M.; ANTON, J.; SEGURA, F. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children in na área of Barcelona, Spain. **Acta Paediatrica**, v. 91, n. 11, p. 1251-1256, 2002.

PLETZ, M. N.; WELTE,T.; KLUGMAN, K. P. The paradox in pneumococcal serotypes: highly invasive does not mean highly lethal. **European Respiratory Journal**, v. 36 n. 4 p. 712-713, 2010.

REINERT, R. R.; JACOBS, M. R.; KAPLAN, S. L. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: Review of the literature and implications for future vaccine development. **Vaccine**, v. 28, n. 26, p. 4249-4259, 2010.

RIJKERS, G. T.; MENS, S. P. V.; BLAD, H. V. V. What do the next 100 years hold for pneumococcal vaccination? **Expert Reviews Vaccines**, v. 9, n. 11, p. 1241-1244, 2010.

RODRIGUES, C. A.; ATKINSON, R.; BITAR, W.; WHITNEY, C. G.; EDWARDS, K. M.; MICHELL, L.; LI, J.; SUBLETT, J.; LI,C.S.; LIU,T.; CHESNEY, P.J.; TUOMANEN, E.I. Tolerance To Vancomycin in Pneumococci: Detection with a Molecular Marker and Assessment of Clinical Impact. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 190, p. 1481-1487, 2004.

ROSCH, J. W.; MANN, B.; THORNTON, J.; SUBLETT, J.; TUOMANEN,E. Convergence of Regulatory Networks on the Pilus Locus of *Streptococcus pneumonia*. **Infection and Immunity** , v. 76, n. 7, p. 3187-3196, 2008.

RUBINS, J.B.; JANOFF, E.N. Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 131, n. 1, p. 21-27, 1997.

SARTORI, A.M.C.; SOAREZ, P.C.; NOVAES, H.M.D. Cost-effectiveness of introducing the in Brazil. **Journal of Epidemiology and Community Health**, p. 1-8, 2010.

SCHRANZ, J. Pneumococcal conjugate vaccines: what do we know and what do we need? **Procedia in Vaccinology**, v. 1, p. 189-205, 2009.

SCOTT, J.A.G.; HALL, A.J.; DAGAN, R.; DIXON, J.M.; EYKYN, S.J.; FENOLL, A.; HORTAL, M.; JETTÉ, L.P.; JORGENSEN, J.H.; LAMOTHE, F.; LATORRE, C.; MACFARLANE, J.T.; SHLAES, D.M.; SMART, L.E.; TAUNAY, A. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. **Clinical Infect Diseases**, v.22, p. 973-981, 1996.

SJÖSTRÖM, K.; SPINDLER, C.; ORTQVIST, A.; KALIN, M.; SANDGREN, A.; BERENZON, S. K.; Normark, B. H. Clonal and Capsular Types Decide Whether Pneumococci Will Act as a Primary or Opportunistic Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 4, p. 451-459, 2006.

SMITH, A. M.; BOTHA, R. F.; KOORNHOF, H. J.; KLUGMAN, K. P. Emergence of a Pneumococcal Clone with Cephalosporin Resistance and Penicilin Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2648-2650, 2001.

SMITH, A.M.; KLUGMAN, K.P.; COFFEY, T.J.; SPRATT, B.G. Genetic diversity of Penicilin-Binding Protein 2B and 2X Genes from *Streptococcus pneumonia* in South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 37, n. 9, p. 1938-1934, 1993.

SUNG, H.; SHIN, H. B.; KIM, M. N.; LEE, K.; KIM, E. C.; SONG, W.; JEONG, S. H.; LEE, W. G.; PARK, Y. J.; ELIOPOULOS, G. M. Vancomycin- Tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3524-3528, 2006.

TAI, S. S. *Streptococcus pneumoniae* Protein Vaccine Candidates: Properties, Activities and Animal Studies. **Critical reviews in Microbiology**, New York, v. 32, n. 3, p. 139-153, 2006.

