

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

**Cáritas Marquez Franco**

**FATORES DE RISCO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE  
*Streptococcus pneumoniae* NÃO SUSCETÍVEIS À PENICILINA ISOLADOS DE  
NASOFARINGE DE CRIANÇAS QUE FREQUENTAM CRECHES EM  
GOIÂNIA-GO, BRASIL.**

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia S. S. de Andrade**

**Tese de Doutorado**

**Goiânia – Go**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor(a):	Cáritas Marquez Franco		
CPF:	253 515 241-04	E-mail:	caritasmfranco@uol.com.br
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor(a)	Secretaria Municipal de Saúde – Diretoria de Vigilância em Saúde Hospital de Doenças Tropicais Universidade Católica de Goiás		
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	Go
CNPJ:			
Título:	FATORES DE RISCO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> NÃO SUSCETÍVEIS À PENICILINA ISOLADOS DE NASOFARINGE DE CRIANÇAS QUE FREQUENTAM CRECHES EM GOIÂNIA-GO, BRASIL.		
Palavras-chave:	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , portador de pneumococo, fatores de risco, epidemiologia molecular, pneumococo sorotipo 14, clone Spain <sup>9V</sup> -3, creches, <i>S. pneumoniae</i> não tipáveis.		
Título em outra língua:	Risk factors and molecular epidemiology of penicillin nonsusceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates in nasopharynx of children attending day-care centers in Goiânia-GO, Brazil.		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Streptococcus pneumoniae</i> carriage, nonsusceptible pneumococcal carriage, risk factors for pneumococcal carriage, day care centers, molecular epidemiology, non(sero)-typeable <i>S. pneumoniae</i> , pneumococcal clone Spain <sup>9V</sup> -3.		
Área de concentração:	Epidemiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	17/02/2009		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical		
Orientador(a):	Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Ana Lucia Sampaio Sgambatti de Andrade		
CPF:	235 715 191-91	E-mail:	ana@iptsp.ufg.br
Co-orientador(a):			
CPF:		E-mail:	

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>       total       parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 10 / 06 / 2009

\_\_\_\_\_  
Cáritas Marquez Franco  
Assinatura do(a) autor(a)

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

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

**Cáritas Marquez Franco**

**FATORES DE RISCO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE**  
***Streptococcus pneumoniae* NÃO SUSCETÍVEIS À PENICILINA ISOLADOS DE**  
**NASOFARINGE DE CRIANÇAS QUE FREQUENTAM CRECHES EM**  
**GOIÂNIA-GO, BRASIL.**

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia S. S. de Andrade

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, área de concentração: Epidemiologia.

Este trabalho foi realizado com o apoio da Secretaria Municipal de Saúde e de Educação de Goiânia e do CNPq.

**Goiânia – GO**

**2009**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(GPT/BC/UFG)**

Franco, Cáritas Marquez.

F825f Fatores de risco e epidemiologia molecular de *Streptococcus pneumoniae* não suscetíveis à penicilina isolados de nasofaringe de crianças que freqüentam creches em Goiânia - GO, Brasil [manuscrito] / Cáritas Marquez Franco. – 2009.  
xvi, 139 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia S. S. de Andrade.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia f. 102-129.

Inclui lista de tabelas, figuras e abreviaturas.

Anexos.

1. *Streptococcus pneumoniae* – Crianças – Vacinas
2. *Streptococcus pneumoniae* – Penicilina – Creches Goiânia (GO)
3. *Streptococcus pneumoniae* 4. Epidemiologia molecular I. Andrade, Ana Lucia S. S. de II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 579.862(817.3)

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho ao Roberto,  
Mariana e Gabriel.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade desse aprendizado;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia S. S. de Andrade, a quem admiro, dentre outras razões, por sua capacidade de produção científica, agradeço pela orientação, atenção dispensada, e pela enriquecedora convivência;

Ao Prof. MSc Renato Maurício de Oliveira, pela constante disposição em compartilhar seu conhecimento e pela orientação competente e ética no trabalho de campo;

À colega Prof<sup>a</sup>. MSc Juliana Lamaro-Cardoso pela realização da tipagem molecular dos pneumococos, fundamental para a realização desse estudo, e pela construção do dendrograma de similaridade genética.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia C. Dantas pela disposição e simpatia na transferência do conhecimento e pela orientação na classificação pelos critérios de Tenover;

Ao Prof. Dr. Leandro LG Oliveira, pela construção do dendrograma de similaridade genética.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Dalva Turchi, à Prof<sup>a</sup>. Regina Maria Brigel Martins e ao Prof. Dr. Albenones José de Mesquita pelas contribuições durante o processo de qualificação;

A todos os professores da pós-graduação, pelos conhecimentos ministrados.

