

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Cristina Aparecida Borges Pereira Laval

***Streptococcus pneumoniae* isolados de nasofaringe
de crianças de Goiânia: fenotipagem e cobertura
dos sorotipos relacionados às vacinas conjugadas**

Orientadora:
Prof. Dr^a Ana Lúcia S. Sgambatti de Andrade

Tese de Doutorado

Goiânia-Go, 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Cristina Aparecida Borges Pereira Laval

Streptococcus pneumoniae **isolados de nasofaringe**
de crianças de Goiânia: fenotipagem e cobertura
dos sorotipos relacionados às vacinas conjugadas

ORIENTADORA:

Prof. Dr^a Ana Lúcia S. Sgambatti de Andrade

Tese submetida ao CPGMT/IPTSP/UFG
como requisito parcial para obtenção do
Grau de Doutor em Medicina Tropical, na
área de concentração de Epidemiologia.

Este estudo recebeu apoio financeiro da Pan American Health Organization/PAHO–
Division of Vaccines and Immunization /World Health Organization, Bill e Melinda
Gates-Children's Vaccine Program, CNPq (processos: 308043/2004-9 e
303348/2004-6) e da Secretaria de Saúde do Município de Goiânia.

Goiânia-Go, 2005

Abreviaturas

- CbpA:** proteína de superfície A ligadora de colina
- CDC:** Centers for Disease Control and Prevention
- CONEP:** Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa
- CRIE:** Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais
- CSF:** cerebrospinal fluid
- EUA:** Estados Unidos da América
- FDA:** Food and Drug Administration
- H. influenzae:*** *Haemophilus influenzae*
- IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IC 95%:** intervalo de 95% de confiança
- Ig:** imunoglobulina
- IPD:** invasive pneumococcal disease
- IRA:** infecção respiratória aguda
- MIC:** concentração inibitória mínima
- MLEE:** eletroforese de enzimas multifocais
- NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards
- NP:** nasopharyngeal
- NSP:** isolado de pneumococo não susceptível à penicilina
- OR:** *odds ratio*
- PCR:** reação de polimerização em cadeia
- PCV7:** 7-valent conjugate vaccine
- PFGE:** eletroforese em campo elétrico pulsado
- PNI:** Programa Nacional de Imunizações
- PNSp:** penicillin nonsusceptible pneumococcal
- PsaA:** proteína de superfície adesina A
- PspA:** proteína de superfície A
- PspC:** proteína de superfície C
- RTI:** acute respiratory tract infection

S. aureus: Staphylococcus aureus

S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae

SpNP: pneumococo não susceptível à penicilina

UFG: Universidade Federal de Goiás

WHO: World Health Organization

Agradecimentos

A Deus, porque só na Sua presença, tudo é possível.

Às minhas filhas do coração, Érika e Beatriz, pelo doce sorriso e palavras de “mamãe eu te amo”, em meio à turbulência dos meus pensamentos.

Ao meu esposo, Claudio Henrique Laval Silva, por ter sido além de esposo, pai e mãe de nossas filhas por muitos momentos, amigo e companheiro, e pela paciência, dedicação e muito amor.

Aos meus pais, Franézio Rufino Pereira e Divina Borges Pereira, pelo incentivo, confiança, carinho e amor, e pelas incontáveis horas com minhas filhas queridas.

À minha orientadora, Prof. Dr^a Ana Lúcia S. Sgambatti de Andrade pela confiança e dedicação em mais esta jornada, que possibilitou a oportunidade de ampliar e consolidar meus conhecimentos, vencer limites e ousar. Sem dúvida, tem uma extraordinária capacidade de trabalho, que contagia a todos. Certamente, uma amiga que eu admiro cada dia mais.

À Prof. Dr^a Fabiana Cristina Pimenta pelo aporte imprescindível no entendimento e redação deste trabalho, pela amizade, e pelo desempenho na coordenação e acompanhamento das atividades de responsabilidade do Laboratório de Microbiologia do IPTSP em parceria com o Instituto Adolfo Lutz.

Ao Prof. Renato Maurício de Oliveira, pela amizade e apoio. Àqueles que sob sua coordenação desenvolveram o trabalho de campo, muito obrigada!

À Prof. Dr^a Simonne Almeida Silva pela amizade, a disponibilidade de compartilhar conhecimentos e pela importante contribuição na análise de dados deste trabalho.

Aos colegas de Doutorado, Leandro Luis G. de Oliveira e Cáritas M. Franco, pelo incentivo, conhecimentos compartilhados e participação nas alegrias e nas dificuldades desta jornada.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela oportunidade deste trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação pelos conhecimentos ministrados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Saúde Coletiva, na pessoa do Chefe de Departamento, Prof. Renato Maurício de Oliveira, pela confiança e incentivo.

Aos Profs. Dr. Otaliba Libânio de Moraes Neto e Elias Rassi Neto, ex-Secretários Municipais de Saúde de Goiânia, pelo apoio ao Projeto e incentivo à minha participação.

À Dr^a Cristina M. C. Brandileone do Instituto Adolfo Lutz – SP pelo aporte laboratorial de sorotipagem com técnicas convencionais e com métodos de tipagem molecular (eletroforese em campo pulsado – PFGE) das cepas isoladas.

Aos colegas da Secretaria Municipal de Saúde pela amizade, incentivo, apoio, carinho e confiança, em mais esta fase de trabalho.

Aos colegas dos Departamentos de Enfermagem e Fisioterapia e de Medicina da Universidade Católica de Goiás, pelas palavras de incentivo, confiança e apoio, durante este trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na concretização deste trabalho, o meu reconhecimento e gratidão.

*Dedico este trabalho às minhas filhas **Érika** e **Beatriz**,
e ao meu esposo, **Claudio***

Sumário

| | |
|---|-----|
| Abreviaturas..... | ii |
| Agradecimentos..... | iv |
| Dedicatória..... | vi |
| Sumário..... | vii |
| Lista de Tabelas e Figuras..... | ix |
| Resumo..... | 01 |
| Abstract..... | 03 |
| 1.Introdução..... | 05 |
| Relevância do <i>Streptococcus pneumoniae</i> na infância..... | 05 |
| Epidemiologia da colonização pelo <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 06 |
| Fatores de risco associados à colonização da nasofaringe pelo pneumococo..... | 12 |
| Infecções pneumocócicas invasivas..... | 13 |
| Tipagem molecular..... | 15 |
| Intervenções preventivas – vacinas conjugadas pneumocócicas..... | 17 |
| 2.Justificativa..... | 23 |
| 3.Objetivos..... | 25 |
| 4.Material e Métodos..... | 26 |
| População e área de estudo..... | 26 |
| Coleta de <i>swabs</i> de nasofaringe e transporte..... | 27 |
| Isolamento e identificação bacteriana..... | 27 |
| Caracterização fenotípica dos isolados colizadores..... | 28 |
| Caracterização genotípica de isolados dlíquor e sangue..... | 28 |
| Análise de dados..... | 30 |
| 5.Resultados..... | 32 |
| 6.Conclusão..... | 40 |
| 7.Referências Bibliográficas..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 8.Publicações..... | 67 |
| | |
| Serotypes of carriage and invasive isolates of <i>Streptococcus pneumoniae</i> in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. Laval CB, Andrade ALSS, Pimenta FC, Andrade JG, Oliveira RM, Silva SA, Lima EC, Di Fabio JL, Casagrande ST, Brandileone MCC. <i>Clinical Microbiology and Infection</i> , Jan 2006, p. 50-55..... | 68 |
| | |
| Invasive pneumococcal infection in a healthy infant caused by two different serotypes. Andrade ALSS, Pimenta FC, Laval CAB, Andrade JG, Guerra ML, Brandileone MCC. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> , May 2004, p. 2345-2346..... | 69 |
| | |
| Anexos..... | 70 |
| Anexo 1: Lista dos vinte hospitais participantes do estudo..... | 71 |
| Anexo 2: Protocolo de investigação aprovado pelo CONEP..... | 72 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Estudos de prevalência de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em nasofaringe de crianças da América Latina..... | 10 |
| Tabela 2. Ensaios clínicos fase III do efeito das vacinas pneumocócicas conjugadas na redução de portador nasofaríngeo..... | 20 |
| Tabela 3. Características das 648 crianças com <i>swabs</i> coletados de nasofaringe em Goiânia – Go, Maio/2000 – Agosto/2001..... | 33 |
| Tabela 4. <i>Streptococcus pneumoniae</i> recuperados da nasofaringe de 648 crianças..... | 34 |
| Tabela 5. Distribuição de sorotipos de pneumococo de acordo com o perfil de susceptibilidade à penicilina..... | 34 |
| Tabela 6. Sorotipos mais freqüentes do <i>Streptococcus pneumoniae</i> em nasofaringe e doença invasiva..... | 36 |
| Tabela 7. <i>Streptococcus pneumoniae</i> identificados em nasofaringe e em doença invasiva..... | 37 |
| Tabela 8. Potenciais fatores de risco para portador nasofaríngeo de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 38 |
| Tabela 9. Fenótipo e diversidade genética de isolados de criança com meningite por <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 39 |
| Figura 1. Perfis de PFGE de dois isolados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> recuperados de uma criança com meningite..... | 39 |

Resumo

Antecedentes: A colonização do *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe é etapa determinante no aparecimento da doença invasiva pneumocócica e na disseminação de cepas resistentes na comunidade. Com o aporte da epidemiologia molecular tem sido possível evidenciar a similaridade genética entre cepa colonizadora da nasofaringe e de líquido em criança com meningite pneumocócica.

Objetivos: (i) Caracterizar isolados de pneumococos da nasofaringe quanto aos sorotipos, susceptibilidade à penicilina e cobertura das vacinas conjugadas pneumocócicas 7, 9 e 11-valente; (ii) identificar fatores de risco associados ao estado de portador de pneumococo; (iii) comparar os sorotipos e a susceptibilidade à penicilina de pneumococos da nasofaringe e os recuperados de doenças invasivas; (iv) avaliar o parentesco genético de cepas isoladas de líquido e sangue de paciente com meningite pneumocócica.

Material e Métodos: *Swabs* de nasofaringe foram coletados de 648 crianças menores de cinco anos de idade, com infecção respiratória aguda, meningite, pneumonia, e de crianças saudáveis, no período de maio de 2000 a agosto de 2001. Para comparar a resistência entre isolados colonizadores e de doença invasiva, foram selecionados 125 isolados de líquido de crianças com meningite pneumocócica pareadas por idade e período de coleta. Os pneumococos isolados foram sorotipados (reação de Quellung) e testados quanto à susceptibilidade à penicilina. O parentesco genético entre cepas de líquido e de sangue de criança com meningite pneumocócica foi avaliado pela eletroforese de campo pulsado (PFGE).

Resultados: A prevalência de portador de pneumococo foi 35,8% (IC 95% 32,1-39,6), sendo os sorotipos mais frequentes o 14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F e 18C. Sorotipos 1 e 5 foram raramente identificados. A prevalência de sorotipos não susceptíveis à penicilina (E-test) foi similar entre isolados de portador e de doença invasiva, respectivamente 19,8% e 19,2%, com predomínio dos sorotipos 6B, 14, 19F, 19A, 23B e 23F. A cobertura de sorotipos da vacina 7-valente em relação aos sorotipos colonizadores e invasivos (meningite) foi respectivamente 52,2% e 62,4% ($p>0,05$). A cobertura com a vacina 7-valente em relação aos isolados não susceptíveis à penicilina de portador e de doença invasiva foi estatisticamente semelhante, 34,5% (IC 95% 25,9-43,9) e 28,2% (IC 95% 18,6-39,5), respectivamente.

A genotipagem pela PFGE dos pneumococos isolados de uma criança com meningite mostrou padrões de DNA diferentes no líquido e no sangue, o que evidencia cepas não relacionadas epidemiologicamente.

Conclusão: A prevalência da resistência à penicilina de pneumococos de portadores e de isolados invasivos foi semelhante. O estudo mostrou o potencial benefício da vacina 7-valente na redução de portador e de pneumococos resistentes à penicilina. A análise com a PFGE de isolados de líquido e sangue de criança com meningite, mostrou tratar-se de infecção pneumocócica mista, que é um evento raro.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, portador nasofaríngeo, vacinas conjugadas pneumocócicas, sorotipos, meningite pneumocócica, PFGE.

Abstract

Background - Nasopharyngeal (NP) carriage of *Streptococcus pneumoniae* is a key factor for the development of invasive disease and spread of pneumococcal resistant strains within the community. Studies on molecular epidemiology have provided evidences that *S. pneumoniae* strains recovered from cerebrospinal fluid (CSF) of meningitis patients are the same as the strains carried in the nasopharynx of patients.

Objectives – (i) describe the frequency of pneumococcal serotypes, susceptibility to penicillin and the potential coverage of the pneumococcal conjugate vaccines on the carriage serotypes; (ii) identify risk factors associated to pneumococcal carriage; (iii) compare NP and invasive pneumococcal disease (IPD) isolates according to the penicillin susceptibility and serotypes distribution; (iv) to assess the genetic relatedness of pneumococcal strains recovered from CSF and blood of a child with pneumococcal meningitis.

Materials and Methods – A single NP swab was obtained from 648 children aged under-five with acute respiratory tract infection (RTI), meningitis and also from healthy children, during the winter period of 2000 and 2001. For comparison purposes we selected 125 invasive isolates, matched for age and time to the carrier isolates. Serotyping of pneumococcal isolates was performed by Quellung reaction and susceptibility to penicillin by the E-test. The genetic similarity of strains obtained from CSF and blood was evaluated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Results - The overall pneumococcal carriage rate was 35.8% (95%CI, 32.1-39.6). The most frequently pneumococcal serotypes found in nasopharynx were 14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F and 18C. Serotypes 1 and 5 were rarely isolated in nasopharynx. The comparison of 222 NP isolates with 125 IPD isolates showed similar prevalence of penicillin nonsusceptible pneumococcal (PNSp), respectively 19.8% and 19.2%. PNsP serotypes were similar (6B, 14, 19F, 19A, 23B and 23F) for carriage and invasive disease strains. The coverage of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) for carriage isolates (52.2%) and IPD (62.4%) did not differ ($p=0.06$). Also, no statistical difference was observed in PCV7 coverage for PNsP when comparing carriage (34.5%; 95%CI, 25.9-43.9) and invasive (28.2%;

95%CI, 18.6-39.5) isolates. Results of PFGE showed that pneumococcal strains recovered from CSF and blood of a patient with meningitis had distinct DNA profiles.

Conclusion – The prevalence of pneumococcal PNSp was similar among NP and IPD isolates. Our data suggest the good potential of PCV7 in reducing the pneumococcal carriage and carriers of PNSp due to vaccine types. A mixed pneumococcal infection, considered a rare event, was disclosed in an infant by PFGE.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, nasopharyngeal carriage, pneumococcal conjugate vaccines, pneumococcal serotypes, pneumococcal meningitis, PFGE.

1. Introdução

Relevância do *Streptococcus pneumoniae* na infância

As infecções respiratórias agudas são as principais causas de morte em crianças menores de cinco anos, especialmente em países em desenvolvimento. Aproximadamente dois milhões de crianças morrem a cada ano de infecção respiratória, sendo que 70% dessas mortes ocorrem na África e Ásia (World Health Report 2005). Dados do Ministério da Saúde do Brasil mostram que as infecções respiratórias agudas correspondem a 5,4% do total de óbitos em menores de cinco anos (Datasus 2004).

O *Streptococcus pneumoniae* é uma das principais bactérias causadoras de doenças do trato respiratório, responsável por quadros clínicos de pneumonias, meningites, sepse e otites. A relevância do pneumococo em saúde pública deve-se às suas altas taxas de morbidade e mortalidade na infância, tanto em países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento (WHO 2005). A dificuldade do diagnóstico bacteriológico da doença pneumocócica, principalmente em países não industrializados, faz com que esta infecção seja subestimada. Estima-se que a infecção pneumocócica seja responsável por 1,6 milhões de mortes por ano, em todo mundo (WHO 2005), sendo 40% das mortes por pneumonia pneumocócica em menores de cinco anos (Obaro & Adegbola 2002). Quanto às meningites pneumocócicas, estima-se que ocorram 70.000 mortes anualmente, em países em desenvolvimento (Obaro & Adegbola 2002). Nos EUA e Europa, o coeficiente de incidência anual das meningites pneumocócicas é estimado entre um a dois casos por 100.000 habitantes (WHO 2003). A letalidade por meningite pneumocócica varia de 20 a 50 por cento respectivamente, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que 30 a 60 por cento dos sobreviventes podem desenvolver seqüelas (Koedel et al. 2002). No Brasil, o coeficiente de incidência anual das meningites pneumocócicas é de 10 casos por 100.000 crianças até um ano de idade, com uma taxa de letalidade de 27,5% (Ministério da Saúde do Brasil 2003 – dados não publicados). No Estado de Goiás, a incidência de meningites pneumocócicas aumentou de 1,1/100.000 no período de

1995 a 1999, para 3,6/100.000 em 2001, dois anos após a introdução da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b em crianças menores de cinco anos (Simões et al. 2004), provavelmente devido à melhora no sistema de vigilância das meningites.

As doenças pneumocócicas invasivas, à exceção das meningites, não são de notificação obrigatória nos serviços de saúde. Portanto, os indicadores de morbidade provavelmente são subestimados, dificultando o reconhecimento da doença pneumocócica como importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento.

Epidemiologia da colonização pelo *Streptococcus pneumoniae*

O trato respiratório superior é um nicho ecológico para várias bactérias e pode ser colonizado por um amplo espectro de microrganismos. A colonização nasofaríngea é um processo dinâmico, com uma marcada competição entre as espécies bacterianas e seus sorotipos (Ghaffar et al. 1999, Tano et al. 2000, Uehara et al. 2001). A presença de infecções do trato respiratório superior, bem como o uso de antimicrobianos, são fatores importantes na alteração desse nicho (Ghaffar et al. 2002). Estudos “in vitro” têm evidenciado competição entre o pneumococo e várias outras bactérias. Assim, há diminuição do crescimento da *Neisseria meningitidis* na presença do pneumococo. Esse efeito inibitório do *S. pneumoniae* também tem sido observado em relação ao *H. influenzae* e a *Moraxella catarrhalis* (Pericone et al. 2000). A competição natural entre o *Staphylococcus aureus* e o *S. pneumoniae* contribui para a dinâmica da colonização pneumocócica em crianças (Bogaert et al. 2004, Regev-Yochay et al. 2004). Bogaert et al. (2004) em estudo com crianças e adolescentes (1 a 19 anos) mostraram maior incidência da colonização pneumocócica aos três anos (55%), sobretudo com sorotipos contidos na vacina conjugada 7-valente, decrescendo até uma estabilização (8%), após a idade de 10 anos, enquanto o pico de colonização com o *S. aureus* acontece aos 11 anos de idade. Em modelos animais, tem sido evidenciada competição entre cepas distintas de pneumococos na nasofaringe (Lipsitch et al. 2000).