TARRAGÓ, D.; AGUILAR, L.; GARCIA, R.; GIMENEZ, M.J.; GRANIZO, J.J.; FENOLL, A. Evolution of Clonal and Susceptibility Profiles of Serotypes 19A *Streptococcus pneumoniae* among Invasive Isolates from Children in Spain, 1990 to 2008. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 5, p. 2297-2302, 2011.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TOMASZ, A. Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, suppl. 1, p. 85-88, 1997.

TOMASZ, A.; ALBINO, A.; ZANATI, E. Multiple Antibiotic Resistance in a Bacterium with Suppressed Autolytic System. **Nature**, Miami, v. 227, p. 138-140, 1970.

TOUMATEN, E.J.(Ed). **The pneumococcus**. Washington: MAS Press, 2004. 427p

TRZCINSKI, K.; THOMPSON, C.M.; LIPSITCH, M. Single-Step Capsular Transformation and Acquisition of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3447-3452, 2004.

TUOMANEN, E.; DURACK, D.T.; TOMASZ, A. Antibiotic Tolerance among Clinical Isolates of Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 521-527, 1986.

TUOMANEN, E.I.; AUSTRIAN, R.; MASURE, H.R. Pathogenesis of Pneumococcal Infection. **The England Journal of Medicine**, Massachusetts, p. 1280-1284, 1995.

VELASCO, E. A.; VERHEUL, A. F. M.; VERHOEF, J.; SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 591-603, 1995.

VICKERS, I.; O'FLANAGAN, D.; CAFFERKEY.; HUMPHREYS, H. Multiplex PCR to determine *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing otitis media in the Republic of Ireland with further characterization of antimicrobial susceptibilities and genotypes. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 30, p. 447-453, 2011.

WALTER, A.B.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K. The *pspC* Gene of *Streptococcus pneumoniae* Encodes a Polymorphic Protein, PspC, Which Elicits Cross-Reactive Antibodies to PspA and Provides Immunity to Pneumococcal Bacteremia. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6533-6542, 1999.

WEINBERGER, D.M.; HARBORE, Z.B.; SANDERS, A.M.; NDIRITU, M.; KLUGMAN, K.P.; RÜCKINGER, S.; DAGAN, R.; ADEGBOLA, R.; CUTTS, F.; JOHNSON, H.L.; O'BRIEN, K.; SCOTT, J.A.; LIPSITCH, M. Association of serotype with risk of death due pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 6, p. 692-699, 2010.

WEINBERGER, D. M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, Filadélfia, p. 1-12, 2011.

WEINSTEIN, M.P.; KLUGMAN, K.P.; JONES, R.N. Rationale for Revised Penicillin Susceptibility Breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: Coping with Antimicrobial Susceptibility in an Era of Resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1596-1600, 2009.

WEISBERG, S. S. Pneumococcus. **Disease-a-month:DM**, v. 53, n. 10, p. 495-502, 2007.

WHITNEY, C. G.; FARLEY, M. M.; HADLER, J.; HARRISON, L. H.; BENNETT, N. M.; LYNFIELD, R.; REINGOLD, A.; CIESLAK, P. R.; PILISHVILI, T.; JACKSON, D.;

FACKLAM, R. R.; JORGENSEN, J. H.; SCHUCHAT, A. Decline in Invasive Pneumococcal Disease after the Introduction of Protein-Polysaccharide Conjugate Vaccine. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 348 n. 18, p. 1737-1746, 2003.

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

ZÄHNER, D.; GUDLAVALLETI, A.; STEPHENS, D. S. Increase in Pilus Islet 2-encoded Pili among *Streptococcus pneumonia* Isolates, Atlanta, Georgia, USA. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, n. 6 p. 955-962, 2010.