À Dr<sup>a</sup>. Cristina M.C. Brandileone, do Instituto Adolfo Lutz-SP, pelo suporte laboratorial, imprescindível para a execução desse trabalho.

Ao Prof. João Guimarães de Andrade, pelas contribuições na execução desse trabalho;

Às amigas Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Aparecida Borges Laval e Prof<sup>a</sup>. MSc Eliane Terezinha Afonso, pela amizade e constante incentivo durante essa caminhada;

Às amigas de percurso: Ana Cláudia Alves de Oliveira, Carla Natalina da Silva Fernandes, Cibele Gomes da Silva, Karine Machado Siqueira, Kelly Moreira Rangel, Licia Kamila Assis de Melo, Lorena da Motta Silva, Maria Aparecida Vieira, Tatielle Pereira da Silva pela colaboração na realização deste trabalho;

À Inácia Araújo, chefe da Divisão de Saúde da Mulher, Criança e Adolescente, e as colegas da Secretaria Municipal de Saúde, pelo companheirismo e pela disposição em ajudar na realização desse trabalho;

Ao Prof. MSc Gélcio Sisterole de Carvalho, e demais colegas do Departamento de Medicina da Universidade Católica de Goiás, pelo companheirismo;

Ao meu amigo Carlos Henrique Reis Rochael, pelo suporte em informática, de maneira eficiente, fundamental para condução desse trabalho;

Ao meu avô Pedro Garcia da Conceição pelo exemplo de vida, dedicação ao estudo e amor irrestrito;

Aos meus irmãos Adolfo Franco Júnior, Glaucimeire Marquez Franco e Ariane Marquez Franco, pelo convívio, incentivo e amor;

Aos Meus pais Adolfo Simões Franco e Augusta Marquez Franco por constituírem uma referência tão importante em minha vida;

Ao meu esposo Roberto Miranda Pacheco, por compactuar com todos os projetos de minha vida, agradeço o apoio incondicional;

Aos meus filhos, Mariana e Gabriel, minha maior realização, agradeço pela compreensão e disposição em abrir mão de precioso tempo de convívio.



## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>SUMÁRIO</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. PREFÁCIO</b> .....	1
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	2
Colonização pelo <i>S. pneumoniae</i> na infância .....	2
Sorotipos associados à colonização .....	3
Relação entre cepas de nasofaringe e doença invasiva .....	6
Suscetibilidade antimicrobiana de cepas colonizadoras.....	8
Similaridade genética entre cepas colonizadoras e invasivas.....	9
Epidemiologia molecular do <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	14
Fatores de risco para o portador resistente .....	23
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	31
Objetivo geral.....	31
Objetivos específicos.....	31
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	32
População e área de estudo .....	32
Coleta de dados .....	32
Amostragem e tamanho da amostra .....	33
Coleta de swabs de nasofaringe .....	33
Isolamento e Identificação .....	34
Sorotipagem .....	34
Ensaio <i>Multibead</i> .....	35
Teste de suscetibilidade.....	35

Análise do DNA cromossômico .....	36
Análise dos dados.....	40
Análise do Gel.....	41
<b>6. 1º ARTIGO.....</b>	<b>43</b>
Franco CM, Andrade JG, Silva SA, Oliveira RM, Pimenta F, Lamaro-Cardoso J, Almeida SG, Calix JJ, Nahm MH, Brandileone MCC, Andrade ALS 2009. Carriage and risk factors for penicillin nonsusceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates in children attending day-care centers in Brazil. Submetido à publicação.	
<b>7. 2º ARTIGO.....</b>	<b>74</b>
Franco CM, Lamaro-Cardoso J, Dantas MCC, Oliveira LLG, Kipnis A, Rocha CGBB, Andrade JG, Lemes S, Calix JJ, Nahm MH, Almeida SCG, Brandileone MCC, Andrade ALS 2009. Molecular epidemiology of penicillin nonsusceptible pneumococcal carriage and invasive isolates from children in Goiânia, Brazil.	
<b>8. LIMITAÇÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>9. CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>10. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>130</b>
<b>    PROTOCOLO.....</b>	<b>132</b>
<b>    TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>134</b>
<b>    QUESTIONÁRIO .....</b>	<b>137</b>

**LISTA DE FIGURAS**

## 1º artigo

Figure 1. Flow chart of nasopharyngeal (NP) swabs collected from children attending DCCs in Brazil, 2005 ..... 70

Figure 2. Box-plot of minimum inhibitory concentration (MIC  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1) for penicillin for nonsusceptible (R) and susceptible (S) isolates to the antimicrobials tested..... 72

## 2º artigo

Figure 1. Dendrogram depicting the genetic relatedness among 101 penicillin nonsusceptible serotype 14 from carriage and invasive *S. pneumoniae* strains and 22 non(sero)typeable isolates. .... 96