A colonização pneumocócica inicia-se precocemente no primeiro ano de vida, com um rápido aumento até os dois anos de idade. Condições que levam a imunossupressão temporária ou definitiva podem não influenciar as taxas de colonização, se a resposta imune local estiver preservada (Kroon et al. 1999, Overturf 2000). A colonização na nasofaringe é seguida por disseminação horizontal do pneumococo por meio de contato interpessoal, e diretamente no meio ambiente, levando a uma propagação da bactéria na comunidade (Bogaert et al. 2001, Givon-Lavi et al. 2002). As crianças exercem papel importante nessa disseminação, atuando como transmissores da doença pneumocócica no adulto. Taxas elevadas de colonização nasofaríngea do pneumococo em adultos têm sido observadas em famílias com grande número de crianças (Hendley et al. 1975). Também, a associação entre a aquisição do pneumococo em crianças e o aparecimento de infecções pneumocócicas em outros membros da família, tem sido descrita (Sleeman et al. 2005). As crianças também atuam como vetores da transmissão de pneumococos não susceptíveis à penicilina. A seleção de cepas resistentes na nasofaringe é provavelmente a principal causa da ocorrência de pneumococos resistentes na comunidade (Dagan et al. 1998), e uma dispersão clonal de cepas multi-resistentes vem sendo registrada na literatura desde a década de 90 (Davies et al. 1999).

A colonização pelo pneumococo requer aderência ao tecido epitelial do trato respiratório. A ligação do pneumococo aos carboidratos de superfície da célula receptora (N-acetil-glicosamina) é mediada por proteínas de superfície associadas à parede celular, tais como a PsaA (proteína de superfície adesina A). A PsaA inibe a ativação do complemento e por meio de reações físicoquímicas inespecíficas, facilita a aderência às células do hospedeiro (Romero-Steiner et al. 2003). A proteína de superfície CbpA (proteína A ligadora da colina), é determinante na interação da bactéria com os glicoconjugados receptores da célula alvo, a qual interage diretamente com o polímero receptor Ig (imunoglobulina), aumentando a migração através da barreira mucosa (Hammerschmidt et al. 1997). Outra enzima pneumocócica, a neuraminidase, diminui a viscosidade do muco e favorece a exposição dos carboidratos (N-acetil-glicosamina) da superfície da célula receptora (Tong et al. 2000).

A cápsula polissacáride que recobre a superfície do pneumococo é altamente heterogênea e a diversidade química dos seus carboidratos caracteriza os 90 sorotipos de *S. pneumoniae* já identificados (Henrichsen 1995). A cápsula é o fator mais importante de virulência do pneumococo porque protege a bactéria contra a fagocitose. Uma expressão reduzida da cápsula favorece o acesso de anticorpos e complemento à superfície do pneumococo, aumentando a capacidade de “limpeza” do sistema imune (Magee & Yother 2001). A antigenicidade da cápsula é sorotipo específico, no entanto reações cruzadas podem ocorrer. Além da cápsula, enzimas como hialuronidases, neuraminidases, autolisinas, pneumolisinas e as proteínas de superfície associadas à parede celular (PspA e PsaA), estão envolvidas na virulência do pneumococo (Lock et al. 1988, McDaniel et al. 1991, Rosenow et al. 1997). Os mecanismos responsáveis pela aderência e invasão da mucosa nasofaríngea estão diretamente relacionados à estrutura e conformação dos polissacárides capsulares, bem como sua expressão ou exposição das proteínas de superfície associadas à parede celular, contribuindo para a seleção de sorotipos com maior ou menor habilidade de aderência (Kim & Weiser 1998).

Na história natural da doença pneumocócica, a partir da colonização nasofaríngea, a infecção pneumocócica pode progredir para uma infecção respiratória ou sistêmica, dependendo dos mecanismos de invasão envolvidos em sua patogênese (Obaro & Adegbola 2002). O pneumococo pode alcançar a orelha média e os seios da face por contiguidade, causando otite média e sinusite. Também, por mecanismo de aspiração da bactéria, o pneumococo pode invadir principalmente os alvéolos pulmonares, causando pneumonia, e secundariamente levar a pleurite e pericardite, e posteriormente alcançar a corrente sanguínea. Ocorrendo bacteremia por disseminação hematogênica, o pneumococo pode alcançar sítios mais distantes, como as meninges, ossos e peritônio, causando meningite, osteomielite/artrite e peritonite, além da possibilidade de um quadro séptico (Bogaert et al. 2004a).

A prevalência de sorotipos de pneumococos isolados da nasofaringe varia de país para país, grupo etário, e tipo de coorte. Prevalências de colonização pneumocócica podem variar de 2 a 86 por cento (Bogaert et al. 2004a). Na Europa a

distribuição dos sorotipos colonizantes é semelhante à dos EUA, predominando os sorotipos 19F, 6B e 23F (Syrogiannopoulos et al. 2002, Bogaert et al. 2001, Syrjanen et al. 2001, Yeh et al. 2003). Na Ásia não existe muita variabilidade nos diferentes países, predominando os sorogrupos 14, 6 e 19 entre pneumococos isolados da nasofaringe de crianças saudáveis (Coles et al. 2001, Parry et al. 2000, Soewignjo et al. 2001). No continente Africano, Rusen et al. (1997) encontraram predominância dos sorogrupos 13, 14 e 15 no Kênia. Na África do Sul (Mbelle et al. 1999) a distribuição dos sorogrupos foi semelhante à distribuição encontrada na Indonésia (Soewignjo et al. 2001) e no Kênia, à exceção do sorogrupo 13. Os estudos de portador de nasofaringe por pneumococo realizados em população pediátrica, a partir da década de 90 na América Latina, encontram-se sumarizados na Tabela 1. Embora existam variações de 14 a 69 por cento nas taxas de portador nesses estudos, os intervalos de confiança da prevalência da maioria dos resultados são sobreponíveis. Observa-se que nos estudos da década de 90 a sorotipagem era pouco realizada. A proporção de estudos que realizaram sorotipagem antes e após 2000 foi respectivamente, 40% (4/10) e 57% (4/7).

Tabela 1.Estudos de prevalência de *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe de crianças da América Latina

| Autor/ano | País/Local | Período | População | | | Prevalência | | | Sorotipos/sorogrupos prevalentes |
|-------------------------------------|--------------------------|---------|-----------|------------|--------------------|-------------|------|-------------|----------------------------------|
| | | | N | idade/anos | elegibilidade | N | % | (IC95%) | |
| Mogdasy et al 1992 | Uruguai, Montevideo | 85-89 | 1281 | < 5 | IRA e saudáveis | 294 | 22,9 | (20,7-25,3) | 14, 6A, 6B, 9V |
| Gatica-Marquina et al 1993 | México, Cuernavaca | 92 | 254 | < 6 | creche e saudáveis | 130 | 51,2 | (44,8-57,5) | Não Realizado |
| Muñoz et al 1994 | Colômbia, Bogotá | 92-93 | 200 | < 5 | creches | 92 | 46,0 | (38,9-53,1) | Não Realizado |
| Trucco et al 1996 | Chile, Santiago | 94-95 | 200 | ≤ 4 | Jardim infância | 120 | 60,2 | (52,8-66,8) | 6A |
| Novales et al 1997 | México, Tlaxcal | 94 | 450 | ≤ 5 | IRA e saudáveis | 134 | 29,7 | (25,6-34,2) | 6B, 19F, 19A, 14 |
| Sequeira et al 1997 | Argentina, B. Aires | 93-95 | 450 | < 5 | IRA | 105 | 23,4 | (19,5-27,5) | Não Realizado |
| Leal & Castañeda 1997 | Colômbia, Bogotá | 93-94 | 272 | < 5 | pneumonia | 114 | 42,0 | (36,0-48,0) | Não Realizado |
| Inostroza et al 1998 | Chile, Santiago-Temuco | 95-96 | 299 | ≤ 4 | creche e saudáveis | 149 | 49,8 | (44,0-55,6) | 14, 19F, 23F |
| Ochoa & Theresa 1998 | Peru, Lima | 96-97 | 170 | ≤ 2 | ambulatório | 75 | 44,0 | (36,5-51,9) | Não Realizado |
| Peñuela et al 1999 | Colômbia, Bogotá | 97 | 98 | < 2 | creches | 68 | 69,4 | (59,3-78,3) | 23F, 19F, 6A, 10A |
| Ferreira et al 2001 | Brasil, São Paulo | 97-98 | 400 | < 5 | IRA | 139 | 34,8 | (30,1-39,6) | Não Realizado |
| Ribeiro et al. 2001 | Brasil, Salvador | 2000 | 44 | < 5 | saudáveis | 30 | 68,2 | (52,4-81,4) | Não Realizado |
| Rossi et al 2001 | Brasil (4 macro-regiões) | 99-00 | 2521 | < 5 | creches | 350 | 13,9 | (12,5-15,3) | Não Realizado |
| Rey et al 2002 | Brasil, Fortaleza | 98 | 911 | < 5 | pneumonia e creche | 499 | 54,9 | (51,6-58,1) | 6, 19, 23, 14, 15 |
| Gómez-Barreto et al 2002 | México, México | 97-99 | 378 | < 4 | creches | 178 | 47,1 | (42,0-52,3) | 19F/A, 6A/B, 23F, 14, , 15, 9A |
| Lucarevschi et al 2003 ^a | Brasil, Taubaté | 98 | 987 | < 6 | creche e saudáveis | 209 | 21,2 | (18,7-23,8) | 6A/6B,19F,18C,23F, 9V,14,10A |
| Ochoa et al 2005 | Peru, Lima | 97-03 | 666 | < 2 | saudáveis | 272 | 40,8 | (37,1-44,7) | 19, 6, 23, 15, 14, 9, 33 |

IRA: Infecção Respiratória Aguda

Modificado de Lima 2001

^a: coleta em orofaringe

Por meio da análise da tabela, é possível concluir que o padrão de sorotipos detectados na América Latina (14, 6A, 6B, 19F e 23F) assemelha-se ao padrão de sorotipos encontrados em países americanos e europeus.

As diferenças encontradas nas taxas de colonização entre as diversas publicações podem estar refletindo diferenças da idade, região geográfica, condições climáticas, condições do hospedeiro, condições sócio-econômicas e mesmo, aspectos metodológicos, como tamanho da amostra, local da coleta e população estudada. Coletas realizadas em nasofaringe tendem a ser mais efetivas na detecção de portadores de pneumococos em crianças do que as coletas em orofaringe (Rapola et al. 1997, Yomo et al. 1997, Greenberg et al. 2004). Em indivíduos acima dos 18 anos, a coleta em nasofaringe apresenta maior sensibilidade na detecção do pneumococo (11,1%), quando comparada à coleta realizada na orofaringe (5,8%). Como esperado, a coleta simultânea nesses dois sítios aumenta a acurácia dos resultados, elevando a taxa de detecção para 15,2% (Watt et al. 2004).

A relação entre os sorotipos colonizantes e invasivos tem sido bem estabelecida com aporte da epidemiologia molecular (Lloyd-Evans et al. 1996, Robinson et al. 2001, Andrade et al. 2003, Brueggemann et al. 2003). A distribuição de sorotipos colonizantes pode ser utilizada como indicador dos sorotipos de doença invasiva, e também do perfil de susceptibilidade antimicrobiana e potencial de cobertura vacinal de isolados invasivos (WHO & CDC 1994, Inostroza et al. 1998, Scott et al. 1998, Craig et al. 1999, O'Brien & Dagan 2003, Saha et al. 2003, Serrano et al. 2004). Nesse sentido, vários estudos têm avaliado a prevalência dos sorotipos de *S. pneumoniae* em nasofaringe, o padrão de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados e potenciais fatores de risco que favorecem o estado de portador (Marchisio et al. 2002, García-Rodríguez & Fresnadillo 2002, Syrogiannopoulos et al. 2000, Petrosillo et al. 2002).

Fatores de risco associados à colonização da nasofaringe pelo pneumococo

Em crianças saudáveis, raça, aglomeração, fatores ambientais e sócio-econômicos são determinantes na colonização nasofaríngea do *S. pneumoniae*. Fatores ambientais e sócio-econômicos incluem principalmente o tamanho da família (especificamente o número de irmãos), renda familiar e presença de fumantes na casa (Principi et al. 1999, Ghaffar et al. 1999, Coles et al. 2001, Petrosillo et al. 2002). Creches e berçários são ambientes favoráveis para aquisição de pneumococo na nasofaringe, devido ao contato muito próximo e constante entre as crianças (Reichler et al. 1992, Bogaert et al. 2001, Petrosillo et al. 2002, Marchisio et al. 2002, Dunais et al. 2003, Dagan & O'Brien 2005). Nos locais onde a exposição a creches e berçários acontece mais tardiamente, a exposição dentro do ambiente familiar, principalmente de crianças maiores de seis meses, reveste-se de maior importância (Leino et al. 2001). Também, infecções respiratórias virais favorecem a colonização pneumocócica (Syrjanen et al. 2001). No entanto, a distribuição dos sorotipos colonizadores não tem variado significativamente comparando-se crianças saudáveis que frequentam creche ou não e crianças que apresentam infecções do trato respiratório superior (Syrjanen et al. 2001, Marchisio et al. 2003).

Dentre os fatores associados a cepas colonizadoras resistentes, incluem-se idade menor que dois anos e história recente de infecção do trato respiratório superior, incluindo otite média, além da exposição a creches e berçários (Craig et al. 1999, Finkelstein et al. 2003, Regev-Yochay et al. 2003). O uso de antimicrobianos, sabidamente associado ao aparecimento de cepas resistentes na doença invasiva, também é fator determinante para o aumento de cepas resistentes na nasofaringe (Radetsky et al. 1981, Boken et al. 1995, Craig et al. 1999, Ghaffar et al. 2002, Petrosillo et al. 2002, Regev-Yochay et al. 2003). Isto ocorre devido à seleção de isolados previamente resistentes, que constituem uma população menor na nasofaringe, antes do tratamento (Dagan et al. 1998, De Lencastre & Tomasz 2002, Kellner & Ford-Jones 1999) e que favorece a disseminação de cepas resistentes na comunidade (Craig et al. 1999, Givon-Lavi et al. 2002). Assim, a diminuição do uso de penicilinas contribui para a redução da resistência do pneumococo a esse antimicrobiano (Livermore 2005).

Estudos de vigilância de *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe de crianças com infecção respiratória, mostram variações de 19 a 28 por cento de resistência à penicilina (García-De-Lomas et al. 2002, Mühlemann et al. 2003). Elevadas taxas de portador com alta resistência à penicilina, incluindo cepas multiresistentes, têm sido descritas em crianças que freqüentam creche (Boken et al. 1995, Craig et al. 1999). Em determinadas regiões da Ásia, encontram-se taxas extremamente elevadas de resistência à penicilina (71,5%) em crianças portadoras de pneumococos (Chiou et al. 1998). Em anos recentes, resultados de vigilância laboratorial têm confirmado a tendência de aumento de pneumococos não susceptíveis à penicilina oriundos de nasofaringe (Lee et al. 2001, Muhlemann et al. 2003). Na América Latina, assim como em outras regiões, são evidentes as variações na prevalência de portadores resistentes à penicilina. Na cidade do México, crianças que freqüentavam creches apresentaram 49% de pneumococos não susceptíveis à penicilina (Gomez-Barreto et al. 2002), enquanto em Lima, Peru, observou-se aumento de 5% em 1997, para 37% em 2003 na resistência à penicilina, em menores de dois anos que frequentavam o mesmo serviço de saúde, tanto para consultas de rotina, como para as intercorrências (Ochoa et al. 2005). No Brasil, estudos sobre a prevalência de pneumococos não susceptíveis à penicilina, conduzidos em regiões distintas, mostraram taxas de 9% e 55% em crianças saudáveis que frequentavam creche, e 16% em crianças com rinfaringite (Rossi et al. 2001, Ferreira et al. 2001, Rey et al. 2002).

Infecções pneumocócicas invasivas

A estrutura dos polissacárides capsulares é o fator mais importante de virulência do pneumococo e decisivo na seleção de sorotipos invasivos (Henrichsen 1995, Hausdorff et al. 2000). Localização geográfica, faixa etária, gravidade da doença, surtos epidêmicos, são variáveis importantes na distribuição dos sorotipos invasivos. Em crianças pequenas, os sorogrupos 14, 6, 19, 18, 23, 9 e 4 são os mais freqüentes nos EUA, Canadá, Oceania e Europa (exceção do sorogrupo 4). Na Ásia, África e América Latina os sorogrupos 1, 19, 6, 5, 14 e 23 são os mais frequentes. Apesar dessas variações regionais, apenas um pequeno número de sorogrupos é

responsável pela maioria das doenças invasivas (Hausdorff et al. 2000a). Observa-se que os sorotipos 1 e 5 são relativamente freqüentes nas doenças invasivas da Europa, Ásia, África e América Latina, incluindo o Brasil, contrastando com a baixa freqüência dos mesmos nos EUA, Canadá, Finlândia e Austrália (< 3% de todos os isolados invasivos) (Hausdorff et al. 2000a, DiFabio et al. 2001, Hausdorff et al. 2001, Lagos et al. 2002, Brandileone et al. 2003). Os sorotipos 1 e 3 predominam em neonatos e crianças mais velhas, e também estão associados a quadros de pneumonia grave e peritonite. O sorotipo 1 está associado a surtos de pneumonia em adultos (Hausdorff et al. 2005). No entanto, existe uma relação inversa entre esta invasividade e a freqüência desses sorotipos na nasofaringe (Brueggemann et al. 2004). Uma das explicações para este fato é que devido à virulência desses sorotipos, eles têm rápida passagem pela nasofaringe antes de atingirem a corrente sanguínea (Klein 1995). Em pesquisa realizada em diferentes regiões do mundo, os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, estão entre os mais prevalentes em crianças de seis meses a menores de dois anos, os quais estão presentes na formulação da vacina conjugada 7-valente. Esses sorotipos compreendem também, a maioria dos sorotipos não susceptíveis aos antimicrobianos e são freqüentes em indivíduos imunodeprimidos (Hausdorff et al. 2005).

No Brasil, estudos de vigilância laboratorial mostram predomínio dos sorotipos 14, 6B/A e 5 em crianças menores de cinco anos com infecção pneumocócica invasiva. Além desses sorotipos, o 18C e 23F são mais freqüentes nas meningites, enquanto os sorotipos 1, 19A e 9V, nas pneumonias (Brandileone et al. 2003). Recente análise desses isolados invasivos observou aumento significativo da resistência à penicilina de 15% em 1998, para 27% em 2003 (Brandileone et al. 2005). Esse estudo mostrou que apesar da freqüência de pneumococos com resistência intermediária ser maior do que a alta resistência, o risco de alta resistência foi quatro vezes maior em 2003, do que em 1998, enquanto o risco da resistência intermediária foi 1,61 vez maior, comparando-se esse mesmo período. O resultado desse estudo sinaliza que, atualmente, a resistência à penicilina no Brasil equipara-se à de outros países da América Latina, diferentemente de anos anteriores, em que as taxas de resistência eram inferiores aos demais países latinoamericanos (Di Fabio et al. 2001).

Tipagem molecular

A tipagem molecular é uma caracterização detalhada do microrganismo, que utiliza técnicas de biologia molecular para evidenciar uma possível relação genética entre os isolados clínicos de uma mesma espécie. Essa área encontra-se em franca expansão, pois os resultados obtidos pelas técnicas de tipagem molecular são de grande valia para o entendimento das infecções hospitalares. Em estudos de tipagem, entende-se por isolado clínico qualquer microrganismo e por cepa o microrganismo já caracterizado pelos métodos de tipagem. Um mesmo clone caracteriza cepas de uma mesma espécie que possuem as mesmas características genéticas (Tenover et al. 1995, Tenover et al. 1997, Sader et al. 1995, Pfaller et al. 2001).