ANEXOS

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clinda micina	Cloranfenicol	Eritromicina	CIM Penicilina	Rifampicina	Tetraciclina	Sulfametoxazol	Levofloxacina
392/05	Sangue	15 a 59 anos	F	G	Não Tipável		NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
418/05	LCR	15 a 59 anos	F	15A	15A	6	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	I	S	R
509/05	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
563/05	Sangue	< 2 anos	F	6A	6A/B/C	1	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
589/05	Sangue	< 2 anos	M	6A	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	NT	S	0,12 - 2	S	S	S	S
598/05	Sangue	15 a 59 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
615/05	Sangue	< 2 anos	M	19A	19A	2	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
625/05	Sangue	≥ 60 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
670/05	Sangue	15 a 59 anos	F	5	5	2	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	S
682/05	LCR	< 2 anos	F	10A	10A	3	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
687/05	Sangue	15 a 59 anos	M	5	5	2	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
689/05	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	NT	S	0,12 - 2	S	S	R	S
780/05	Sangue	< 2 anos	M	6B	6A/B/C	1	NT	S	S	S	0,12 - 2	S	I	S	S
803/05	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
805/05	Sangue	≥ 60 anos	M	8	8	5	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
817/05	LCR	< 2 anos	M	10A	10A	3	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	R	S	S
06/06	LCR	15 a 59 anos	M	18C	18(A/B/C/F)	2	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	I
114/06	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	NT	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
205/06	Sangue	2 a 4 anos	M	12F	12F/A	4	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
219/06	Sangue	< 2 anos	F	6B	6A/B/C	1	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
220/06	Sangue	2 a 4 anos	F	14	14	1	NT	S	S	S	≥ 4	S	S	R	S
221/06	Sangue	≥ 60 anos	F	14	14	1	NT	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
225/06	Sangue	15 a 59 anos	F	18C	18(A/B/C/F)	2	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	I
237/06	LCR	< 2 anos	M	10A	10A	3	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clinda micina	Cloranf enicol	Eritrom icina	CIM Penicilina	Rifampic ina	Tetraci clina	Sulfameto xazol	Levofloxacin
238/06	Sangue	15 a 59 anos	F	14	14	1	NT	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
262/06	LCR	< 2 anos	M	14	14	1	NT	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
290/06	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	NT	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
293/06	LCR	< 2 anos	M	14	14	1	NT	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
307/06	Sangue	< 2 anos	F	4	4	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
329/06	Sangue	15 a 59 anos	M	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
331/06	Sangue	< 2 anos	M	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
339/06	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
340/06	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	I	R	S
358/06	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
366/06	Sangue	< 2 anos	F	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	NT	R	S
367/06	Sangue	< 2 anos	M	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	R	I	S
368/06	LCR	≥ 60 anos	M	23F	23F	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	NT	S	S
393/06	Sangue	< 2 anos	F	19A	19A	2	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
394/06	L. pleural	5 a 14 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
403/06	LCR	≥ 60 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
430/06	L. pleural	2 a 4 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	NT	R	S
431/06	Sangue	≥ 60 anos	F	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
451/06	Sangue	2 a 4 anos	M	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	NT	R	S
452/06	Sangue	2 a 4 anos	M	4	4	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	NT	S	S
470/06	Sangue	< 2 anos	F	19F	19F	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
471/06	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
473/06	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	I	R	S
489/06	Sangue	< 2 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
496/06	Sangue	< 2 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	NT	R	S
497/06	Sangue	≥ 60 anos	M	23F	23F	1	≤ 0,5	R	S	R	0,12 - 2	S	S	S	S
508/06	Sangue	≥ 60 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	NT	S	S	0,12 - 2	S	NT	R	S
509/06	Sangue	15 a 59 anos	F	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	NT	S	R	0,12 - 2	S	NT	R	S