Figure 2. Dendrogram of the genetic relatedness of 22 nontypeable penicillin-nonsusceptible *S. pneumoniae* from carriage isolates..... 97

Figure 3. Box-plot of minimum inhibitory concentration (MIC  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1) to penicillin for *S. pneumoniae* clusters detected by the dendrogram of the genetic similarity of serotype 14 and non(sero)typeable strains ..... 98

## LISTA DE TABELAS

### Tese

Tabela 1. Estudos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em nasofaringe de crianças realizados no Brasil, 2000 – 2008 .....	5
Tabela 2. Clones internacionais de <i>Streptococcus pneumoniae</i> detectados no Brasil e publicados no site PMEN .....	13
Tabela 3. Estudos sobre a similaridade genética de cepas colonizadoras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em crianças .....	15
Tabela 4. Clones internacionais de <i>Streptococcus pneumoniae</i> utilizados para avaliar a similaridade genética entre cepas colonizadoras e invasivas circulantes no município de Goiânia, 2005 .....	39

### 1º artigo

Table 1. Number of nonsusceptible isolates of penicillin nonsusceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotypes recovered from nasopharyngeal carriage of day-care children. Goiânia, Brazil, 2005 .....	68
Table 2. Potential variables associated with carriage of penicillin-non-susceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i> among infants attending DCCs in Brazil, 2005 .....	69

### 2º artigo

Table 1. Characterization and origin of the penicillin nonsusceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates submitted to genetic analysis .....	93
Table 2. Characteristics and genetic similarity of pneumococcal clusters according to carriage and invasive strains and capsular type by PFGE .....	94

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIDS	- <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA)
AOM	- <i>Acute Otitis Media</i> (Otitie Média Aguda – OMA)
AP-PCR	- <i>Arbitrary primed polymerase chain reaction</i>
AR	- Alta Resistência
BHI	- <i>Brain heart infusion</i>
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CIMPEN	- Concentração inibitória mínima para penicilina
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMEIs	- Centros Municipais de Educação Infantil
CNPq	- Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONEP	- Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa
CRIE	- Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais
CV	- Centro de Vacinação
DATASUS	- Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DCCs	- <i>Day care centers</i> (Creches)
DLV	- <i>Double-locus variants</i>
DPI	- Doenças pneumocócicas invasivas
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- <i>Federal Drug Administration</i>
HC/UFG	- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Virus da Imunodeficiência Humana)
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPD	- <i>Invasive Pneumococcal disease</i>

IPTSP	- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
IRA	- Infecção Respiratória Aguda
LACEN	- <i>Public Health Laboratory of Goiás State</i>
mAbs	- <i>Monoclonal antibodies</i>
MDR	- <i>Multidrug resistance</i>
MIC	- <i>Minimum inhibitory concentration</i>
MLST	- <i>Multilocus sequence typing</i>
MS	- Ministério da Saúde
NF	- Nasofaringe
NP	- <i>Nasopharyngeal</i>
NTPn	- <i>Notypeable pneumococcal</i>
OMA	- Otite média aguda
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i>
PEN	- Penicilina
PFGE	- <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (Eletroforese em campo pulsado)
DPI	- Doença Pneumocócica Invasiva
PMEN	- <i>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network</i>
PneumoADIP	- <i>Pneumococcal vaccines Accelerated Development and Introduction Plan</i>
PNSp	- <i>Penicillin non-susceptible Streptococcus pneumoniae</i>
PSSp	- <i>Penicillin susceptible pneumococcal</i>
RFEL	- <i>Restriction fragment end labeling</i>
RI	- Resistência Intermediária
RN	- Recém Nascido
SLV	- Single-locus variants
SpNP	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> não suscetíveis

SpNT	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> não tipáveis
ST	- <i>Sequence typing</i>
TSB	- <i>Trypticase soy broth</i>
UFG	- Universidade Federal de Goiás
UK	- <i>United Kingdom</i>
UPGMA	- <i>Unweighted Pair-Groups Method using Arithmetic Averages</i>
USA	- <i>United States of America</i>
VPC	- Vacina pneumocócica conjugada
VPC7	- Vacina pneumocócica conjugada 7-valente
VPC10	- Vacina pneumocócica conjugada 10-valente
VPC13	- Vacina pneumocócica conjugada 13-valente
WHO	- <i>World Health Organization</i>

## Resumo

**Objetivo:** (i) identificar fatores associados à colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae* não suscetíveis à penicilina em crianças que frequentam creches no município de Goiânia-GO e caracterizar geneticamente as cepas não suscetíveis; (ii) determinar a cobertura das vacinas conjugadas pneumocócicas 7, 10 e 13 valente; (iii) avaliar o relacionamento genético entre cepas do sorotipo 14 e pneumococos não tipáveis (PnNT); (iv) identificar a presença de cepas colonizadoras relacionadas geneticamente aos clones internacionais de *S. pneumoniae*.