Programas de vigilância epidemiológica também requerem o monitoramento da disseminação clonal. O acompanhamento e a avaliação do comportamento de determinadas cepas em uma população ao longo do tempo pode ajudar na implementação de estratégias que controlem, determinem ou, ao menos, monitorem a evolução de cepas bacterianas de importância clínica e o aparecimento de novas infecções (Pfaller et al. 2001). A tipagem de patógenos somente deve ser realizada quando há objetivos epidemiológicos bem definidos, pois qualquer método pode proporcionar resultados conflitantes e de difícil interpretação quando aplicado sem uma orientação epidemiológica clara. Também, devido à variabilidade que praticamente qualquer método de tipagem pode apresentar, uma comparação entre duas ou mais amostras, só deve ser feita quando os procedimentos de tipagem forem realizados sob condições idênticas.

As terminologias de caracterização de testes laboratoriais como a especificidade e a sensibilidade não se aplicam às técnicas de tipagem molecular; no entanto, vários outros critérios são utilizados na caracterização dos métodos de tipagem. Esses critérios incluem: tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de interpretação dos resultados e facilidade de realização da técnica (Sader et al. 1995, Farber 1996). A tipabilidade avalia a capacidade do

método de proporcionar resultados bem definidos para cada isolado clínico. A reprodutibilidade refere-se à habilidade da técnica proporcionar resultados idênticos, quando o mesmo isolado é avaliado repetidamente. E por fim, o poder discriminatório refere-se à capacidade da técnica em diferenciar isolados clínicos não semelhantes (cepas diferentes). Na prática, a técnica é considerada estatisticamente útil quando a cepa mais comum representa menos que 5% do total da população estudada (Hunter 1990, Grundmann et al. 1995, Sader et al. 1995).

Várias técnicas que determinam o padrão genotípico de diversos microrganismos estão sendo utilizadas e todas elas caracterizam-se por produzirem fragmentos de DNA os quais, quando submetidos a algum processo eletroforético, produzem um padrão (perfil) migratório característico de uma determinada cepa. Este perfil migratório do DNA bacteriano poderá ser visualizado após o gel da eletroforese ser corado com brometo de etídio ou outro corante apropriado.

A crescente utilização das técnicas de tipagem molecular nas últimas décadas contribuiu muito para minimizar os problemas de tipabilidade e aumentar a reprodutibilidade dessas técnicas. Várias delas têm sido aplicadas na epidemiologia do *S. pneumoniae*, como a eletroforese de enzimas multifocais (MLEE), ribotipagem, reação de polimerização em cadeia (AP-PCR) e a eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE). A MLEE tem sido utilizada para investigar a propagação da resistência à penicilina pelo pneumococo, no entanto é uma técnica de difícil execução e tende a ser substituída pela eletroforese em campo pulsado. A utilização da ribotipagem apresenta menor poder discriminatório, ou seja, menor capacidade em diferenciar isolados de pneumococos não relacionados, do que a PFGE. O PCR é uma técnica que discrimina se os isolados de pneumococo pertencem ou não à mesma cepa, no entanto, apresenta menor reprodutibilidade se comparada com a eletroforese em campo pulsado (Hermans et al. 1995, Hall 1998). A PFGE é uma das técnicas de tipagem molecular mais conhecida e utilizada universalmente, principalmente pelo alto poder discriminatório e pela aplicabilidade desta técnica à maioria das espécies bacterianas (McDougal et al. 1995, Moreno et al. 1995, Doit et al. 1996). A caracterização genética de isolados pela eletroforese em campo elétrico pulsado baseia-se no número e no tamanho de fragmentos de DNA (bandas), que são

separados de acordo com a carga elétrica e o peso molecular. A interpretação dos padrões da PFGE é feita visualmente e os critérios foram sistematizados por Tenover (Tenover et al. 1995, Tenover et al. 1997).

Intervenções preventivas – vacinas conjugadas pneumocócicas

Os ensaios clínicos randomizados (fase III) são os delineamentos classicamente utilizados para avaliação de novas vacinas, e têm por objetivo medir a segurança e eficácia da vacina em condições consideradas “ideais” de observação. Esses estudos de eficácia são estudos de excelência (padrão-ouro) e subsidiam a liberação da vacina para uso comercial. Apesar da credibilidade dos resultados de estudos fase III, o impacto da vacinação na redução da doença na população certamente será menor que o observado em ensaios conduzidos em condições ideais, após a introdução da vacina na rotina dos serviços de saúde. Portanto, esse impacto deve ser monitorado, no decorrer do tempo, para avaliar possíveis influências de outras variáveis tais como cobertura vacinal, aderência da população, conservação e técnica de administração da vacina. Na fase de avaliação do impacto da vacinação utilizam-se os estudos observacionais não-randomizados (fase IV), como série de casos e estudos tipo caso-controle que, diferentemente dos estudos de eficácia, fornecem a efetividade da vacinação (condições programáticas) (Clemens et al. 1996).

Os polissacárides capsulares do pneumococo atuam como antígenos T-independentes e, portanto, quando administrados sozinhos, não induzem resposta com produção de anticorpos em crianças menores de dois anos, pois nesta faixa etária, as crianças não apresentam linfócitos B competentes para gerar uma resposta imunológica mediada por anticorpos T-dependentes. Nas vacinas conjugadas, o acoplamento dos polissacárides à proteína carreadora forma um complexo com novas propriedades antigênicas, típicas de antígenos protéicos T-dependentes e ao contrário das vacinas polissacárides puras, são altamente imunogênicas em crianças menores de dois anos, com indução de memória imunológica (Goldblatt 1998, Ada 2001). As vacinas pneumocócicas conjugadas 7-valente (sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), 9-valente (7-valente + sorotipos 1 e 5) e 11-valente (9-valente + sorotipos 3 e 7F), cada uma com diferentes proteínas carreadoras, estão em fases distintas de

avaliação. A eficácia e segurança da vacina 7-valente na redução da doença invasiva foi comprovada em ensaios fase III realizados nos EUA, com eficácia de 97,4% (IC 95% 82,7-99,9), que subsidiaram a liberação da vacina (Prenar; Wyeth Vaccines) pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) para uso rotineiro nos EUA, em fevereiro de 2000 (Black et al. 2000). Esta vacina (CRM197) é uma mistura de seis polissacárides capsulares purificados e um oligossacáride capsular, cada um deles acoplado a uma variante não tóxica da toxina diftérica. Posteriormente, outros ensaios clínicos confirmaram a eficácia dessa vacina na Finlândia (eficácia na otite média aguda de 50 a 60 por cento) e Alaska (eficácia de 76,8 a 82,6 por cento) (Eskola et al. 2001, O'Brien et al. 2003). Com a introdução da vacina pneumocócica 7-valente nos EUA, tem ocorrido uma redução significativa da infecção pneumocócica em crianças (Whitney et al. 2003). A avaliação da efetividade da vacinação após dois anos da sua introdução mostrou taxa de incidência de doença pneumocócica invasiva próxima de zero em menores de cinco anos, e redução de 29 para 19 por cento, dos isolados resistentes à penicilina (Black et al. 2004). Os sorotipos contidos nessa vacina são responsáveis por 70 a 90 por cento das doenças pneumocócicas invasivas em crianças nos EUA, Canadá, Oceania, África e Europa, e 70% dos pneumococos que causam otite média aguda nos EUA, Canadá e Europa (Hausdorff et al. 2000, Hausdorff et al. 2000a). Atualmente, a vacina 7-valente encontra-se liberada para uso comercial em aproximadamente 50 países. Na Inglaterra e Países Baixos, estima-se que a vacina poderá prevenir 61% de mortes por doença pneumocócica na infância (McIntosh & Booy 2002).

A vacina 9-valente foi recentemente avaliada em ensaio clínico randomizado conduzido em Gâmbia, África, no qual se observou 77% de eficácia na proteção de infecções pneumocócicas invasivas causadas pelos sorotipos vacinais e 16% na mortalidade por doença pneumocócica (Cutts et al. 2005). Essa vacina ainda não foi aprovada pela FDA. Outros estudos de eficácia (ensaios fase III) das vacinas 9 e 11 valente encontram-se em andamento.

No Brasil, a vacina 7-valente foi licenciada para uso comercial em fevereiro de 2001, mas não foi introduzida na rotina do Programa Nacional de Imunizações (PNI). Ela está disponível gratuitamente nos Centros de Referência para Imunobiológicos

Especiais (CRIEs), somente para crianças menores de dois anos que apresentem determinadas patologias de base que favoreçam o aparecimento da doença pneumocócica, portanto, uma utilização ainda muito restrita. Tendo em vista resultados de vigilância laboratorial de *S. pneumoniae* em menores de cinco anos no Brasil, estima-se que a vacina 7-valente cobriria 59 a 74 por cento dos sorotipos invasivos circulantes no país (Reis et al. 2002, Brandileone et al. 2003). Essa cobertura será certamente maior para a vacina 9-valente que incorpora os sorotipos 1 e 5, altamente prevalentes no Brasil (Di Fabio et al. 2001, Brandileone et al. 2003).

As vacinas conjugadas pneumocócicas reduzem o estado de portador nasofaríngeo de sorotipos vacinais, mas por outro lado, podem aumentar a frequência de sorotipos não vacinais na nasofaringe (Obaro et al. 1996, Dagan et al. 1996, Dagan et al. 1997, Mbelle et al. 1999, Obaro et al. 2000, Dagan et al. 2002). O efeito da vacina conjugada na redução de portador de sorotipos vacinais e de sorotipos resistentes à penicilina na infância tem sido avaliado por recentes ensaios clínicos fase III. Na Tabela 2 calculamos a eficácia da vacina para cada um dos estudos, utilizando as taxas de colonização nasofaríngea e as estimativas de risco fornecidas pelos ensaios clínicos. Embora a eficácia na redução de portador não seja tão expressiva quanto na redução da doença invasiva, observam-se variações de zero até 68 por cento. A vacina reduziu a colonização pneumocócica na nasofaringe, inclusive de cepas resistentes que são comuns entre os sorotipos vacinais, induzindo imunidade de grupo, por diminuição da transmissão dessas cepas na comunidade (Dagan et al. 2003, Finkelstein et al. 2003, Pelton et al. 2003). Givon-Lavi e colaboradores (2003) mostraram diminuição de 13% na taxa de colonização em irmãos de crianças vacinadas com a vacina 9-valente, bem como de portador de pneumococos não susceptíveis à penicilina. Em Israel, a vacina conjugada 9-valente reduziu a taxa de colonização de pneumococos não susceptíveis à penicilina, mas aumentou a colonização com sorotipos não contidos na vacina, que eram susceptíveis à penicilina. Assim, o estado de portador de pneumococos resistentes manteve-se reduzido (Dagan et al. 2003). Por outro lado, em Portugal, a vacina 7-valente reduziu a colonização com sorotipos resistentes à penicilina, mas os sorotipos não vacinais emergentes adquiriram resistência, não havendo redução significativa do estado de portador de pneumococos não susceptíveis à penicilina, com o uso da vacina isoladamente

(Frazão et al. 2005). Observa-se também, que as diferenças na eficácia estão na dependência das variações de faixa etária, com maior impacto da vacina no estado de portador do pneumococos em menores de dois anos, especialmente em menores de 12 meses (Dagan et al. 1996, Mbelle et al. 1999). Além disso, o tamanho da amostra envolvida no estudo e as taxas de colonização no cenário epidemiológico local interferem nos resultados (Yeh et al. 2003, Lakshman et al. 2003).

Tabela 2. Ensaio clínico fase III do efeito das vacinas pneumocócicas conjugadas na redução de portador nasofaríngeo.

| Autor/ano/país | População alvo | Vacina utilizada | Tempo seguimento | Sorotipos | Eficácia |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|
| Dagan et al./1996/Israel | 12-18 meses, saudáveis | 7-valente | 1 ano | vacinais NSP | 49% 68% |
| Mbelle et al./1999/África do Sul | <1 ano, saudáveis | 9-valente | 9 meses | vacinais NSP | 51% 50% |
| Dagan et al./2002/Israel | 1 a <3 anos, saudáveis | 9-valente | 2 anos | vacinais | 39% |
| Dagan et al./2003/Israel | 1 a <3 anos, saudáveis | 9-valente | 2 anos | NSP | 24% |
| Yeh et al./2003/USA | <1 ano, saudáveis | 7-valente | 1 ano | vacinais | ≅ zero |
| Lakshman et al./2003/Reino Unido | 2-5 anos, saudáveis | 7-valente | 2 anos | vacinais | ≅ zero |
| Givon-Lavi et al./2003/Israel | 12-35 meses, saudáveis | 9-valente | 2 anos | vacinais NSP | 39% 22% |
| Veenhoven et al./2004/Holanda | 12-24 meses, otite média | 7-valente | 7 meses | vacinais | 14% |
| Frazão et al./2005/Lisboa | 6 meses-6 anos saudáveis | 7-valente | 15 meses | NSP | ≅ zero |

NSP: não susceptíveis à penicilina

O impacto da vacinação 7-valente na doença pneumocócica invasiva, onde a imunização já foi introduzida de forma rotineira, foi demonstrado pela redução da incidência de infecções causadas por sorogrupos contidos na vacina, concomitantemente com o aumento da proporção de casos por sorogrupos não

contidos na vacina, geralmente de evolução mais grave (Kaplan et al. 2004, Byington et al. 2005). Quanto ao estado de portador, Huang et al (2005) mostraram redução de 38,8% na colonização da nasofaringe com sorotipos contidos na vacina 7-valente entre 2001 e 2004. No entanto, aumentou 61,8% a colonização com sorotipos não vacinais no mesmo período, o que manteve o estado de portador do pneumococo inalterado. Da mesma forma, a taxa de colonização de isolados não susceptíveis à penicilina foi similar em 2001 e em 2004. Também no Alaska, após a introdução rotineira da vacina 7-valente, nenhum impacto foi observado sobre o estado de portador de pneumococos resistentes (Moore et al. 2004).

No Brasil, estudos sobre o potencial de cobertura de sorotipos vacinais isolados de nasofaringe são escassos. Em Taubaté, São Paulo, estudo realizado em orofaringe de crianças menores de seis anos mostrou que 63% dos sorotipos de pneumococos estavam contidos na formulação da vacina heptavalente (Lucarevski et al. 2003), enquanto em Goiânia, Goiás, a cobertura vacinal para pneumococos de nasofaringe foi estimada em 53%, em crianças menores de cinco anos (Lima 2001).

Novas vacinas candidatas

Outra possibilidade no desenvolvimento de vacinas pneumocócicas é o uso das proteínas de superfície da parede celular. Espera-se que com o desenvolvimento dessas vacinas proteicas, algumas vantagens sejam alcançadas: (i) acessibilidade econômica, inclusive para países em desenvolvimento; (ii) indução de proteção efetiva para todos os grupos etários e; (iii) ampla proteção sorotipo-independente, devido à utilização de proteínas conservadas na composição destas vacinas. São quatro, as proteínas com potencial para uso em vacinas: PspA, pneumolisina, PsaA e a proteína de superfície C (PspC) (Briles et al. 2000). A maioria dos estudos com essas proteínas são experimentais (Briles et al. 1997, Briles et al. 2000a, Arulanandam et al. 2001, Johnson et al. 2002, Romero-Steiner et al. 2003, Ogunniyi et al. 2000, Garcia-Suarez et al. 2004).

Estudos em animais utilizando-se a PspA, mostraram um efeito protetor contra a infecção invasiva e em menor extensão, contra o estado de portador (Briles et al. 1996, Arulanandam et al.2001). Um ensaio clínico fase I, com uma variante da PspA recombinante, mostrou que o soro imune foi capaz de proteger camundongos de infecção fatal por pneumococo, através de ampla reação cruzada à moléculas heterólogas de PspA (Briles et al. 2000b).

De acordo com a diversidade genética dos pneumococos, tem sido possível classificar as PspA em 3 famílias. As famílias 1 e 2 incluem mais de 98% das moléculas de PspA (Hollingshead et al. 2000). Estudos realizados sobre tipagem de PspA mostram que a distribuição dos isolados de pneumococos entre PspA das famílias 1 e 2 é semelhante na América do Norte, Europa e América do Sul, inclusive no Brasil (Hollingshead et al. 2000, Vela Coral et al. 2001, Brandileone et al. 2004, Mollerach et al. 2004, Baril et al. 2004, Payne et al. 2005). Dessa forma, uma vacina candidata incluindo essas duas famílias, poderia cobrir com igual efetividade, isolados destas diferentes regiões geográficas.

2. Justificativa

Em estudo anterior foi implementada a vigilância dos casos de meningite bacteriana no município de Goiânia com objetivo de aumentar a acurácia do diagnóstico laboratorial das meningites na infância. Para tanto, foram preconizadas as coletas simultâneas de líquido, sangue e *swab* nos casos de meningite bacteriana (Laval 2003). Assim, com o aporte da epidemiologia molecular, mostramos a relação genética entre cepas de pneumococos de nasofaringe e líquido, reforçando o papel da colonização nasofaríngea no desenvolvimento da doença invasiva (Andrade et al. 2003). Adicionalmente, vários estudos sustentam a viabilidade de utilizar taxas de resistência de pneumococo à penicilina em nasofaringe, para monitoramento das taxas de resistência de pneumococos invasivos (Gray et al. 1980, Mastro et al. 1993, Smith et al. 1993, Lehmann et al. 1997, Kellner et al. 1998). Dentre as meningites bacterianas, a pneumocócica foi a mais prevalente em Goiânia, seguida das meningites por *N. meningitidis* e *H. influenzae*. Observou-se que em uma das crianças com meningite pneumocócica, os isolados de líquido e sangue apresentavam sorotipos diferentes e padrões semelhantes de susceptibilidade à penicilina, sinalizando a necessidade de futuras investigações para elucidação do parentesco genético desses isolados (Laval 2003).

Neste cenário, sem dúvida, faz-se necessário o monitoramento do estado de portador nasofaríngeo do pneumococo, como sentinela para a susceptibilidade às penicilinas, especialmente mediante as dificuldades inerentes ao isolamento do pneumococo em doenças sistêmicas. Além disso, uma vigilância permanente da distribuição dos sorotipos colonizantes, fornecerá uma linha de base importante para avaliações futuras do impacto da vacina conjugada pneumocócica no cenário epidemiológico local (Laval et al. 2006).

Vários estudos vêm sendo conduzidos nesse contexto de vigilância do *S. pneumoniae* e também do *H. influenzae* em população pediátrica de Goiânia, desde 2000 (Lima 2001, Andrade 2002, Andrade et al. 2004, Simões et al. 2004, Andrade et al. 2004a, Andrade & Martelli 2005). Dentre eles, inclui-se também uma revisão que

aborda as meningites bacterianas na era das vacinas conjugadas (Laval et al. 2003) e a relação genética entre isolados colonizantes e invasivos de crianças com meningite pneumocócica (Andrade et al. 2003), ambos produtos de minha dissertação de Mestrado. Esta tese soma-se a este elenco de pesquisas, conduzidas no intuito de aprofundar a análise dos isolados de pneumococos da nasofaringe, do estudo de vigilância. Incorpora também o racional da epidemiologia molecular na investigação de parentesco genético de pneumococos invasivos, igualmente fruto dos resultados da vigilância do *S. pneumoniae* em Goiânia. A tese inclui revisão da literatura sobre o tema, descrição da metodologia e resultados. A discussão é contemplada nas respectivas publicações (Laval et al. 2006, Andrade et al. 2004a), produtos desta investigação, anexados ao final da tese.