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clinda micina	Cloranf enicol	Eritrom icina	CIM Penicilina	Rifampic ina	Tetraci clina	Sulfameto xazol	Levofloxacin
510/06	Sangue	15 a 59 anos	F	9N	9N/L	3	≤ 0,5	NT	S	S	≤ 0,06	S	NT	S	S
511/06	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	NT
517/06	Sangue	< 2 anos	M	6B	6A/B/C	1	NT	S	S	S	≤ 0,06	S	R	R	S
527/06	Sangue	≥ 60 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
528/06	Sangue	15 a 59 anos	M	8	8	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
540/06	Sangue	15 a 59 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
544/06	Sangue	≥ 60 anos	M	17F	17F	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
545/06	Sangue	15 a 59 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
546/06	Sangue	15 a 59 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
553/06	Sangue	≥ 60 anos	F	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
562/06	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	NT
568/06	Sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
569/06	LCR	≥ 60 anos	F	16F	16F	6	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	NT
582/06	Sangue	< 2 anos	F	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
583/06	L. pleural	15 a 59 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	NT	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
604/06	Sangue	< 2 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
622/06	Sangue	≥ 60 anos	M	34	34	5	≤ 0,5	S	NT	S	≤ 0,06	S	S	R	NT
650/06	Sangue	15 a 59 anos	M	19F	19F	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	NT
14/07	LCR	15 a 59 anos	M	18C	18(A/B/C/F)	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
37/07	Sangue	15 a 59 anos	M	19F	19F	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
106/07	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
121/07	Sangue	15 a 59 anos	M	13	Não Tipável		≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
160/07	Sangue	15 a 59 anos	M	4	4	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
173/07	Sangue	≥ 60 anos	F	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
194/07	L. pleural	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
236/07	Sangue	5 a 14 anos	F	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
276/07	LCR	15 a 59 anos	F	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clinda micina	Cloranf enicol	Eritrom icina	CIM Penicilina	Rifampic ina	Tetraci clina	Sulfameto xazol	Levofloxacin
287/07	Sangue	< 2 anos	M	23B	Não Tipável		≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
323/07	L. pleural	< 2 anos	F	9V	9V/A	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
330/07	Sangue	< 2 anos	F	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
336/07	Sangue	< 2 anos	F	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
345/07	Sangue	≥ 60 anos	F	10A	10A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	S
367/07	LCR	≥ 60 anos	F	11A	11A/D	3	≤ 0,5	S	S	NT	≤ 0,06	S	S	R	NT
380/07	L. pleural	< 2 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	NT	≤ 0,06	S	NT	R	S
386/07	Sangue	15 a 59 anos	M	4	4	2	≤ 0,5	S	S	NT	≤ 0,06	S	NT	S	S
414/07	LCR	< 2 anos	M	19A	19A	2	1	I	S	NT	0,12 - 2	S	I	S	S
429/07	Sangue	≥ 60 anos	M	10A	10A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
440/07	L. pleural	2 a 4 anos	M	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
445/07	Sangue	2 a 4 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
449/07	Sangue	15 a 59 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
455/07	Sangue	< 2 anos	F	23F	23F	1	≥ 2	S	R	R	≥ 4	S	R	R	S
473/07	Sangue	5 a 14 anos	M	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	S
482/07	Sangue	< 2 anos	F	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
489/07	L. pleural	15 a 59 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
497/07	Sangue	2 a 4 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
501/07	sangue	< 2 anos	M	19F	19F	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
502/07	L. pleural	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
506/07	Sangue	< 2 anos	F	6A	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
531/07	Sangue	< 2 anos	M	6B	6A/B/C	1	1	R	S	R	0,12 - 2	S	R	R	S
553/07	Sangue	< 2 anos	M	6B	6A/B/C	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
598/07	sangue	2 a 4 anos	M	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
608/07	Sangue	< 2 anos	M	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
610/07	Sangue	< 2 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
611/07	Sangue	15 a 59 anos	F	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clinda micina	Cloranfenicol	Eritromicina	CIM Penicilina	Rifampicina	Tetraciclina	Sulfametoxazol	Levofloxacina
614/07	Sangue	15 a 59 anos	F	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
626/07	Sangue	< 2 anos	M	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	R	S	R	0,12 - 2	S	I	R	S
631/07	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
10/08	Sangue	< 2 anos	F	18F	18(A/B/C/F)	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	S