3. Objetivos

- determinar a frequência dos sorotipos e a potencial cobertura das vacinas conjugadas pneumocócicas 7, 9 e 11 valente em relação aos sorotipos de pneumococos colonizantes e invasivos;
- avaliar potenciais fatores de risco associados ao estado de portador de pneumococo na nasofaringe;
- comparar a resistência à penicilina entre pneumococos isolados de nasofaringe e aqueles de doenças invasivas;
- analisar o parentesco genético de isolado de *S. pneumoniae* de líquido e de sangue de uma mesma criança com quadro de meningite.

4. Material e Métodos

População e área de estudo

Esta investigação foi conduzida na estrutura de um sistema de vigilância de *S. pneumoniae*, de maio de 2000 a agosto de 2001, compreendendo dois períodos de inverno, com participação de vinte grandes hospitais pediátricos do município de Goiânia (Anexo1). A população do estudo é constituída de crianças menores de cinco anos, estimada em 90.720 (IBGE 2002). Crianças com diagnóstico de infecção respiratória aguda (IRA) (n=135), pneumonia (n=134) (WHO 1999) e meningite (n=77) (WHO 1999a), foram recrutadas consecutivamente, de segunda a sexta-feira nos hospitais pediátricos de Goiânia. Na comunidade, selecionaram-se 302 crianças sem história de hospitalização nos últimos seis meses e que freqüentavam os mesmos serviços de saúde das crianças hospitalizadas. O total de 648 crianças foi calculado para se estimar uma prevalência de portador do *S. pneumoniae* de pelo menos 30%, com erro de 5%, e resistência à penicilina de 20% (DiFabio et al. 2001, Brandileone et al. 1998).

Características demográficas, clínicas e potenciais fatores de risco para portador, foram obtidos por questionário que incluiu informações sobre data de nascimento, sexo, idade em que a criança recebeu outro tipo de leite, diferente do leite materno, presença de doenças respiratórias (gripe, amigdalite e otite) nos últimos 60 dias, uso de antimicrobianos nos últimos três meses, freqüência a berçários e/ou creches, grau de escolaridade da mãe, presença de fumantes no domicílio, número de cômodos na casa, número de pessoas dormindo na mesma cama, número e idade das pessoas que habitavam o mesmo domicílio da criança. É importante salientar que nenhuma criança participante do estudo recebeu a vacina conjugada 7-valente (Prevenar[®]).

O protocolo da investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da UFG e pelo Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP) atendendo a resolução 196/96 (Anexo 2). Consentimento livre e esclarecido

foi obtido dos responsáveis pela criança, que forneceram autorização por escrito para participação de seus filhos.

Coleta de swabs de nasofaringe e transporte

Os procedimentos da coleta de *swab* de nasofaringe, isolamento e identificação bacteriana e a caracterização fenotípica dos isolados, foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas recentemente, por um grupo de trabalho designado pela Organização Mundial da Saúde/WHO (O'Brien & Nohynek 2003). *Swabs* de nasofaringe foram coletados de cada criança, por meio da introdução de *transwab* ultrafino, flexível, à aproximadamente 2/3 da distância entre o nariz e o lóbulo da orelha, na direção horizontal. Ao encontrar resistência na parede posterior da nasofaringe, foram realizados movimentos rotatórios de 180 graus. Os *transwabs* foram acondicionados no meio modificado de Stuart para transporte (Medical Wire & Equipment Corsham, UK) e enviados para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. As amostras foram processadas no mesmo dia, em média 6 horas após a coleta.

Isolamento e identificação bacteriana

Os *swabs* foram semeados em ágar sangue-2 (Difco) contendo 5% de sangue de carneiro e suplementado com 5µg/mL de gentamicina (Sigma) para pesquisa de *S. pneumoniae*. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, com tensão de CO₂ de 5 a 10 por cento, obtida com chama de vela, a 37°C por 24 a 48 horas (WHO & CDC 1994). As colônias com características de *S. pneumoniae* foram submetidas à coloração de Gram. Após visualização microscópica de cocos Gram-positivos aos pares, de forma lanceolada ou em cadeias curtas e às vezes um halo refringente ao redor dos cocos, duas a três colônias eram semeadas em ágar chocolate suplementado com 10% de sangue de cavalo. As placas eram incubadas novamente em microaerofilia, a 37°C por 24 horas. As colônias foram identificadas pelo teste de

susceptibilidade a optoquina (etil-hidrocupreína hidrocloreídrica – Cecon), com halo de inibição ≥ 14 mm, que permitiu uma identificação presuntiva, com uma sensibilidade maior que 95% (Yagupsky et al. 1998), oxacilina e solubilidade em bile (Ruoffs et al. 1995), nos casos de susceptibilidade indeterminada a optoquina (halo de inibição de 7-13 mm).

Caracterização fenotípica dos isolados colonizadores

A sorotipagem foi realizada pela reação de Quellung com antisoros específicos produzidos pelo *Statens Serum Institute* (Copenhague, Denmark), de acordo com as recomendações do fabricante (Sorensen 1993). Os antisoros incluíram 90 a 95 por cento dos sorotipos mais freqüentes em infecções em crianças. Os pneumococos foram submetidos a um “pool” de nove sorotipos polivalentes de A a I, sendo que cada um dos 83 tipos resulta em reação capsular com um destes “pools”. A partir do resultado da aglutinação, as cepas foram testadas com outros antisoros, para a determinação de grupos e tipos. As bactérias isoladas foram armazenadas em leite desnatado a -20°C e/ou liofilizadas. Susceptibilidade à penicilina e a outros antimicrobianos foi determinada pelo E-test (AB Biodisk, Sweden) e seguiu as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2004), utilizando os resultados do MIC (Concentração Inibitória Mínima). Para interpretação da susceptibilidade à penicilina, foram utilizados os seguintes pontos de corte: $\text{MIC} < 0,06 \mu\text{g/mL}$, susceptível; $\text{MIC} > 0,06 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 1,00 \mu\text{g/mL}$, intermediário; e $\text{MIC} \geq 2,00 \mu\text{g/mL}$, alta resistência. A sorotipagem e a determinação da susceptibilidade à penicilina por microdiluição foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

Caracterização genotípica de isolados de líquido e sangue

Em estudo anterior de vigilância de pneumococo em menores de cinco anos conduzido em Goiânia (Laval 2003), identificamos uma criança com meningite, na qual isolou-se pneumococo no sangue e líquido, porém com distintos sorotipos. No

presente estudo procedeu-se a tipagem genética dos pneumococos do sangue e do líquido da criança com meningite, por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Neste método de análise do DNA genômico, utilizam-se enzimas de restrição (*SmaI*) com poucos sítios de clivagem, resultando em um menor número de fragmentos de DNA. Estes fragmentos (bandas) são separados em eletroforese de campo elétrico pulsado, de acordo com a carga elétrica e peso molecular. Esta etapa da investigação foi concluída no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, por um dos investigadores do projeto. As cepas de *S. pneumoniae* foram repicadas em ágar sangue e incubadas em estufa de CO₂ (5 a 10 por cento) por 18 horas. Em seguida, obteve-se uma suspensão bacteriana de 10⁹ células/mL e os blocos preparados com agarose de baixo ponto de fusão. Após a solidificação, foram incubados em tampão de lise (1M NaCl; 100mM EDTA; 6mM Tris-HCl; 0,5% polioxietileno cetil éter; 0,5% desoxicolato de sódio; 0,5% N-lauril sarcosina; pH 7,6) contendo lisozima (1mg/mL) e 50µg de RNase a 37°C por 5 horas. Posteriormente, foram incubados em tampão ES (0,5M EDTA; N-lauril sarcosina; pH 8,5) suplementados com 100µg de proteinase K a 50°C por 18 horas. Os blocos foram lavados com tampão TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 7,6) a temperatura ambiente por 30 minutos, cinco vezes. Os blocos de agarose, contendo o DNA, foram incubados em tampão da enzima por 20 minutos e posteriormente o DNA foi digerido com 15U da enzima *SmaI* à temperatura ambiente por 18 horas. Os blocos foram colocados nos orifícios do gel de agarose a 1% e a eletroforese foi realizada com tampão Tris-borato EDTA (TBE) empregando o equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad), à temperatura de 14°C durante 23 horas, em campo elétrico de 6v/cm com pulsos de 1 a 30 segundos. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5mg/L durante 50 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado (Soares et al. 1993).

Análise de dados

Processamento e análise de dados foram realizados pelo pacote estatístico EpiInfo, versão 6,04 (Dean et al. 1994) e SPSS (versão 10,0; SPSS Inc., Chicago, Illinois). Teste qui-quadrado foi utilizado para avaliar diferenças entre proporções e o teste t de *Student* para avaliar diferenças entre médias. Estimativas de risco obtidas por *Odds Ratio* (OR) e respectivos intervalos de 95% de confiança (IC 95%) foram calculados. Valores de *p* menores de 5% e IC 95% não sobreponíveis foram considerados estatisticamente significantes.

Portador nasofaríngeo de *S. pneumoniae* foi calculado como a razão entre o número de pneumococos isolados na nasofaringe pelo número de *swabs* coletados. A prevalência de portador não-susceptível à penicilina foi avaliada utilizando como numerador, isolados com susceptibilidade intermediária ($0,06 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 1,00 \mu\text{g/mL}$) e/ou alta resistência ($\text{MIC} \geq 2,00 \mu\text{g/mL}$) e como denominador o número de pneumococos isolados.

Com a finalidade de se comparar resistência de isolados colonizadores com resistência de isolados de doença invasiva, foram selecionados 125 isolados invasivos, recuperados de líquido de crianças com meningite pneumocócica de hospitais pediátricos de Goiânia, pareados por idade e período de coleta. Para a seleção desses isolados invasivos utilizou-se a base de dados/bacterioteca do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, que representa o Laboratório Nacional de Referência de *S. pneumoniae* no país, e onde os isolados encontram-se armazenados. A concordância entre os sorotipos incluídos na formulação das vacinas conjugadas e aqueles encontrados na nasofaringe e em fluidos estéreis das crianças com doença invasiva pneumocócica foi usada como um indicador de sorotipos cobertos pelas vacinas conjugadas 7, 9 e 11 valente.

Variáveis potencialmente associadas à colonização nasofaríngea foram inicialmente avaliadas por análise univariada. Posteriormente, as variáveis que apresentaram valores de $p < 0,10$ no processo de regressão logística com teste de Wald,

foram incluídas em modelo de análise multivariada, para controlar possíveis variáveis de confusão (Hosmer & Lemeshow 2000).

Para a interpretação dos padrões da PFGE dos isolados invasivos da criança com meningite pneumocócica utilizou-se os critérios propostos por Tenover (Tenover et al. 1995, Tenover et al. 1997): (i) cepas geneticamente indistinguíveis, se os isolados apresentaram padrão de restrição com o mesmo número e tamanho de fragmentos (bandas) de DNA. A interpretação epidemiológica é de que os isolados representam a mesma cepa; (ii) cepas provavelmente relacionadas, quando os isolados apresentaram duas ou três bandas diferentes no padrão da PFGE, resultante de um único evento genético; (iii) cepas possivelmente relacionadas, quando os isolados apresentaram de quatro a seis bandas diferentes no padrão da PFGE, consistentes com dois eventos genéticos independentes. Nesta situação os isolados podem pertencer a uma mesma linhagem genética, não sendo provavelmente relacionados; (iv) cepas não relacionadas, quando os isolados apresentaram mais de seis bandas diferentes no padrão da PFGE, consistentes com três ou mais eventos genéticos independentes. Os eventos genéticos aqui referidos podem ser de mutação com adição ou perda de um sítio de restrição, ou de inserção ou deleção de DNA, estes não contendo sítios de restrição. O padrão de restrição do DNA de isolados foram designados com letras, A, B, C, etc, cada uma referente a um perfil específico de restrição enzimática. O perfil de isolados geneticamente indistinguíveis foi designado com letras iguais. Cepas provavelmente e possivelmente relacionadas geneticamente foram designadas com letras iguais acrescidas de um número, A1 A2, B1 B2, C1 C2, etc. Os padrões referentes aos isolados não relacionados foram designados com letras diferentes. Estes critérios nortearam a análise de parentesco entre cepas coletadas de líquido e sangue de uma criança com meningite.

5. Resultados

A Tabela 3 mostra as características das 648 crianças que participaram do estudo. Destas, 53% eram do sexo masculino, sendo que 93% na faixa etária de dois meses a menores de dois anos de idade. Quarenta e sete por cento das crianças eram saudáveis, enquanto 20,8%, 20,6% e 11,9% apresentavam infecção respiratória aguda (IRA), pneumonia e meningite, respectivamente. Das 77 crianças com meningite, 48,1% eram menores de um ano e 61%, menores de dois anos. Aproximadamente 64% do total das crianças, referiam ter apresentado sintomas de resfriado, amigdalite ou otite. Vinte e quatro por cento destas crianças tinham história de uso de antimicrobiano nos três meses anteriores à sua entrada no estudo, principalmente β -lactâmicos (amoxicilina-clavulanato), com uma diferença estatisticamente significativa entre crianças saudáveis (10,7%, IC 95% 7,4-14,8) e aquelas com co-morbidade (37,6%, IC 95% 32,1-43,3). Uma pequena proporção de crianças (5,4%) frequentava creches e/ou berçários. Cinquenta e um por cento dos pais residiam em casa própria e aproximadamente 70% das mães não completaram o ensino fundamental.

Tabela 3. Características das 648 crianças com *swabs* coletados de nasofaringe em Goiânia – Go, Maio/2000-Agosto/2001

| Características | Nº de crianças (%) |
|---|---------------------------|
| Idade – meses | |
| 2-11 | 292 (45,1) |
| 12-23 | 309 (47,7) |
| 24-59 | 47 (7,2) |
| Sexo masculino | 345 (53,2) |
| Co-morbidade | |
| Ausência | 302 (46,6) |
| Pneumonia | 134 (20,7) |
| Meningites | 77 (11,9) |
| Infecção Respiratória Aguda | 135 (20,8) |
| Aleitamento exclusivo | |
| < 1 mês | 72 (11,2) |
| 1-3 meses | 206 (32,1) |
| > 3 meses | 363 (56,7) |
| Resfriado prévio (60 dias) | 212 (35,7) |
| Amigdalite prévia (60 dias) | 101 (16,7) |
| Otite prévia (60 dias) | 69 (11,3) |
| Antimicrobiano nos últimos 3 meses | 146 (24,5) |
| Creche e/ ou berçário | 34 (5,4) |
| Escolaridade materna $\leq 1^\circ$ grau | 430 (69,2) |
| Fumantes na casa | 191 (30,6) |
| Casa própria | 319 (51,6) |
| Nº de cômodos (média $\pm dp$) | (4,7 \pm 2,0) |
| Crianças < 5 anos na casa (média $\pm dp$) | (1,5 \pm 0,8) |
| Crianças < 2 anos na casa (média $\pm dp$) | (1,1 \pm 0,2) |
| Pessoas na casa (média $\pm dp$) | (4,6 \pm 1,7) |
| Pessoas na mesma cama (média $\pm dp$) | (1,5 \pm 0,8) |
| Pessoas no mesmo quarto (média $\pm dp$) | (3,1 \pm 1,0) |

A prevalência do estado de portador de *S. pneumoniae* neste estudo, foi de 35,8%, sendo maior entre crianças saudáveis (41,4%), quando comparada àquelas com co-morbidade (30,9%) ($p < 0,05$). A média de idade dos portadores foi de $14,1 \pm 9,7$ meses e dos não portadores, de $13,6 \pm 9,5$, não havendo diferença estatística. A prevalência de pneumococos não susceptíveis à penicilina (SpNP) de acordo com resultados do MIC (concentração inibitória mínima), foi 19,8% (Tabela 4), não havendo diferença estatística entre crianças saudáveis (20,9%) e crianças com infecção respiratória aguda (18,7%) ($p > 0,05$).

Tabela 4. *Streptococcus pneumoniae* recuperados da nasofaringe de 648 crianças

| Pneumococos isolados | Número/ Total | % | IC 95% |
|-----------------------------|-----------------------|----------|---------------|
| Portador nasofaríngeo | 232 / 648 | 35,8 | 32,1-39,6 |
| Portador SpNP ^a | 45 / 227 ^b | 19,8 | 14,8-25,6 |

SpNP – pneumococos não susceptíveis à penicilina

^a 14, 6B, 19F, 23F, 19A, 23B

^b número de pneumococos isolados da nasofaringe com análise de susceptibilidade à penicilina

De 44 pneumococos sorotipados e não susceptíveis à penicilina apenas dois (4,5%) apresentaram MIC acima de 1,00 µg/mL portanto, alta resistência (sorotipos 14 e 6B) (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos sorotipos de pneumococos de acordo com o perfil de susceptibilidade à penicilina

| MIC^a (µg/mL) | Sorotipos (n) |
|--------------------------------|---|
| 0,06 – 1,00 ^b | 6B (14), 14 (16), 19F (4), 23F (5), 19A (3) |
| ≥2,00 ^c | 14 (1), 6B (1) |

^a: Concentração Inibitória Mínima

^b: resistência intermediária

^c: alta resistência

Os sorotipos mais prevalentes foram o 14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F e 18C, portanto cinco deles contidos na formulação da vacina conjugada 7-valente. Sorotipos 4 e 9V foram pouco frequentes. Os sorotipos 1 e 5 foram raramente isolados da

nasofaringe, respectivamente 0,5% e 0,9%, no entanto, foram respectivamente, o décimo terceiro (0,8%) e o quinto (5,6%) sorotipo mais freqüente em fluidos estéreis de crianças com infecção pneumocócica invasiva. Entre os 125 isolados de doença invasiva, 19,2% (IC 95% 12,7-27,2) foram não susceptíveis à penicilina. Os sorotipos resistentes (6B, 14, 19F, 19A, 23B e 23F) foram os mesmos tanto para portador como para doença invasiva, com predomínio do 6B e 14 (63,7% em nasofaringe e 70,8% em fluidos estéreis) (Tabela 6).

Tabela 6. Sorotipos mais frequentes do *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe e doença invasiva.

| Isolados de nasofaringe=222 ^a | | | Isolados de doença invasiva=125 | | |
|--|-----------|----------------------|---------------------------------|-----------|----------------------|
| Sorotipos | No. (%) | SpNP=44 No. (%) | Sorotipos | No. (%) | SpNP = 24 No. (%) |
| 14 | 33 (14,9) | 12 (27,3) | 14 | 26 (20,8) | 9 (37,5) |
| 6B | 29 (13,1) | 16 (36,4) | 6B | 18 (14,4) | 8 (33,3) |
| 6A | 24 (10,8) | - | 18C | 14 (11,2) | - |
| 19F | 19 (8,6) | 6 (13,6) | 19F | 10 (8,0) | 3 (12,5) |
| 10A | 15 (6,8) | - | 5 | 7 (5,6) | - |
| 23F | 14 (6,3) | 6 (13,6) | 23F | 6 (4,8) | 2 (8,3) |
| 18C | 11 (5,0) | - | 4 | 5 (4,0) | - |
| 19A | 10 (4,5) | 3 (6,8) | 6A | 5 (4,0) | - |
| 9N | 9 (4,0) | - | 9V | 4 (3,2) | - |
| 18A | 9 (4,0) | - | 18B | 4 (3,2) | - |
| 9V | 8 (3,6) | - | 9N | 3 (2,4) | - |
| 11A | 6 (2,7) | - | 10A | 3 (2,4) | - |
| 15B | 6 (2,7) | - | 19A | 3 (2,4) | 1 (4,2) |
| 7F | 5 (2,3) | - | 7C | 2 (1,6) | - |
| 3 | 3 (1,3) | - | 7F | 2 (1,6) | - |
| 23A | 3 (1,3) | - | 8 | 2 (1,6) | - |
| 4 | 2 (0,9) | - | 12F | 2 (1,6) | - |
| 5 | 2 (0,9) | - | Outros ^d | 9 (7,2) | 1 (4,2) ^c |
| 12 | 2 (0,9) | - | | | |
| 18B | 2 (0,9) | - | | | |
| 22F | 2 (0,9) | - | | | |
| Outros ^b | 8 (3,6) | 1 (2,3) ^c | | | |

SpNP: pneumococos não susceptíveis à penicilina

^a pneumococos com determinação dos sorotipos

^b sorotipos 1, 7B, 7C, 8, 10F, 11, 22, 23B

^c sorotipos 23B

^d sorotipos 1, 15B, 17F, 18A, 18F, 23B, 27, 28A, 34

O potencial de cobertura dos sorotipos vacinais de portador com as vacinas conjugadas 7, 9 e 11 valente foi 52,2%, 53,6% e 57,2%, respectivamente, não havendo diferença estatística ($p>0,05$). Os sorotipos de doença invasiva apresentaram cobertura semelhante à dos sorotipos colonizantes com a vacina 7-valente, no entanto, com as vacinas 9 e 11-valente a cobertura de sorotipos de portador foi estatisticamente menor do que a cobertura de sorotipos invasivos (Tabela 7). Em relação aos sorotipos não susceptíveis à penicilina, 34,5%, 33,6% e 31,5% estavam contidos na formulação das vacinas conjugadas 7, 9 e 11-valente, respectivamente, portanto não apresentando diferença estatística. A cobertura vacinal de cepas de portador resistentes à penicilina com a 7-valente (34,5% IC 95% 25,9-43,9) não foi estatisticamente diferente da cobertura vacinal de isolados invasivos (28,2% IC 95% 18,6-39,5).

Tabela 7. *Streptococcus pneumoniae* identificados em nasofaringe e em doença invasiva

| Sorotipos vacinais ^a | Isolados nasofaringe | | | Isolados invasivos | | |
|---------------------------------|----------------------|------|--------------------------|--------------------|------|--------------------------|
| | N=222 | % | (IC 95%) | N=125 | % | (IC 95%) |
| 7-valente ^b | 116 | 52,2 | (45,5-59,0) ^e | 78 | 62,4 | (53,3-70,9) ^e |
| 9-valente ^c | 119 | 53,6 | (46,8-60,3) ^f | 86 | 68,8 | (59,9-76,8) ^f |
| 11-valente ^d | 127 | 57,2 | (50,4-63,8) ^g | 87 | 69,6 | (60,7-77,5) ^g |

^a concordância entre sorotipos inclusos na respectiva formulação das vacinas e aqueles encontrados em nasofaringe e em fluidos estéreis

^b 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F

^c sorotipos 7-valente + sorotipos 1 e 5

^d sorotipos 9-valente + sorotipos 3 e 7F

^e $P = 0,06$

^f $P < 0,05$

^g $P < 0,05$

Escolaridade materna $\leq 1^\circ$ grau (OR=1,5; IC 95% 1,0-2,2) e criança sem comorbidade (OR=1,5; IC 95% 1,1-1,5) estiveram associados ao estado de portador ($p < 0,05$), em análise multivariada (Tabela 8). O uso de antimicrobiano nos últimos três meses que antecederam ao estudo, foi fator protetor para estado de portador (OR=0,6; IC 95% 0,4-0,9) apenas em análise univariada ($p < 0,05$).

Tabela 8. Potenciais fatores de risco para portador nasofaríngeo de *Streptococcus pneumoniae*

| Variáveis | OR | IC 95% ^b | OR | IC 95% | p^d |
|---|--------------------|---------------------|-----------------------|---------|-------|
| | Bruto ^a | | Ajustado ^c | | |
| Idade em meses | | | | | |
| 12-23 | 1,0 | 0,7-1,4 | | | |
| 24-59 | 1,2 | 0,6-2,4 | | | |
| Sexo masculino | 0,9 | 0,6-1,2 | | | |
| Creche e/ou berçário | 0,8 | 0,4-1,8 | | | |
| Amamentação exclusiva ≤ 3 meses | 0,9 | 0,7-1,3 | | | |
| Escolaridade materna $\leq 1^\circ$ grau | 1,5 | 1,2-2,2 | 1,5 | 1,0-2,2 | 0,03 |
| Ausência de co-morbidade | 1,6 | 1,1-2,2 | 1,5 | 1,1-1,5 | 0,02 |
| Resfriado prévio (60 dias) | 1,0 | 0,7-1,4 | | | |
| Amigdalite prévia (60 dias) | 0,8 | 0,5-1,3 | | | |
| Otite prévia (60 dias) | 1,0 | 0,6-1,7 | | | |
| Antimicrobiano nos últimos 3 meses ^e | 0,6 | 0,4-0,9 | 0,7 | 0,5-1,1 | 0,13 |
| Fumantes na casa | 1,3 | 0,9-1,9 | | | |
| Casa não própria | 0,7 | 0,5-1,0 | | | |

^a Odds Ratio

^b Intervalo de 95% de confiança

^c Ajustado por regressão logística

^d Valor de p

^e Pelo menos um antimicrobiano nos últimos 90 dias

A incorporação do componente molecular ao sistema de vigilância implementado no município, no intuito de avaliar o parentesco genético pela PFGE na caracterização de isolados de *S. pneumoniae* recuperados simultaneamente de líquido e sangue de uma mesma criança com meningite, assumiu papel relevante neste estudo. Sorotipos 23B e 23F foram identificados respectivamente nos isolados de líquido e sangue e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana mostrou que ambos sorotipos não eram susceptíveis à penicilina (Tabela 9). Os isolados analisados apresentaram perfis de restrição enzimática com mais de seis bandas diferentes de DNA, sendo então considerados não pertencentes à mesma cepa. (Figura 1).

Tabela 9. Fenotipo e diversidade genética de isolados de criança com meningite por *Streptococcus pneumoniae*

| Origem do <i>S. pneumoniae</i> | Sorotipo | MIC ^a (µg/mL) | | | | | | Perfis de PFGE ^b |
|--------------------------------|----------|--------------------------|-----|------|-----|-----|------|-----------------------------|
| | | Pen | Cn | Ctx | TSX | Van | Eri | |
| Líquor | 23B | 0,125 | 1,0 | 0,06 | 4,0 | 0,5 | 0,03 | A |
| Sangue | 23F | 0,125 | 2,0 | 0,06 | 4,0 | 0,5 | 0,03 | B |

Pen, penicilina; Cn, cloranfenicol; Ctx, ceftriaxone; TSX, trimetoprim-sulfametoxazol; Van, vancomicina; Eri, eritromicina.

^a: Concentração Inibitória Mínima

^b: PFGE: eletroforese em campo elétrico pulsado

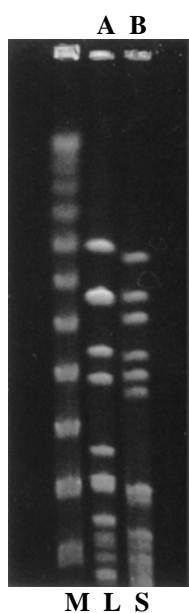


Figura 1: Perfis de PFGE de dois isolados de *Streptococcus pneumoniae* recuperados de uma criança com meningite. Coluna **M**, peso molecular, coluna **L**, líquido e coluna **S**, sangue. A foto mostra dois perfis distintos: **A** e **B**.

6. Conclusão

- A prevalência de portador de pneumococo na nasofaringe foi 35,8% e os sorotipos mais freqüentemente detectados contemplam cinco dos sete sorotipos presentes na formulação da vacina 7-valente.
- Os sorotipos 1 e 5 foram raramente isolados da nasofaringe.
- A prevalência de pneumococos não susceptíveis à penicilina foi similar entre isolados de portador (19,8%) e de doença invasiva (19,2%).
- A cobertura da vacina 7-valente para isolados de portador e para isolados relacionados às doenças invasivas foi igualmente alta, o que sinaliza o benefício em potencial desta vacina na redução da colonização pneumocócica, inclusive de cepas resistentes à penicilina.
- Nenhuma diferença estatística foi observada entre a cobertura obtida com a vacina 7-valente para portadores não susceptíveis e isolados invasivos não susceptíveis à penicilina.
- As vacinas 9 e 11-valente não levariam a um benefício adicional em relação à 7-valente na redução de portadores de isolados resistentes, uma vez que os sorotipos 1 e 5 (9-valente) e 3 e 7F (11-valente) não se apresentaram associados a resistência à penicilina.
- Crianças sem co-morbidade e escolaridade materna $\leq 1^\circ$ grau foram variáveis independentemente associadas ao estado de portador.
- Os perfis da PFGE de isolados de *S. pneumoniae* recuperados de sangue e líquor de uma criança com meningite foram distintos, o que evidencia meningite mista, que é um evento raro.

7. Referências Bibliográficas

Ada G 2001. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 345: 1042-1053.

Andrade ALSS 2002. Insights into the Epidemiology of Pneumococcal Diseases in the Developing World: Goiânia, Brazil. In: Program & Abstracts Book of the 3rd International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, pg 19, Anchorage, Alaska, May 5 to 8, 2002. American Society for Microbiology, 2002.

Andrade AL, Pimenta FC, Brandileone MC, Laval CA, Guerra ML, de Andrade JG, Di Fabio JL 2003. Genetic relationship between *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal and cerebrospinal fluid of two infants with pneumococcal meningitis. *J Clin Microbiol* 41: 3970-3972.

Andrade AL, de Andrade JG, Martelli CM, Silva SA, de Oliveira RM, Costa MS, Laval CB, Ribeiro LH, Di Fabio JL 2004. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine on childhood pneumonia: a case-control study in Brazil. *Int J Epidemiol* 33: 173-181.

Andrade AL, Pimenta FC, Laval CA, de Andrade JG, Guerra ML, Brandileone MC 2004a. Invasive pneumococcal infection in a healthy infant caused by two different serotypes. *J Clin Microbiol* 42: 2345-2346.

Andrade AL & Martelli CM 2005. Globalisation of Hib vaccination--how far are we? *Lancet* 365: 5-7.

Arulanandam BP, Lynch JM, Briles DE, Hollingshead S, Metzger DW 2001. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 69: 6718-6724.

- Baril L, Briles DE, Crozier P, King J, Punar M, Hollingshead SK, McCormick JB 2004. Characterization of antibodies to PspA and PsaA in adults over 50 years of age with invasive pneumococcal disease. *Vaccine* 23: 789-793.
- Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, Elvin L, Ensor KM, Hackell J, Siber G, Malinoski F, Madore D, Chang I, Kohberger R, Watson W, Austrian R, Edwards K 2000. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 19: 187-195.
- Black S, Shinefield H, Baxter R, Austrian R, Bracken L, Hansen J, Lewis E, Fireman B 2004. Postlicensure surveillance for pneumococcal invasive disease after use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Northern California Kaiser Permanente. *Pediatr Infect Dis J* 23: 485-489.
- Bogaert D, Engelen MN, Timmers-Reker AJ, Elzenaar KP, Peerbooms PG, Coutinho RA, de Groot R, Hermans PW 2001. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 39: 3316-3320.
- Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, Groot R, Rumke HC, Verbrugh HA, Hermans PW 2004. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 363: 1871-1872.
- Bogaert D, Groot R, Hermans PW 2004a. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4: 144-154.
- Boken DJ, Chartrand SA, Goering RV, Kruger R, Harrison CJ 1995. Colonization with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a child-care center. *Pediatr Infect Dis J* 14: 879-884.

- Brandileone MC, Di Fabio JL, Vieira VS, Zanella RC, Casagrande ST, Pignatari AC, Tomasz A 1998. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist* 4: 209-217.
- Brandileone MC, Andrade AL, Di Fabio JL, Guerra ML, Austrian R 2003. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis* 187: 1206-1212.
- Brandileone MC, Andrade AL, Teles EM, Zanella RC, Yara TI, Di Fabio JL, Hollingshead SK 2004. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. *Vaccine* 22: 3890-3896.
- Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL 2005. Increase in penicillin resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil after 1999. *J Antimicrob Chemother* 56: 437-439.
- Briles DE, Tart RC, Wu HY, Ralph BA, Russell MW, McDaniel LS 1996. Systemic and mucosal protective immunity to pneumococcal surface protein A. *Ann NY Acad Sci* 797: 118-126.
- Briles DE, Hollingshead SK, Swiatlo E, Brooks-Walter A, Szalai A, Virolainen A, McDaniel LS, Benton KA, White P, Prellner K, Hermansson A, Aerts PC, Van Dijk H, Crain MJ 1997. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 3: 401-408.
- Briles DE, Hollingshead S, Brooks-Walter A, Nabors GS, Ferguson L, Schilling M, Gravenstein S, Braun P, King J, Swift A 2000. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine* 18: 1707-1711

- Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A 2000a. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine 19 Suppl 1*: S87-95.
- Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, Ferguson LM, Nahm MH, Nabors GS 2000b. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis 182*: 1694-1701.
- Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG 2003. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis 187*: 1424-1432.
- Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG 2004. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis 190*: 1203-1211.
- Byington CL, Samore MH, Stoddard GJ, Barlow S, Daly J, Korgenski K, Firth S, Glover D, Jensen J, Mason EO, Shutt CK, Pavia AT 2005. Temporal trends of invasive disease due to *Streptococcus pneumoniae* among children in the intermountain west: emergence of nonvaccine serogroups. *Clin Infect Dis 41*: 21-29.
- Chiou CC, Liu YC, Huang TS, Hwang WK, Wang JH, Lin HH, Yen MY, Hsieh KS 1998. Extremely high prevalence of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in Kaohsiung, Taiwan. *J Clin Microbiol 36*: 1933-1937.

- Clemens J, Brenner R, Rao M, Tafari N, Lowe C 1996. Evaluating new vaccines for developing countries. Efficacy or effectiveness? *JAMA* 275: 390-397.
- Coles CL, Kanungo R, Rahmathullah L, Thulasiraj RD, Katz J, Santosham M, Tielsch JM 2001. Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young South Indian infants. *Pediatr Infect Dis J* 20: 289-295.
- Craig AS, Erwin PC, Schaffner W, Elliott JA, Moore WL, Ussery XT, Patterson L, Dake AD, Hannah SG, Butler JC 1999. Carriage of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and impact of chemoprophylaxis during an outbreak of meningitis at a day care center. *Clin Infect Dis* 29: 1257-1264.
- Cutts FT, Zaman SM, Enwere G, Jaffar S, Levine OS, Okoko JB, Oluwalana C, Vaughan A, Obaro SK, Leach A, McAdam KP, Biney E, Saaka M, Onwuchekwa U, Yallop F, Pierce NF, Greenwood BM, Adegbola RA 2005. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 365: 1139-1146.
- Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, Mendelman PM, Bohidar N, Yagupsky P 1996. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 174: 1271-1278.
- Dagan R, Muallem M, Melamed R, Leroy O, Yagupsky P 1997. Reduction of pneumococcal nasopharyngeal carriage in early infancy after immunization with tetravalent pneumococcal vaccines conjugated to either tetanus toxoid or diphtheria toxoid. *Pediatr Infect Dis J* 16: 1060-1064.
- Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, Yagupsky P, Fliss DM, Leiberman A 1998. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 17: 880-885.

- Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Sikuler-Cohen M, Guy L, Janco J, Yagupsky P, Fraser D 2002. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis* 185: 927-936.
- Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Fraser D 2003. Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 22: 532-540.
- Dagan R & O'Brien KL 2005. Modeling the association between pneumococcal carriage and child-care center attendance. *Clin Infect Dis* 40: 1223-1226.
- Datasus. Indicadores e Dados Básicos – Brasil – 2004. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2004/matriz.htm#mort> Acessado em 30 de agosto de 2005.
- Davies T, Goering RV, Lovgren M, Talbot JA, Jacobs MR, Appelbaum PC 1999. Molecular epidemiological survey of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asia, Europe, and North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34: 7-12.
- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, Dicker RC, Sullivan K, Fagan RF, Arner, TG 1994. EpiInfo, version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
- De Lencastre H & Tomasz A 2002. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 50 Suppl S2: 75-81.

- Di Fabio JL, Castaneda E, Agudelo CI, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, Echaniz-Aviles G, Noemi M, Barajas C, Heitmann I, Hormazabal JC, Brandileone MC, Dias Vieira VS, Regueira M, Ruvinski R, Corso A, Lovgren M, Talbot JA, De Quadros C 2001. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J* 20: 959-967.
- Doit C, Denamur E, Picard B, Geslin P, Elion J, Bingen E 1996. Mechanisms of the spread of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis in children in France. *J Infect Dis* 174: 520-528.
- Dunais B, Pradier C, Carsenti H, Sabah M, Mancini G, Fontas E, Dellamonica P 2003. Influence of child care on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Pediatr Infect Dis J* 22: 589-592.
- Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, Takala A, Kayhty H, Karma P, Kohberger R, Siber G, Makela PH 2001. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 344: 403-409.
- Farber JM 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J Food Prot* 59: 1091-1101.
- FDA. Food and Drugs Administration. First pneumococcal vaccine approved for infants and toddlers [Internet site]. Disponível em <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00716.html>. Acessado em 30 de Agosto de 2005.
- Ferreira LL, Carvalho ES, Berezin EN, Brandileone MC 2001. [Nasopharyngeal colonization and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with acute rhinopharyngitis]. *J Pediatr (Rio J)* 77: 227-234.

- Finkelstein JA, Huang SS, Daniel J, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Goldmann D, Pelton SI, DeMaria A, Platt R 2003. Antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine era: predictors of carriage in a multicomunity sample. *Pediatrics* 112: 862-869.
- Frazao N, Brito-Avo A, Simas C, Saldanha J, Mato R, Nunes S, Sousa NG, Carrico JA, Almeida JS, Santos-Sanches I, de Lencastre H 2005. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. *Pediatr Infect Dis J* 24: 243-252.
- Garcia-De-Lomas J, Garcia-Rey C, Lopez L, Gimeno C 2002. Susceptibility patterns of bacteria causing community-acquired respiratory infections in Spain: the SAUCE project. *J Antimicrob Chemother* 50 Suppl S2: 21-26.
- Garcia-Rodriguez JÁ & Fresnadillo MJ 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 50 Suppl S2: 59-73.
- Garcia-Suarez Mdel M, Cima-Cabal MD, Florez N, Garcia P, Cernuda-Cernuda R, Astudillo A, Vazquez F, De los Toyos JR, Mendez FJ 2004. Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun* 72: 4534-4540.
- Gatica-Marquina R, Echániz-Aviles G, Rangel-Flores H, Velázquez-Meza E 1993. Colonización bacteriana nasofaríngea en niños que asisten a guardería y niños cuidados en casa. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 6: 191-195.
- Ghaffar F, Friedland IR, McCracken GH, Jr. 1999. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 18: 638-646.