11/08	Sangue	15 a 59 anos	M	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
15/08	Sangue	5 a 14 anos	M	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
68/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
69/08	Sangue	≥ 60 anos	M	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
70/08	Sangue	5 a 14 anos	M	18C	18(A/B/C/F)	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
71/08	Sangue	< 2 anos	M	6A	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
91/08	L. pleural	< 2 anos	F	19A	19A	2	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	R	S	S
107/08	Sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	S
112/08	Sangue	15 a 59 anos	M	23F	23F	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
117/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
124/08	LCR	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
129/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
131/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
229/08	L. pleural	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	NT
245/08	Sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
271/08	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	NT	NT	NT	S
330/08	Sangue	≥ 60 anos	M	15A	15A	6	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
341/08	LCR	≥ 60 anos	F	10A	10A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
389/08	Sangue	2 a 4 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
396/08	L. pleural	2 a 4 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
415/08	Sangue	5 a 14 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
453/08	Sangue	< 2 anos	M	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	R	R	0,12 - 2	S	R	R	S
460/08	Sangue	< 2 anos	M	19F	19F	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
461/08	Sangue	≥ 60 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clinda micina	Cloranf enicol	Eritrom icina	CIM Penicilina	Rifampic ina	Tetraci clina	Sulfameto xazol	Levofloxacin
476/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
518/08	Sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
530/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
584/08	L. pleural	< 2 anos	M	23F	23F	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
585/08	L. pleural	2 a 4 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
613/08	Sangue	15 a 59 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
707/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
743/08	Sangue	2 a 4 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
751/08	Sangue	2 a 4 anos	M	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	S
778/08	LCR	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
797/08	Sangue	< 2 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
821/08	Sangue	≥ 60 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
822/08	Sangue	15 a 59 anos	M	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	R	S	R	0,12 - 2	S	R	I	S
823/08	LCR	< 2 anos	M	14	14	1	≤ 0,5	R	S	R	0,12 - 2	S	R	R	S
873/08	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
908/08	Sangue	15 a 59 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
926/08	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
956/08	LCR	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
995/08	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
14/09	Sangue	< 2 anos	F	6A/C	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	R	I	S
16/09	sangue	15 a 59 anos	M	19A	19A	2	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
113/09	sangue	< 2 anos	F	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
168/09	LCR	15 a 59 anos	M	19A	19A	2	≤ 0,5	R	S	R	≤ 0,06	S	R	R	S
226/09	Sangue	< 2 anos	M	19F	19F	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
287/09	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
317/09	Sangue	2 a 4 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
340/09	sangue	2 a 4 anos	F	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
470/09	Sangue	< 2 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clindamicina	Cloranfenicol	Eritromicina	CIM Penicilina	Rifampicina	Tetraciclina	Sulfametoxazol	Levofloxacina
488/09	LCR	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
508/09	Sangue	2 a 4 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
584/09	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
598/09	LCR	5 a 14 anos	M	18C	18(A/B/C/F)	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
622/09	L. pleural	2 a 4 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
648/09	Sangue	15 a 59 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
664/09	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
700/09	LCR	5 a 14 anos	F	11A	11A/D	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
701/09	Sangue	2 a 4 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
707/09	Sangue	15 a 59 anos	F	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
724/09	Sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
741/09	Sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
770/09	Sangue	< 2 anos	F	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