- Ghaffar F, Muniz LS, Katz K, Smith JL, Shouse T, Davis P, McCracken GH, Jr. 2002. Effects of large dosages of amoxicillin/clavulanate or azithromycin on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, nonpneumococcal alpha-hemolytic streptococci, and *Staphylococcus aureus* in children with acute otitis media. *Clin Infect Dis* 34: 1301-1309.
- Givon-Lavi N, Fraser D, Porat N, Dagan R 2002. Spread of *Streptococcus pneumoniae* and antibiotic-resistant *S. pneumoniae* from day-care center attendees to their younger siblings. *J Infect Dis* 186: 1608-1614.
- Givon-Lavi N, Fraser D, Dagan R 2003. Vaccination of day-care center attendees reduces carriage of *Streptococcus pneumoniae* among their younger siblings. *Pediatr Infect Dis J* 22: 524-532.
- Goldblatt D 1998. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 47: 563-567.
- Gomez-Barreto D, Calderon-Jaimes E, Rodriguez RS, Espinosa LE, Vina-Flores L, Jimenez-Rojas V 2002. Carriage of antibiotic-resistant pneumococci in a cohort of a daycare center. *Salud Publica Mex* 44: 26-32.
- Gray BM, Converse III GM, Dillon Jr HC 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 142: 923-933.
- Greenberg D, Broides A, Blancovich I, Peled N, Givon-Lavi N, Dagan R 2004. Relative importance of nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from healthy and sick individuals varies with age. *J Clin Microbiol* 42: 4604-4609.

- Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL 1995. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 33: 528-534.
- Hall LM 1998. Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol* 51: 270-274.
- Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 25: 1113-1124.
- Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR 2000. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 30: 100-121.
- Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR 2000a. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis* 30: 122-140.
- Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR 2001. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 357: 950-952.
- Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP 2005. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 5: 83-93.
- Hendley JO, Sande MA, Stewart PM, Gwaltney JM, Jr. 1975. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. I. Carriage rates and distribution of types. *J Infect Dis* 132: 55-61.
- Henrichsen J 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 33: 2759-2762.

- Hermans PW, Sluijter M, Hoogenboezem T, Heersma H, van Belkum A, de Groot R 1995. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol* 33: 1606-1612.
- Hollingshead SK, Becker R, Briles DE 2000. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68: 5889-5900.
- Hosmer DW & Lemeshow S 2000. Applied Logistic Regression. 2ND ed. Wiley, John & Sons, Incorporated. 672 pp.
- Huang SS, Platt R, Rifas-Shiman SL, Pelton SI, Goldmann D, Finkelstein JA 2005. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. *Pediatrics* 116: e408-413.
- Hunter PR 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 28: 1903-1905.
- Inostroza J, Trucco O, Prado V, Vinet AM, Retamal G, Ossa G, Facklam RR, Sorensen RU 1998. Capsular serotype and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates in two Chilean cities. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 176-180.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), *Base de informações por setor censitário. Censo demográfico 2000. Resultados do universo, Goiás – Goiânia [CD-ROM]. Rio de Janeiro. 2002.*
- Johnson SE, Dykes JK, Jue DL, Sampson JS, Carlone GM, Ades EW 2002. Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein pneumococcal surface adhesina. *J Infect Dis* 185: 489-496.

- Kaplan SL, Mason EO, Jr., Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, Hoffman JA, Givner LB, Yogev R, Barson WJ 2004. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 113: 443-449.
- Kellner JD, McGeer A, Cetron MS, Low DE, Butler JC, Matlow A, Talbot J, Ford-Jones EL 1998. The use of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children to predict features of invasive disease. *Pediatr Infect Dis J* 17: 279-286.
- Kellner JD & Ford-Jones EL 1999. *Streptococcus pneumoniae* carriage in children attending 59 Canadian child care centers. Toronto Child Care Centre Study Group. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153: 495-502.
- Kim JO & Weiser JN 1998. Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 177: 368-377.
- Klein DL 1995. Pneumococcal conjugate vaccines: review and update. *Microb Drug Resist* 1: 49-58.
- Koedel U, Scheld WM, Pfister HW 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2: 721-736.
- Kroon FP, van Dissel JT, Ravensbergen E, Nibbering PH, van Furth R 1999. Antibodies against pneumococcal polysaccharides after vaccination in HIV-infected individuals: 5-year follow-up of antibody concentrations. *Vaccine* 18: 524-530.
- Lagos R, Munoz A, Valenzuela MT, Heitmann I, Levine MM 2002. Population-based surveillance for hospitalized and ambulatory pediatric invasive pneumococcal disease in Santiago, Chile. *Pediatr Infect Dis J* 21: 1115-1123.

- Lakshman R, Murdoch C, Race G, Burkinshaw R, Shaw L, Finn A 2003. Pneumococcal nasopharyngeal carriage in children following heptavalent pneumococcal conjugate vaccination in infancy. *Arch Dis Child* 88: 211-214.
- Laval CA 2003. Caracterização epidemiológica e padrões fenotípicos e genotípicos de isolados de meningites bacterianas em crianças no Estado de Goiás. In: *Dissertação para obtenção de título de mestre*, Universidade Federal de Goiás: Goiânia, 2003.
- Laval CA, Pimenta FC, de Andrade JG, Andrade SS, de Andrade AL 2003. Progress towards meningitis prevention in the conjugate vaccines era. *Braz J Infect Dis* 7: 315-324.
- Laval CB, de Andrade AL, Pimenta F, Andrade JG, Oliveira RM, Silva AS, Lima EC, Di Fabio JL, Casagrande ST, Brandileone MC 2006. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clin Microbiol Infect* 12: 50-55.
- Leal AL & Castañeda E 1997. Susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* colonizante de nasofaringe en niños colombianos con neumonía. *Rev Pan Salud Public* 1: 266 - 272.
- Lee NY, Song JH, Kim S, Peck KR, Ahn KM, Lee SI, Yang Y, Li J, Chongthaleong A, Tiengrim S, Aswapokee N, Lin TY, Wu JL, Chiu CH, Lalitha MK, Thomas K, Cherian T, Perera J, Yee TT, Jamal F, Warsa UC, Van PH, Carlos CC, Shibl AM, Jacobs MR, Appelbaum PC 2001. Carriage of antibiotic-resistant pneumococci among Asian children: a multinational surveillance by the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). *Clin Infect Dis* 32: 1463-1469.
- Lehmann D, Gratten M, Montgomery J 1997. Susceptibility of pneumococcal carriage isolates to penicillin provides a conservative estimate of susceptibility of invasive pneumococci. *Pediatr Infect Dis J* 16: 297-305.

- Leino T, Auranen K, Jokinen J, Leinonen M, Tervonen P, Takala AK 2001. Pneumococcal carriage in children during their first two years: important role of family exposure. *Pediatr Infect Dis J* 20: 1022-1027.
- Lima EC, Prevalência de portador e sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe de crianças menores de 5 anos de Goiânia-Goiás. In: *Dissertação para obtenção de título de mestre*, Universidade Federal de Goiás: Goiânia, 2001.
- Lipsitch M, Dykes JK, Johnson SE, Ades EW, King J, Briles DE, Carlone GM 2000. Competition among *Streptococcus pneumoniae* for intranasal colonization in a mouse model. *Vaccine* 18: 2895-2901.
- Livermore DM 2005. Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 5: 450-459.
- Lloyd-Evans N, O'Dempsey TJ, Baldeh I, Secka O, Demba E, Todd JE, McArdle TF, Banya WS, Greenwood BM 1996. Nasopharyngeal carriage of pneumococci in Gambian children and in their families. *Pediatr Infect Dis J* 15: 866-871.
- Lock RA, Paton JC, Hansman D 1988. Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 5: 461-467.
- Lucarevski BR, Baldacci ER, Bricks LF, Bertoli CJ, Teixeira LM, Mendes CM, Oplustil C 2003. [Oropharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by children attending day care centers in Taubate, SP: correlation between serotypes and the conjugated heptavalent pneumococcal vaccine]. *J Pediatr (Rio J)* 79: 215-220.
- Magee AD & Yother J 2001. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69: 3755-3761.

- Marchisio P, Esposito S, Schito GC, Marchese A, Cavagna R, Principi N 2002. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children: implications for the use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Emerg Infect Dis* 8: 479-484.
- Marchisio P, Claut L, Rognoni A, Esposito S, Passali D, Bellussi L, Drago L, Pozzi G, Mannelli S, Schito G, Principi N 2003. Differences in nasopharyngeal bacterial flora in children with nonsevere recurrent acute otitis media and chronic otitis media with effusion: implications for management. *Pediatr Infect Dis J* 22: 262-268.
- Mastro TD, Nomani NK, Ishaq Z, Ghafoor A, Shaukat NF, Esko E, Leinonen M, Henrichsen J, Breiman RF, Schwartz B, et al. 1993. Use of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in Pakistan for surveillance for antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J* 12: 824-830.
- Mbelle N, Huebner RE, Wasas AD, Kimura A, Chang I, Klugman KP 1999. Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. *J Infect Dis* 180: 1171-1176.
- McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun* 59: 222-228.
- McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC 1995. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2282-2288.
- McIntosh ED & Booy R 2002. Invasive pneumococcal disease in England and Wales: what is the true burden and what is the potential for prevention using 7 valent pneumococcal conjugate vaccine? *Arch Dis Child* 86: 403-406.

- Mogdasy MC, Camou T, Fajardo C, Hortal M 1992. Colonizing and invasive strains of *Streptococcus pneumoniae* in Uruguayan children: type distribution and patterns of antibiotic resistance. *Pediatr Infect Dis J* 11: 648-652.
- Mollerach M, Regueira M, Bonofiglio L, Callejo R, Pace J, Di Fabio JL, Hollingshead S, Briles D 2004. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. *Epidemiol Infect* 132: 177-184.
- Moore MR, Hyde TB, Hennessy TW, Parks DJ, Reasonover AL, Harker-Jones M, Gove J, Bruden DL, Rudolph K, Parkinson A, Butler JC, Schuchat A 2004. Impact of a conjugate vaccine on community-wide carriage of nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Alaska. *J Infect Dis* 190: 2031-2038.
- Moreno F, Crisp C, Jorgensen JH, Patterson JE 1995. The clinical and molecular epidemiology of bacteremias at a university hospital caused by pneumococci not susceptible to penicillin. *J Infect Dis* 172: 427-432.
- Muhlemann K, Matter HC, Tauber MG, Bodmer T 2003. Nationwide surveillance of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with respiratory infection, Switzerland, 1998-1999. *J Infect Dis* 187: 589-596.
- Muñoz N, Sanín J, Monroy F 1994. Determinación del estado de portador nasofaríngeo de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Moraxella catarrhalis* en una población menor de tres años. *Pediatría* 4: 159-164.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement. NCCLS document M100-S14, Wayne (PA).

- Novales MGM, Santos FS, Gallardo HG, Miranda BL, Aviles GE, Barajas MNC, Torres MP, Hernandez OM 1997. *Streptococcus pneumoniae*: low frequency of penicillin resistance and high resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in nasopharyngeal isolates from children in a rural area in Mexico. *Arc Med Res* 28: 559-563.
- Obaro SK, Adegbola RA, Banya WA, Greenwood BM 1996. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *Lancet* 348: 271-272.
- Obaro SK, Adegbola RA, Chang I, Banya WA, Jaffar S, McAdam KW, Greenwood BM 2000. Safety and immunogenicity of a nonavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM197 administered simultaneously but in a separate syringe with diphtheria, tetanus and pertussis vaccines in Gambian infants. *Pediatr Infect Dis J* 19: 463-469.
- Obaro S & Adegbola R 2002. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 51: 98-104.
- O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, Weatherholtz R, Oski J, Brown L, Kumar G, Parkinson A, Hu D, Hackell J, Chang I, Kohberger R, Siber G, Santosham M 2003. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 362: 355-361.
- O'Brien KL & Dagan R 2003. The potential indirect effect of conjugate pneumococcal vaccines. *Vaccine* 21: 1815-1825.
- O'Brien KL & Nohynek H 2003. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 22: e1-11.

- Ochoa TJ, Rupa R, Guerra H, Hernandez H, Chaparro E, Tamariz J, Wanger A, Mason EO, Jr. 2005. Penicillin resistance and serotypes/serogroups of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children younger than 2 years in Lima, Peru. *Diagn Microbiol Infect Dis* 52: 59-64.
- Ochoa W & Theresa J 1998. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina en portadores nasofaríngeos menores de 2 años/Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin in nasopharyngeal children carriers, younger than two years old. *Rev méd hered* 9: 56-62.
- Ogunniyi AD, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC 2000. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68: 3028-3033.
- Overturf GD 2000. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 106: 367-376.
- Parry CM, Diep TS, Wain J, Hoa NT, Gainsborough M, Nga D, Davies C, Phu NH, Hien TT, White NJ, Farrar JJ 2000. Nasal carriage in Vietnamese children of *Streptococcus pneumoniae* resistant to multiple antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 484-488.
- Payne DB, Sun A, Butler JC, Singh SP, Hollingshead SK, Briles DE 2005. PspA family typing and PCR-based DNA fingerprinting with BOX A1R primer of pneumococci from the blood of patients in the USA with and without sickle cell disease. *Epidemiol Infect* 133: 173-178.

- Pelton SI, Dagan R, Gaines BM, Klugman KP, Laufer D, O'Brien K, Schmitt HJ 2003. Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Vaccine 21*: 1562-1571.
- Peñuela IJ, Leal AL, Castañeda E 1999. Colonización nasofaríngea y resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* en niños de una guardería en Santa Fe de Bogotá/Nasopharyngeal carriage and antimicrobial resistance to *Streptococcus pneumoniae* in children of a day care center in Santa Fe de Bogotá. *Biomédica (Bogotá) 19*: 214-222.
- Pericone CD, Overweg K, Hermans PW, Weiser JN 2000. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun 68*: 3990-3997.
- Petrosillo N, Pantosti A, Bordi E, Spano A, Del Grosso M, Tallarida B, Ippolito G 2002. Prevalence, determinants, and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolates colonizing the nasopharynx of healthy children in Rome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21*: 181-188.
- Pfaller MA, Acar J, Jones RN, Verhoef J, Turnidge J, Sader HS 2001. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin Infect Dis 32 Suppl 2*: S156-167.
- Principi N, Marchisio P, Schito GC, Mannelli S 1999. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascanius Project Collaborative Group. *Pediatr Infect Dis J 18*: 517-523.
- Radetsky MS, Istre GR, Johansen TL, Parmelee SW, Lauer BA, Wiesenthal AM, Glode MP 1981. Multiply resistant pneumococcus causing meningitis: its epidemiology within a day-care centre. *Lancet 2*: 771-773.

- Rapola S, Salo E, Kiiski P, Leinonen M, Takala AK 1997. Comparison of four different sampling methods for detecting pharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children. *J Clin Microbiol* 35: 1077-1079.
- Regev-Yochay G, Raz M, Shainberg B, Dagan R, Varon M, Dushenat M, Rubinstein E 2003. Independent risk factors for carriage of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 35: 219-222.
- Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Derazne E, Rahav G, Rubinstein E 2004. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in children. *JAMA* 292: 716-720.
- Reichler MR, Allphin AA, Breiman RF, Schreiber JR, Arnold JE, McDougal LK, Facklam RR, Boxerbaum B, May D, Walton RO, et al. 1992. The spread of multiply resistant *Streptococcus pneumoniae* at a day care center in Ohio. *J Infect Dis* 166: 1346-1353.
- Reis JN, Cordeiro SM, Coppola SJ, Salgado K, Carvalho MG, Teixeira LM, Thompson TA, Facklam RR, Reis MG, Ko AI 2002. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. *J Clin Microbiol* 40: 275-277.
- Rey LC, Wolf B, Moreira JL, Milatovic D, Verhoef J, Farhat CK 2002. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 20: 86-92.
- Ribeiro GS, Ribeiro C, Pinheiro RM, Palma T, Reis JN, Reis MG, al. e 2001. Prevalência do *Streptococcus pneumoniae* na comunidade: estudo de colonização nasofaríngea, Salvador-Ba. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 104.

- Robinson DA, Edwards KM, Waites KB, Briles DE, Crain MJ, Hollingshead SK 2001. Clones of *Streptococcus pneumoniae* isolated from nasopharyngeal carriage and invasive disease in young children in central Tennessee. *J Infect Dis* 183: 1501-1507.
- Romero-Steiner S, Pilishvili T, Sampson JS, Johnson SE, Stinson A, Carlone GM, Ades EW 2003. Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 246-251.
- Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, Masure HR 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 25: 819-829.
- Rossi F, Andreazzi D, Maffucci M, Pereira AA 2001. Susceptibility of *S. pneumoniae* to various antibiotics among strains isolated from patients and healthy carriers in different regions of Brazil (1999-2000). *Braz J Infect Dis* 5: 305-312.
- Ruoffs KL, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH 1995. *Streptococcus*. *Man Clin Microbiol* 6: 299-307.
- Rusen ID, Fraser-Roberts L, Slaney L, Ombette J, Lovgren M, Datta P, Ndinya-Achola J, Talbot JA, Nagelkerke N, Plummer FA, Embree JE 1997. Nasopharyngeal pneumococcal colonization among Kenyan children: antibiotic resistance, strain types and associations with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Infect Dis J* 16: 656-662.
- Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA 1995. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clinics in Laboratory Medicine* 15: 407-431.

- Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL, Ruhulamin M, Hanif M, El Arifeen S, Santosham M, Oishi K, Nagatake T, Black RE 2003. Comparison of antibiotic resistance and serotype composition of carriage and invasive pneumococci among Bangladeshi children: implications for treatment policy and vaccine formulation. *J Clin Microbiol* 41: 5582-5587.
- Scott JA, Hall AJ, Hannington A, Edwards R, Mwarumba S, Lowe B, Griffiths D, Crook D, Marsh K 1998. Serotype distribution and prevalence of resistance to benzylpenicillin in three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. *Clin Infect Dis* 27: 1442-1450.
- Sequeira MD, Zerbini E, Imaz MS, Veronessi I, Latini O, Cociglio R, Pierini J 1997. [Etiology of acute lower respiratory tract infections among children younger than 5 years old in Santa Fe]. *Medicina (Bueno Aires)* 57: 191-199.
- Serrano I, Ramirez M, Melo-Cristino J 2004. Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect* 10: 652-656.
- Simoes LL, Andrade AL, Laval CA, Oliveira RM, Silva SA, Martelli CM, Alves SL, Almeida RM, Andrade JG 2004. [Impact of *Haemophilus influenzae* b (Hib) vaccination on meningitis in Central Brazil]. *Rev Saude Publica* 38: 664-670.
- Sleeman KL, Daniels L, Gardiner M, Griffiths D, Deeks JJ, Dagan R, Gupta S, Moxon ER, Peto TE, Crook DW 2005. Acquisition of *Streptococcus pneumoniae* and nonspecific morbidity in infants and their families: a cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 24: 121-127.
- Smith T, Lehmann D, Montgomery J, Gratten M, Riley ID, Alpers MP 1993. Acquisition and invasiveness of different serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Epidemiol Infect* 111: 27-39.

- Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis* 168: 158-163.
- Soewignjo S, Gessner BD, Sutanto A, Steinhoff M, Prijanto M, Nelson C, Widjaya A, Arjoso S 2001. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage prevalence, serotype distribution, and resistance patterns among children on Lombok Island, Indonesia. *Clin Infect Dis* 32: 1039-1043.
- Sorensen UB 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 31: 2097-2100.
- Syrjanen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, Herva EE, Takala AK 2001. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. *J Infect Dis* 184: 451-459.
- Syrogianopoulos GA, Grivea IN, Davies TA, Katopodis GD, Appelbaum PC, Beratis NG 2000. Antimicrobial use and colonization with erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greece during the first 2 years of life. *Clin Infect Dis* 31: 887-893.
- Syrogianopoulos GA, Katopodis GD, Grivea IN, Beratis NG 2002. Antimicrobial use and serotype distribution of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered from Greek children younger than 2 years old. *Clin Infect Dis* 35: 1174-1182.
- Tano K, Grahn-Hakansson E, Holm SE, Hellstrom S 2000. Inhibition of OM pathogens by alpha-hemolytic streptococci from healthy children, children with SOM and children with rAOM. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 56: 185-190.

- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control and Hosp Epidemiol* 18: 426-439.
- Tong HH, Blue LE, James MA, DeMaria TF 2000. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 68: 921-924.
- Trucco O, Prado V, Inostroza J, Cabrera E, Teran R, Bravo I, Castillo L, Bustos R 1996. Prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina en niños que asisten a jardines infantiles en Santiago. *Rev Chilena de Pediatría* 67: 195 - 199.
- Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, Maruchi N, Totsuka K 2001. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns by viridans group streptococci. *Clin Infect Dis* 32: 1399-1407.
- Veenhoven RH, Bogaert D, Schilder AG, Rijkers GT, Uiterwaal CS, Kiezebrink HH, van Kempen MJ, Dhooge IJ, Bruin J, Ijzerman EP, de Groot R, Kuis W, Hermans PW, Sanders EA 2004. Nasopharyngeal pneumococcal carriage after combined pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccination in children with a history of recurrent acute otitis media. *Clin Infect Dis* 39: 911-919.

- Vela Coral MC, Fonseca N, Castaneda E, Di Fabio JL, Hollingshead SK, Briles DE 2001. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. *Emerg Infect Dis* 7: 832-836.
- Watt JP, O'Brien KL, Katz S, Bronsdon MA, Elliott J, Dallas J, Perilla MJ, Reid R, Murrow L, Facklam R, Santosham M, Whitney CG 2004. Nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for detection of pneumococcal carriage in adults. *J Clin Microbiol* 42: 4974-4976.
- Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam RR, Jorgensen JH, Schuchat A 2003. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 348: 1737-1746.
- World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention 1994. Manual for the national surveillance of antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* and *H. influenzae*: epidemiological and microbiological methods. *Programme for the control of acute respiratory infections*: 1-52.
- World Health Organization 1999. WHO Recommended Surveillance Standards. Acute lower respiratory infections (aLRTI) and pneumonia. WHO/CDS/CSRI/SR/99.2. http://www.who.int/emc_documents/surveillance/docs/whocdscsr992.pdf Acessado em 30 de agosto de 2005.
- World Health Organization 1999a. Laboratory Manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. http://www.who.int/emc_documents/meningitis/does/whocdscsredc997.pdf. Acessado em 30 de agosto de 2005.
- World Health Organization 2003. State of the art of new vaccines – Research & Development – Initiative for Vaccine Research – Geneva. Disponível em http://www.who.int/vaccine_research/documents/en/stateofart_excler.pdf. Acessado em 30 de agosto de 2005.

World Health Organization 2005. Estimates of disease burden and cost-effectiveness. Disponível em http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/estimates_burden/em/index.html Acessado em 30 de agosto de 2005.

World Health Report (WHO) 2005. Statistical annex on global burden in the 2005 World Health Report [pdf 56Kb]. Disponível em http://www.who.int/whr/2005/annex/annexes3-4_en.pdf. Acessado em 30 de agosto de 2005.

Yagupsky P, Porat N, Fraser D, Prajgrod F, Merires M, McGee L, Klugman KP, Dagan R 1998. Acquisition, carriage, and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in southern Israel. *J Infect Dis* 177: 1003-1012.

Yeh SH, Zangwill KM, Lee H, Chang SJ, Wong VI, Greenberg DP, Ward JI 2003. Heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* serogroup b and nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants. *Vaccine* 21: 2627-2631.

Yomo A, Subramanyam VR, Fudzulani R, Kamanga H, Graham SM, Broadhead RL, Cuevas LE, Hart CA 1997. Carriage of penicillin-resistant pneumococci in Malawian children. *Ann Trop Paediatr* 17: 239-243.

8. Publicações

Laval CB, de Andrade AL, Pimenta F, Andrade JG, Oliveira RM, Silva AS, Lima EC, Di Fabio JL, Casagrande ST, Brandileone MC. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:50-55

Andrade AL, Pimenta FC, Laval CA, de Andrade JG, Guerra ML, Brandileone MC. Invasive pneumococcal infection in a healthy infant caused by two different serotypes. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (5):2345-6.

Anexos

Lista de hospitais participantes do estudo

| Hospitais Públicos e Filantrópicos | Tipo |
|---|--------------------------------------|
| Hospital das Clínicas da UFG | Público, Universitário |
| Hospital de Doenças Tropicais | Público, Escola |
| Hospital Materno-Infantil | Público, Escola |
| Hospital Santa Casa | Filantrópico, Escola |
| Hospitais Privados | Tipo |
| Clínica Metropolitana | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Coração de Jesus | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital da Criança | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Cidade Jardim | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Dom Bosco | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Ebenézer | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Goiânia Leste | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Infantil de Campinas | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Lúcio Rebelo | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital Santa Bárbara | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital São Bernardo | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital São Judas Tadeu | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital São Miguel | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Hospital São Silvestre | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Instituto Goiano de Pediatria | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |
| Pronto Socorro Infantil de Goiânia | Conveniado ao Sistema Único de Saúde |

Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines

C. B. Laval¹, A. L. S. S. de Andrade², F. C. Pimenta², J. G. de Andrade^{2,3}, R. M. de Oliveira², S. A. Silva², E. C. de Lima², J. L. Di Fabio⁴, S. T. Casagrande⁵ and M. C. C. Brandileone⁵

¹Communicable Disease Surveillance, Secretariat of Health of the Municipality of Goiânia, ²Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, ³Tropical Diseases Hospital, Goiânia, Brazil, ⁴Pan-American Health Organization, Washington, DC, USA and ⁵Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* is a key factor in the development of invasive disease and the spread of resistant strains within the community. A single nasopharyngeal swab was obtained from 648 unvaccinated children aged <5 years, either healthy or with acute respiratory tract infection or meningitis, during the winters of 2000 and 2001. The overall pneumococcal carriage rate was 35.8% (95% CI 32.1–39.6). The pneumococcal serotypes found most frequently in the nasopharynx were 14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F and 18C, which included five of the seven serotypes in the currently licensed seven-valent conjugate vaccine (PCV7); serotypes 4 and 9V were less common. Serotypes 1 and 5 were isolated rarely from the nasopharynx. A comparison of 222 nasopharyngeal isolates with 125 invasive isolates, matched for age and time to the carrier isolates, showed a similar prevalence of penicillin non-susceptible pneumococci (PNSp) (19.8% and 19.2%, respectively). PNsP serotypes were similar (6B, 14, 19F, 19 A, 23B and 23F) for carriage and invasive disease isolates. The coverage of PCV7 for carriage isolates (52.2%) and invasive isolates (62.4%) did not differ significantly (p 0.06); similarly, there was no significant difference in PCV7 coverage for carriage isolates (34.5%) and invasive isolates (28.2%) of PNsP. These data suggest that PCV7 has the potential to reduce pneumococcal carriage and the number of carriers of PNsP belonging to vaccine serotypes.

Keywords Conjugate vaccine, invasive disease, nasopharyngeal carriage, pneumococci, serotypes, *Streptococcus pneumoniae*, vaccination

Original Submission: 8 April 2005; **Revised Submission:** 4 May 2005; **Accepted:** 14 June 2005

Clin Microbiol Infect 2006; 12: 50–55

INTRODUCTION

Asymptomatic nasopharyngeal (NP) carriage of *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in young children and precedes the development of invasive disease. Children with pneumococcal colonisation act as an important vector for horizontal spread of pneumococcal strains within the community [1,2]. There is evidence that individuals with *S. pneumoniae* invasive disease carry the same strain in their nasopharynx at the time of invasive infection [3,4]. Consequently, pneumo-

coccal carriage strains have been used as a proxy marker to predict drug resistance patterns and serotype prevalence for treatment and vaccine formulation, respectively [5,6]. In recent years, surveillance studies have reported increased NP colonisation by penicillin non-susceptible pneumococci (PNSp) [7,8]. The currently licensed seven-valent conjugate vaccine (PCV7), and other formulations of pneumococcal conjugate vaccines, confer protection against invasive disease caused by both susceptible pneumococci and PNsP [9]. Also, conjugate vaccines seem to be useful for reducing the carriage of vaccine-related serotypes, and could therefore decrease dissemination of PNsP in the community [10–12].

Data concerning serotypes causing invasive pneumococcal disease (IPD), as well as the

Corresponding author and reprint requests: A. L. S. S. de Andrade, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG, Rua235, esq. 1ª. Avenida, Setor Universitário, Goiânia, CEP: 74605-050, Brazil
E-mail: ana@iptsp.ufg.br

serotypes of NP carriage isolates, in developing countries are scarce. In Latin America, the frequency of invasive serotypes differs from that found in many other parts of the world, whereas no major difference has been found in the frequency of NP serotypes compared with other countries [13–15]. In Brazil, the country with the largest child population in Latin America, no previous study has compared the serotypes of pneumococcal carriage and IPD isolates, which could help to predict the future impact of the universal childhood conjugate vaccination programme. Therefore, the present study compared the penicillin susceptibility and serotype distribution of NP and IPD isolates. In addition, the potential coverage of the pneumococcal conjugate vaccines with respect to carriage serotypes was estimated in a population without previous pneumococcal immunisation.

MATERIALS AND METHODS

Study site and selection of participants

The investigation was conducted in the municipality of Goiânia (1 090 581 inhabitants), Central Brazil, as part of an ongoing prospective surveillance of *S. pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among children. The surveillance was carried out during the winter periods (18–21°C) of 2000 and 2001 (May–August) at 20 large paediatric hospitals in Goiânia. Children, aged <5 years, admitted with acute respiratory tract infection (including pneumonia) and meningitis, and also healthy children who attended the local childcare programme, were eligible. Children with underlying chronic illness, including immunological, renal, cardiac, hepatic or haematological diseases, were excluded. Parents were interviewed by trained health workers who were unaware of each child's carrier status. Information concerning demographic and clinical characteristics was recorded. In total, 648 children were studied; the sample size was calculated to detect a 30% prevalence of NP pneumococcal carriage (α error \pm 5%) and an estimated 20% prevalence of PNSp (α error \pm 5%). The study protocol was approved by the Regional Ethical Committee from the Federal University of Goiás; all guardians of the participating children gave informed consent.

Collection of NP swabs and microbiological procedures

NP swabs were collected from children with respiratory tract infection (RTI) and meningitis at the time of hospital admission. NP swabs were also collected from healthy children who attended the local childcare programme. NP specimens were collected with pernasal, extra-thin, flexible, calcium alginate swabs, then placed in Stuart transport medium tubes (Transwab; Medical Wire and Equipment, Corsham, UK) and transferred to the Laboratory of Bacteriology of the Federal University of Goiás within 6 h of collection, according to WHO standard methods [16]. *S. pneumoniae* was identified using

standard laboratory procedures, including morphology following Gram's stain, susceptibility to a 5- μ g optochin disk, and the bile solubility test. Isolates were preserved at -80°C . Penicillin breakpoints and MICs were determined and interpreted according to NCCLS guidelines [17]. Serotyping was performed at the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil) by Quellung reactions with standard antisera (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark).

Data analysis

A single nasopharyngeal specimen was obtained per child. For comparison purposes, 125 invasive isolates were selected, matched for age and time to the carrier isolates; the invasive isolates were retrieved mainly from cerebrospinal fluid of children admitted to public and private paediatric hospitals in Goiânia. The invasive pneumococci were isolated at each participating local hospital and then sent to the National Reference Center for *S. pneumoniae* (Adolfo Lutz Institute) for species confirmation, serotyping and susceptibility testing, as described previously [18]. The concordance between the serotypes included in the formulations of the PCV7, nine- (PCV9) and 11- (PCV11) valent conjugate vaccines and the NP and IPD isolates was used as an indicator of the serotype coverage of each conjugate vaccine. For the purposes of analysis, PNSp isolates were considered to include the intermediately-resistant isolates (MIC 0.1–1.0 mg/L) and the fully-resistant isolates (MIC \geq 2.0 mg/L). Data analysis was performed using Epi-Info 6.04 and SPSS v.10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Categorical data were compared using the chi-square (χ^2) or Fisher's exact test, as appropriate, with $p < 5\%$ (two-tailed) considered to be statistically significant.

RESULTS

Most participants were children aged <24 months (mean 13.8 ± 9.5 months), with males accounting for 53.2% of the study population. Almost half (46.6%) were healthy infants, while children with co-morbidity (RTI and meningitis) represented 53.4% of the participants. In total, 146 (24.5%) children had received antibiotics previously, mainly β -lactams (amoxicillin-clavulanate). Children with co-morbidity had a higher prevalence of previous antibiotic use (37.6%; 95% CI 32.1–43.3%) than did healthy children (10.7%; 95% CI 7.4–14.8%). A small proportion of children (5.4%) were attending day-care centres. The overall pneumococcal carriage rate was 35.8% (95% CI 32.1–39.6%), with a significantly higher prevalence of carriage among healthy children (41.4%) compared to those with co-morbidity (30.9%; $p < 0.05$). The mean age of children with pneumococcal carriage (14.1 ± 9.7 months) and children who were non-carriers (13.6 ± 9.5 months) was statistically similar.

The most frequent pneumococcal serotypes found in the nasopharynx were 14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F and 18C, which included five of the seven serotypes in PCV7; serotypes 4 and 9V were less common (Table 1). Serotypes 1 (0.5%) and 5 (0.9%) were isolated rarely from the nasopharynx, and ranked 13th (0.8%) and 5th (5.6%), respectively, among children with IPD. No significant difference was found in PCV7 coverage between the carriage serotypes and IPD serotypes, but the coverage of carriage isolates by the PCV9 and PCV11 vaccines was statistically lower than the coverage of IPD isolates (Table 2).

The PNSp serotypes were the same (6B, 14, 19F, 19A, 23B and 23F) for carriage and IPD isolates, with a predominance of serotypes 6B and 14, which together accounted for 63.7% (NPD) and 70.8% (IPD) of PNSp isolates. Among the 227 carriage isolates tested for penicillin susceptibility, 19.8% (95% CI 14.8–25.6%) were PNSp, compared with 19.2% (95% CI 12.7–27.2%) of 125 isolates from IPD. Similar proportions of healthy children and children with RTI were carriers of PNSp isolates (20.9% and 18.7%, respectively; $p > 0.05$). The proportion of PNSp carriage covered by the PCV7, PCV9 and PCV11 vaccines was 34.5%, 33.6% and 31.5%, respectively.

Table 1. *Streptococcus pneumoniae* in nasopharynx and in invasive disease of children, ranked by frequency of serotypes

| Nasopharynx isolates (n=222) | | | Invasive disease isolates (n=125) | | |
|------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|-----------|-----------------------|
| Serotypes | No. (%) | PNSp (n = 44) No. (%) | Serotypes | No. (%) | PNSp (n = 24) No. (%) |
| 14 | 33 (14.9) | 12 (27.3) | 14 | 26 (20.8) | 9 (37.5) |
| 6B | 29 (13.1) | 16 (36.4) | 6B | 18 (14.4) | 8 (33.3) |
| 6A | 24 (10.8) | – | 18C | 14 (11.2) | – |
| 19F | 19 (8.6) | 6 (13.6) | 19F | 10 (8.0) | 3 (12.5) |
| 10A | 15 (6.8) | – | 5 | 7 (5.6) | – |
| 23F | 14 (6.3) | 6 (13.6) | 23F | 6 (4.8) | 2 (8.3) |
| 18C | 11 (5.0) | – | 4 | 5 (4.0) | – |
| 19A | 10 (4.5) | 3 (6.8) | 6A | 5 (4.0) | – |
| 9N | 9 (4.0) | – | 9V | 4 (3.2) | – |
| 18A | 9 (4.0) | – | 18B | 4 (3.2) | – |
| 9V | 8 (3.6) | – | 9N | 3 (2.4) | – |
| 11A | 6 (2.7) | – | 10A | 3 (2.4) | – |
| 15B | 6 (2.7) | – | 19A | 3 (2.4) | 1 (4.2) |
| 7F | 5 (2.3) | – | 7C | 2 (1.6) | – |
| 3 | 3 (1.3) | – | 7F | 2 (1.6) | – |
| 23A | 3 (1.3) | – | 8 | 2 (1.6) | – |
| 4 | 2 (0.9) | – | 12F | 2 (1.6) | – |
| 5 | 2 (0.9) | – | Others ^c | 9 (7.2) | 1 (4.2) ^b |
| 12 | 2 (0.9) | – | | | |
| 18B | 2 (0.9) | – | | | |
| 22F | 2 (0.9) | – | | | |
| Others ^a | 8 (3.6) | 1 (2.3) ^b | | | |

^aserotypes 1, 7B, 7C, 8, 10F, 11, 22, 23B.

^bserotype 23B.

^cserotypes 1, 15B, 17F, 18A, 18F, 23B, 27, 28A, 34.

Table 2. Vaccine coverage of *Streptococcus pneumoniae* serotypes identified among carriage and invasive disease isolates

| Vaccine | Carriage isolates | | Invasive disease isolates | |
|--|-------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | n = 222 | % (95% CI) | n = 125 | % (95% CI) |
| 7-valent vaccine serotypes ^a | 116 | 52.2 (45.5–59.0) ^d | 78 | 62.4 (53.3–70.9) ^d |
| 9-valent vaccine serotypes ^b | 119 | 53.6 (46.8–60.3) ^e | 86 | 68.8 (59.9–76.8) ^e |
| 11-valent vaccine serotypes ^c | 127 | 57.2 (50.4–63.8) ^e | 87 | 69.6 (60.7–77.5) ^e |

^aSerotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F.

^b7-valent serotypes + serotypes 1 and 5.

^c9-valent serotypes + serotypes 3 and 7F.

^d $p < 0.06$.

^e $p < 0.05$.

ively. No statistical difference was observed in PCV7 coverage of PNSp when comparing carriage (34.5%; 95% CI 25.9–43.9%) and IPD (28.2%; 95% CI 18.6–39.5%) isolates.

DISCUSSION

A prevalence of 35.8% for pneumococcal NP carriage was found among children in central Brazil, which is significantly lower than that reported (55%) in a less-developed region of the country [19]. Brazil has a continental dimension, with pocket regions of socio-economic deprivation; therefore, results obtained in a particular region cannot be generalised to the country as a whole. It has been well-illustrated that pneumococcal carriage rates vary substantially in different areas of the world, depending upon geographic and socio-economic conditions [1]. The present study found that healthy children had higher pneumococcal NP carriage rates than did children with co-morbidity, which is consistent with the previous Brazilian report [19]. One possible explanation for these findings is the high usage of antimicrobial agents before hospitalisation among children with RTI [20].

The serotype distribution among NP isolates in the present investigation was similar to that found in previous studies in Brazil, the USA and other countries of Latin America and Europe [1,13,19]. Overall, the serotypes isolated from the nasopharynx included the most common serotypes causing invasive disease, with most being represented in the PCV7. The non-vaccine serotypes 6A and 19A, believed to show cross-reactivity with PCV7 [21], were also isolated in substantial proportions from the nasopharynx. Therefore, five and four serotypes would include 54% of carriage and invasive isolates,

respectively. In the USA and UK, only three and two serotypes, respectively, accounted for 50% of cases of IPD [22,23]. In contrast, a wide variety of pneumococcal serotypes has been associated with NP carriage in Asia, as well as with invasive disease [15,24]. These findings underscore the importance of pneumococcal NP colonisation in the development of community infection in some geographical regions.