878/09	Sangue	< 2 anos	M	14	14	1	1	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	S
911/09	Sangue	< 2 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
989/09	Sangue	2 a 4 anos	M	19A	19A	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	NT
1095/09	Sangue	5 a 14 anos	F	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
1096/09	Sangue	≥ 60 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
1118/09	Sangue	< 2 anos	F	6B	6A/B/C	1	1	R	S	R	0,12 - 2	S	R	R	S
133/10	LCR	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	I	S
197/10	Sangue	15 a 59 anos	F	9N	9N/L	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	
263/10	LCR	< 2 anos	F	6B	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	R	≤ 0,06	S	R	S	S
264/10	Sangue	≥ 60 anos	M	4	4	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
265/10	Sangue	15 a 59 anos	M	8	8	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
322/10	Sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
361/10	L. pleural	< 2 anos	F	14	14	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	NT
377/10	Sangue	< 2 anos	F	9V	9V/A	1	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	NT
400/10	Sangue	5 a 14 anos	F	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clindamicina	Cloranfenicol	Eritromicina	CIM Penicilina	Rifampicina	Tetraciclina	Sulfametoxazol	Levofloxacina
438/10	LCR	15 a 59 anos	M	10A	10A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
439/10	Sangue	5 a 14 anos	M	9N	9N/L	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	NT
477/10	L. pleural	< 2 anos	F	19A	19A	2	1	R	S	R	0,12 - 2	S	R	R	NT
485/10	Sangue	≥ 60 anos	F	9V	9V/A	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	NT
499/10	Sangue	15 a 59 anos	F	8	8	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
500/10	LCR	≥ 60 anos	M	6A/C	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	NT
515/10	Sangue	15 a 59 anos	M	8	8	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	I	S	NT
535/10	Sangue	≥ 60 anos	M	23F	23F	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	R	NT
546/10	LCR	≥ 60 anos	F	10A	10A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	R	S	NT
569/10	L. pleural	≥ 60 anos	F	31	31	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
627/10	Sangue	15 a 59 anos	F	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
628/10	Sangue	5 a 14 anos	F	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
642/10	LCR	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
659/10	Sangue	15 a 59 anos	M	15A	15A	6	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
792/10	Sangue	15 a 59 anos	M	5	5	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
793/10	Sangue	15 a 59 anos	M	22F	22F	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
892/10	Sangue	15 a 59 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	NT
119/11	sangue	≥ 60 anos	M	19A	19A	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
287/11	LCR	5 a 14 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
296/11	sangue	< 2 anos	M	6A	6A/B/C	1	≤ 0,5	S	S	S	0,12 - 2	S	S	S	S
368/11	sangue	2 a 4 anos	M	23B	Não Tipável		≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
369/11	sangue	15 a 59 anos	M	8	8	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
403/11	LCR	15 a 59 anos	M	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
442/11	sangue	15 a 59 anos	F	18A	18(A/B/C/F)	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
543/11	sangue	15 a 59 anos	M	22F	22F	5	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
584/11	sangue	2 a 4 anos	M	18B	18(A/B/C/F)	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
606/11	sangue	5 a 14 anos	M	1	1	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S

Número	Amostra	Faixa etária	Sexo	Sorotipo IAL	Multiplex-PCR	Reação	CIM ceftriaxona	Clinda micina	Cloranfenicol	Eritromicina	CIM Penicilina	Rifampicina	Tetraciclina	Sulfametoxazol	Levofloxacina
615/11	sangue	15 a 59 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
625/11	sangue	15 a 59 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
649/11	LCR	15 a 59 anos	F	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	R	S
651/11	l. pleural	< 2 anos	F	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
660/11	sangue	15 a 59 anos	F	4	4	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
697/11	sangue	≥ 60 anos	F	3	3	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
731/11	sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
762/11	sangue	< 2 anos	F	10A	10A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
784/11	sangue	15 a 59 anos	M	4	4	2	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
792/11	sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	I	I	S
793/11	sangue	15 a 59 anos	F	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
794/11	LCR	5 a 14 anos	M	7F	7F/A	3	≤ 0,5	S		S	≤ 0,06	S	S	S	
799/11	sangue	15 a 59 anos	F	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
833/11	sangue	15 a 59 anos	M	12F	12F/A	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	S
852/11	LCR	15 a 59 anos	F	38	38	4	≤ 0,5	S	S	S	≤ 0,06	S	S	S	