The present study found that serotypes 1 and 5 were rare among NP carriage isolates, in contrast to the high prevalence of serotype 5 among the isolates causing paediatric invasive disease. Serotype 1 has been associated frequently with cases of pneumonia [18,25], and the small number of such cases represented among the present collection of IPD isolates has probably prevented more frequent detection of this serotype. It has been well-documented that serotypes 1 and 5 are among the most common IPD serotypes in Brazil and many other regions of the world, including developing and developed countries [14,18,26–29]. It has been hypothesised that, because of their virulence, serotypes 1 and 5 have a transient and fast passage through the nasopharynx before reaching the blood stream [30]. These assumptions agree with a recent meta-analysis, which provided evidence for a statistically significant inverse relationship between pneumococcal invasiveness and carriage prevalence, since serotypes 1 and 5 had the highest OR for being invasive and the lowest prevalence of NP colonisation [31].

Of note is the frequency of the non-vaccine serotype 10A among NP carriage and IPD isolates in the present dataset. Previous studies in some countries of Latin America [13] and other developed countries [1,32–34] have identified 10A as a frequent serotype among carriage and IPD isolates, although this has not been the case in other developing regions [15,35]. These observations emphasise the importance of continued monitoring of the regional prevalence of serotypes to predict the appropriate vaccine for a particular region or country as a whole.

The same frequency of PNSp (19%) was found among NP and IPD isolates, which endorses the assumption that the frequency of PNSp among NP isolates from children could be used as a surrogate indicator for the resistance rate among IPD isolates for the same region and period [1,5,36]. As shown previously [10], the frequency with which particular serotypes were isolated

from the nasopharynx and from sterile fluids in the present study population was associated with their likelihood to become penicillin-resistant, which supports the hypothesis that PNSp isolates are limited to a few serotypes (6B, 14, 19F, 23F, 19A) that frequently colonise children and cause paediatric infections [7,8].

Several recent publications have reported the effect of conjugate vaccines on the carriage of PNSp. Replacement of carriage serotypes with non-vaccine types (NVTs), which could acquire antibiotic resistance, is a matter of concern. In Israel, PCV9 reduced the carriage rate of PNSp by 24%, but increased the carriage of NVTs (usually penicillin-susceptible), leading to an overall reduction in carriage of PNSp [11]. In contrast, a reduction in the carriage of penicillin-resistant vaccine-type (VT) strains was observed following use of PCV7 in Portugal, but with an emergence of resistance in NVTs [37]. The decrease in the overall carriage of PNSp strains in vaccinated individuals was therefore not significant compared with the control group, and it was suggested that a reduction in the carriage of PNSp strains might require a combination of use of the conjugate vaccine and a decrease in antibiotic pressure. In Alaska, no impact on carriage of PNSp was observed after the introduction of PCV7 into the routine vaccination schedule [38]. The results of the present investigation suggest that the potential benefit, in terms of the reduction in carriage rate of PNSp, would be similar (*c.* 33%), regardless of the vaccine formulation, as serotypes 1 and 5 (PCV9) and 3 and 7F (PCV11) are not usually associated with penicillin resistance [29].

These findings highlight the importance of monitoring pneumococcal NP carriage as an indicator of penicillin susceptibility in settings where isolation of invasive pneumococcal isolates is difficult. In addition, continued surveillance of the distribution of serotypes among colonising isolates provides a baseline for further assessment of the impact of vaccination, particularly in regions, such as Brazil, where the introduction of pneumococcal conjugate vaccine is feasible.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was sponsored by the Division of Vaccines and Immunization from the Pan American Health Organization, WHO, the Bill and Melinda Gates Children's Vaccine

Program, Brazilian Council for Research and Development/CNPq (Research Grants # 308043/2004-9 and 303348/2004-6), and the Secretariat of Health of Goiânia Municipality.

REFERENCES

- Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**: 144–154.
- Givon-Lavi N, Fraser D, Porat N, Dagan R. Spread of *Streptococcus pneumoniae* and antibiotic-resistant *S. pneumoniae* from day-care center attendees to their younger siblings. *J Infect Dis* 2002; **186**: 1608–1614.
- de Andrade AL, Pimenta FC, Brandileone MC *et al*. Genetic relationship between *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal and cerebrospinal fluid of two infants with pneumococcal meningitis. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 3970–3972.
- Lloyd-Evans N, O'Dempsey TJ, Baldeh I *et al*. Nasopharyngeal carriage of pneumococci in Gambian children and in their families. *Pediatr Infect Dis J* 1996; **15**: 866–871.
- Lehmann D, Gratten M, Montgomery J. Susceptibility of pneumococcal carriage isolates to penicillin provides a conservative estimate of susceptibility of invasive pneumococci. *Pediatr Infect Dis J* 1997; **16**: 297–305.
- Kellner JD, McGeer A, Cetron MS *et al*. The use of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children to predict features of invasive disease. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17**: 279–286.
- Lee NY, Song JH, Kim S *et al*. Carriage of antibiotic-resistant pneumococci among Asian children: a multinational surveillance by the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). *Clin Infect Dis* 2001; **32**: 1463–1469.
- Muhlemann K, Matter HC, Tauber MG, Bodmer T. Nationwide surveillance of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with respiratory infection, Switzerland, 1998–99. *J Infect Dis* 2003; **187**: 589–596.
- Black S, Shinefield H, Baxter R *et al*. Postlicensure surveillance for pneumococcal invasive disease after use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Northern California Kaiser Permanente. *Pediatr Infect Dis J* 2004; **23**: 485–489.
- Mbelle N, Huebner RE, Wasas AD, Kimura A, Chang I, Klugman KP. Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1999; **180**: 1171–1176.
- Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Fraser D. Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. *Pediatric Infect Dis J* 2003; **22**: 532–539.
- O'Brien KL, Dagan R. The potential indirect effect of conjugate pneumococcal vaccines. *Vaccine* 2003; **21**: 1815–1825.
- Inostroza J, Trucco O, Prado V *et al*. Capsular serotype and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates in two Chilean cities. *Clin Diagn Laboratory Immunol* 1998; **5**: 176–180.
- Scott JA, Hall AJ, Hannington A *et al*. Serotype distribution and prevalence of resistance to benzylpenicillin in three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. *Clin Infect Dis* 1998; **27**: 1442–1450.
- Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL *et al*. Comparison of antibiotic resistance and serotype composition of carriage and invasive pneumococci among Bangladeshi children: implications for treatment policy and vaccine formulation. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5582–5587.
- World Health Organization. Manual for the national surveillance of antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* and *H. influenzae*: epidemiological and microbiological methods. *Programme for the Control of Acute Respiratory Infections*. Geneva: WHO, 1994.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 14th informational supplement M100-S14. Wayne, PA: NCCLS, 2004.
- Brandileone MC, de Andrade AL, Di Fabio JL, Guerra ML, Austrian R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis* 2003; **187**: 1206–1212.
- Rey LC, Wolf B, Moreira JL, Milatovic D, Verhoef J, Farhat CK. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2002; **20**: 86–92.
- de Andrade AL, de Andrade JG, Martelli CM *et al*. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine on childhood pneumonia: a case-control study in Brazil. *Int J Epidemiol* 2004; **33**: 173–181.
- Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. *J Infect Dis* 1999; **180**: 1569–1576.
- Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 2003; **187**: 1424–1432.
- Whitney CG, Farley MM, Hadler J *et al*. Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1917–1924.
- Coles CL, Kanungo R, Rahmathullah L *et al*. Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young South Indian infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001; **20**: 289–295.
- Tan TQ, Mason EO, Wald ER *et al*. Clinical characteristics of children with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; **110**: 1–6.
- Di Fabio JL, Castaneda E, Agudelo CI *et al*. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993–99. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J* 2001; **20**: 959–967.
- Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; **357**: 950–952.
- Lagos R, Munoz A, Valenzuela MT, Heitmann I, Levine MM. Population-based surveillance for hospitalized and ambulatory pediatric invasive pneumococcal disease in Santiago, Chile. *Pediatr Infect Dis J* 2002; **21**: 1115–1123.

29. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 83–93.
30. Klein DL. Pneumococcal conjugate vaccines: review and update. *Microb Drug Resist* 1995; **1**: 49–58.
31. Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis* 2004; **190**: 1203–1211.
32. Doit C, Loukil C, Geslin P, Bingen E. Phenotypic and genetic diversity of invasive pneumococcal isolates recovered from French children. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2994–2998.
33. Meats E, Brueggemann AB, Enright MC *et al.* Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 386–392.
34. Serrano I, Ramirez M, Melo-Cristino J, The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 652–656.
35. Soewignjo S, Gessner BD, Sutanto A *et al.* *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage prevalence, serotype distribution, and resistance patterns among children on Lombok Island, Indonesia. *Clin Infect Dis* 2001; **32**: 1039–1043.
36. Rowe AK, Deming MS, Schwartz B *et al.* Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in the Central African Republic. *Pediatr Infect Dis J* 2000; **19**: 438–444.
37. Frazao N, Brito-Avo A, Simas C *et al.* Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. *Pediatr Infect Dis J* 2005; **24**: 243–252.
38. Moore MR, Hyde TB, Hennessy TW *et al.* Impact of a conjugate vaccine on community-wide carriage of non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Alaska. *J Infect Dis* 2004; **190**: 2031–2038.

Invasive Pneumococcal Infection in a Healthy Infant Caused by Two Different Serotypes

Ana Lucia S. Sgambatti de Andrade,^{1*} Fabiana Cristina Pimenta,¹ Cristina Aparecida Borges Laval,² João Guimarães de Andrade,^{1,3} Maria Luiza Guerra,⁴ and Maria Cristina C. Brandileone⁴

Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás,¹ Epidemiological Surveillance Branch, Secretariat of Health of the Municipality of Goiânia,² and Tropical Diseases Hospital,³ Goiânia, and Bacteriology Branch, Adolfo Lutz Institute, Secretariat of Health of the State of São Paulo, São Paulo,⁴ Brazil

Received 8 November 2003/Returned for modification 7 January 2004/Accepted 26 January 2004

We present a case of invasive pneumococcal infection in a healthy 10-month-old infant from whom *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F was isolated from the blood and serotype 23B was isolated from the cerebrospinal fluid. Both serotypes were penicillin nonsusceptible. Pulsed-field gel electrophoresis analysis demonstrated that the two serotypes had distinct DNA patterns, indicating that infection did not occur as a result of capsular transformation but as a result of a mixed infection with two distinct pneumococcal serotypes.

CASE REPORT

In July 2001, a previously healthy 10-month-old boy was admitted to the Tropical Diseases Hospital in Goiânia, Central Brazil, with a 2-day history of fever, irritability, and vomiting. There was no history of otitis media, pulmonary infection, or immunosuppressive illness. He had received two doses of an oral antimicrobial 12 h before admission, but his parents did not know its name. He had previously received three doses of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine, but he had not been vaccinated against *Streptococcus pneumoniae*. On admission, he was afebrile. He had meningeal signs and a bulging fontanelle, but the rest of the physical exam was unremarkable. Blood cultures were obtained and a lumbar puncture was performed immediately. The cerebrospinal fluid (CSF) was cloudy, with a white cell count of 6,750 cells/ml (90% polymorphonuclear cells), a protein level of 85 mg/dl, and a glucose level of 63 mg/dl. A Gram stain of the CSF was negative. A complete blood count showed 26,500 leukocytes/mm³ (14% bands, 56% neutrophils, 26% lymphocytes, and 4% monocytes). The hemoglobin was 9.4 g/dl, the hematocrit was 28.3%, and the platelet count was 274,000/mm³. Treatment was begun with ceftriaxone (100 mg/kg of body weight/day) and dexamethasone, and after a 10-day course of treatment, the patient was discharged in good health.

Cultures of the patient's blood and CSF grew *S. pneumoniae*. According to NCCLS standards (9), both isolates were nonsusceptible to penicillin (MIC = 0.125 µg/ml) and trimethoprim-sulfamethoxazole (MIC = 4.0 µg/ml) and susceptible to chloramphenicol (MIC = 1.0 µg/ml for blood and 2.0 µg/ml for CSF), ceftriaxone (MIC = 0.06 µg/ml), vancomycin (MIC = 0.5 µg/ml), and erythromycin (MIC = 0.03 µg/ml). Both isolates were serotyped by the Quellung reaction with sera produced by the Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark. The tests were performed at the Adolfo Lutz Insti-

tute, the national reference center for *S. pneumoniae* located in São Paulo, Brazil. Serotype 23F was identified in the blood, and serotype 23B was identified in the CSF. These results were confirmed by the National Center for Streptococcus in Edmonton, Canada.

The genetic relatedness of the two pneumococcal isolates was investigated at the Adolfo Lutz Institute by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of chromosomal DNA after SmaI digestion, as previously described (8). As shown in Fig. 1, the two isolates presented different DNA restriction patterns (lanes A and B) with seven band differences according to the criteria of Tenover et al. (13).

Previous studies in the laboratory and in vivo have demonstrated the transfer of a large number of capsular polysaccharide genes between different pneumococcal serotypes (11). In our study, molecular typing provided crucial information for determining whether the two isolates belonged to the same or different clonal groups. PFGE showed that they differed in their DNA restriction patterns. These findings indicated that the two strains most likely belonged to different genetic lineages and that our patient had developed a mixed dual infection caused by two distinct pneumococcal serotypes. The two serotypes most likely had not arisen as a result of capsular transformation.

The frequency of dual infections with *S. pneumoniae* strains of different phenotypes and genotypes is unknown. The occurrence of dual infections might be underestimated since blood cultures are not routinely obtained in cases of suspected bacterial meningitis in Brazil. Moreover, CSF isolates are not usually submitted for genotyping in the majority of health center laboratories, and serotype results obtained in local laboratories are not normally sent to reference centers for confirmation. In this case it is conceivable to expect that both isolates were present in both the CSF and the blood, but they might have been present in insufficient numbers to be detected by culturing. Also, the current method of serotyping may underestimate the occurrence of dual infections. Coinfection with

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Rua Delenda R. Melo, S/N, Setor Universitário, 74605-050 Brazil. Phone and fax: 55-62-2027942. E-mail: ana@iptsp.ufg.br.

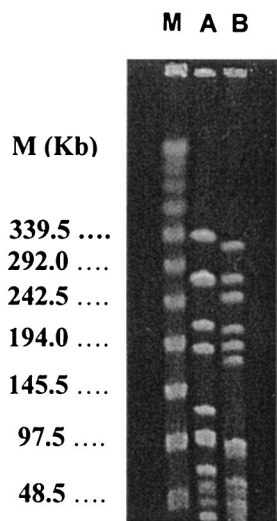


FIG. 1. PFGE patterns of two *S. pneumoniae* strains recovered from the same child. Lanes A and B, DNA restriction patterns revealed by PFGE performed with isolates from CSF (serotype 23B) and blood (serotype 23F), respectively; lane M, molecular size markers in kilobases.

different pneumococcal strains has been reported for immunodepressed individuals. Jordens et al. (7) detected pneumococcal coinfection in a human immunodeficiency virus-positive patient with two different strains recovered from lung aspirate (serotype 1) and blood (serotype 7C). A mixed meningococcal infection with genetically distinct pneumococcal strains (serotypes 7 and 9V) was recently reported for an alcoholic, diabetic patient (3). To our knowledge, this is the first reported case of bacteremia and meningitis due to different *S. pneumoniae* serotypes in an immunocompetent host.

The nasopharynx is often colonized by more than one pneumococcal serotype (10), raising the possibility that mixed invasive pneumococcal infections may not be uncommon events. Serotype 23F is an isolate frequently recovered from the nasopharynx. Although any pneumococcal serotype may invade a sterile site, some serotypes seem to prefer particular locations. For instance, serotypes 1, 3, 5, 6A or 6B, 9V, 14, 19F, and 23F have been associated with invasive infections (2, 4, 6). In our patient, finding serotype 23B in the CSF was unusual, since it is rarely found among *S. pneumoniae* strains causing invasive infections. In the study by Hausdorff and colleagues, serotype 23B was seldom found among serotypes that cause meningitis in Latin America (6). Similarly, in the analysis of 3,066 *S. pneumoniae* isolates from CSF derived from the Brazilian pneumococcal surveillance system, serotype 23B was identified in only 1% of isolates (2). In contrast, serotype 23F ranks as the second most commonly found serotype in CSF or blood in studies conducted in industrialized countries (1, 5) and is the sixth most common serotype in pneumococcal meningitis in children less than 5 years old in Brazil (2, 12). The serotype 23B isolate from the CSF of our patient was not only a non-

vaccine serotype, it was also not susceptible to penicillin. Serotype 23B is not included in any formulation of the 7- to 11-valent pneumococcal conjugate vaccines.

Our observations highlight the importance of molecular typing as an additional tool to optimize surveillance systems for invasive bacterial diseases. Continued surveillance will be necessary to determine the extent to which mixed pneumococcal infections occur and their implications for routine case management.

This investigation was financially supported by the Division of Vaccines and Immunization from the Pan American Health Organization/WHO, the Bill and Melinda Gates Children's Vaccine Program, the Brazilian Council for Research and Development/CNPq (research grant numbers 470792/01-9, 520399/00-5, and 520580/00-1), and the Secretariat of Health of Goiânia Municipality.

We are indebted to David Fedson for critically reviewing the manuscript. We also thank Albert Ko for his comments on the earlier phase of this report.

REFERENCES

- Alpern, E. R., E. A. Alessandrini, K. L. McGowan, L. M. Bell, and K. N. Shaw. 2001. Serotype prevalence of occult pneumococcal bacteremia. *Pediatrics* **108**(2):E23. [Online.] <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/2/e23>.
- Brandileone, M. C., A. L. de Andrade, J. L. Di Fabio, M. L. Guerra, and R. Austrian. 2003. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J. Infect. Dis.* **187**:1206–1212.
- Chaves, F., C. Campelo, F. Sanz, and J. R. Otero. 2003. Meningitis due to mixed infection with penicillin-resistant and penicillin-susceptible strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:512–513.
- Di Fabio, J. L., E. Castaneda, C. I. Agudelo, F. De La Hoz, M. Hortal, T. Camou, G. Echaniz-Aviles, M. Noemi, C. Barajas, I. Heitmann, J. C. Hormazabal, M. C. Brandileone, V. S. Dias Vieira, M. Regueira, R. Ruvinski, A. Corso, M. Lovgren, J. A. Talbot, C. De Quadros, et al. 2001. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**:959–967.
- Doit, C., C. Loukil, P. Geslin, and E. Bingen. 2002. Phenotypic and genetic diversity of invasive pneumococcal isolates recovered from French children. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2994–2998.
- Hausdorff, W. P., J. Bryant, C. Kloek, P. R. Paradiso, and G. R. Siber. 2000. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin. Infect. Dis.* **30**:122–140.
- Jordens, J. Z., J. Paul, J. Bates, C. Beaumont, J. Kimari, and C. Gilks. 1995. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* from human immunodeficiency virus-seropositive patients with acute and recurrent pneumonia. *J. Infect. Dis.* **172**:983–987.
- Lefevre, J. C., G. Faucon, A. M. Sicard, and A. M. Gasc. 1993. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2724–2728.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- O'Brien, K. L., H. Nohynek, and World Health Organization Pneumococcal Vaccine Trials Carriage Working Group. 2003. Report from a WHO working group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**:133–140.
- Ottolenghi-Nightingale, E. 1972. Competence of pneumococcal isolates and bacterial transformations in man. *Infect. Immun.* **6**:785–792.
- Reis, J. N., S. M. Cordeiro, S. J. Coppola, K. Salgado, M. G. S. Carvalho, L. M. Teixeira, T. A. Thompson, R. R. Facklam, M. G. Reis, and A. I. Ko. 2002. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **40**:275–277.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233–2239.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)