**Metodologia:** Um estudo de prevalência de portador de pneumococo não suscetível à penicilina (SpNP) foi conduzido de agosto a dezembro de 2005, em 1192 crianças de dois a 59 meses de idade, atendidas em 62 creches em Goiânia. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana seguiram as recomendações do CLSI de 2007 e a sorotipagem foi realizada pela reação de Quellung e confirmada por ensaio *multibead*. Isolados PnNT e do sorotipo 14 foram analisados por reação de PCR. Odds ratio para portador de SpNP e respectivos intervalos de 95% de confiança foram estimados por regressão logística. Para avaliar a similaridade genética entre os isolados de portador (sorotipo 14 e PnNT) e isolados invasivos (sorotipo 14) obtidos de crianças de Goiânia utilizou-se amostras de isolados invasivos de um estudo maior de vigilância populacional que vem sendo conduzido desde 2007. Assim, eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi utilizada para a tipagem molecular. Definiu-se como linhagem a presença de três ou mais cepas resistentes com similaridade genética  $\geq 80\%$ .

**Resultados:** *S. pneumoniae* foi isolado de 686 (57,6%) crianças das creches e 178 (25,9%) dessas eram portadoras de SpNS. Sorotipo 14 (53%), 23F (10,2%), 6B (6%), 19F (4,8%) e 19A (4,2%) estavam presentes em 78,2% dos PnNS. Detectou-se alta prevalência (11,1%) de isolados não tipáveis, dos quais 62,9% eram resistentes à penicilina. A cobertura dos sorotipos colonizadores para as vacinas 7-valente, 10-valente e 13-valente foi respectivamente 55,2%, 55,9% e 65,1%. Crianças menores de 24 meses de idade (OR=1,79; p=0,006), hospitalização nos últimos três meses (OR=2,19; p=0,025), e otite média aguda recorrente (OR=2,89; p=0,013) foram fatores



independentemente associados com SpNS na análise multivariada. Entre os 123 isolados submetidos à PFGE, 106 eram de nasofaringe de crianças das creches, dos quais 84 expressavam a cápsula tipo 14 e 22 eram isolados PnNT. Todas as cepas invasivas eram sorotipo 14. A maior linhagem agrupou 34 pneumococos do sorotipo 14, com 82,7% de similaridade, os quais foram geneticamente relacionados ao clone Spain<sup>9V</sup>-3. Todas as cepas PnNT apresentaram *locus* para o gene da cápsula para o tipo 14. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os valores da CIM para a penicilina entre as três principais linhagens (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ).

**Conclusões:** (i) crianças com otite média recorrente podem exercer papel importante na disseminação de pneumococos resistentes para a comunidade; (ii) Evidências genéticas apóiam os achados de que cepas de pneumococo não tipáveis assemelham-se ao genótipo das cepas do sorotipo 14; (iii) isolados de portadores e invasivos que circulam em Goiânia pertencem a um sorotipo 14 variante do clone Spain<sup>9V</sup>-3, responsável pela disseminação da resistência do pneumococo na população pediátrica de Goiânia.

**Palavras chave:** *Streptococcus pneumoniae*, portador de pneumococo, fatores de risco, epidemiologia molecular, pneumococo sorotipo 14, clone Spain<sup>9V</sup>-3, creches, *S. pneumoniae* não tipáveis.

## Abstract

**Objectives:** (i) to identify risk factors for *S. pneumoniae* penicillin nonsusceptible isolates (PNSp) in children attending day-care centers (DCCs) in Goiânia, Brazil and to assess the genetic patterns of pneumococcal isolates; (ii) to estimate the coverage for carriage serotypes for the 7-valente (PCV7) pneumococcal conjugate vaccine, and for the investigational 10 (PCV10) and 13-valent (PCV13) vaccines; (iii) to assess the genetic relatedness between isolates expressing capsular type 14 and those non(sero)-typeable isolates (NTPn); (iv) to investigate if carriage isolates match genetically to any international pneumococcal clone (PMEN network).

**Methods:** A cross-sectional survey of carriage PNSp was conducted among 1.192 children, 2 months to 5 years of age, attending 62 DCCs in Central Brazil. Capsular typing was performed in PNSp isolates (CLSI, 2007) and in a sample of isolates susceptible to penicillin (PSSp) matched to PNSp and DCCs whenever possible. Serotyping was performed by Quellung reactions and confirmed by multibead assay. NTPn isolates and serotype 14 were tested by PCR for capsule genes. Odds ratio for PNSp carriage and respective 95% confidence interval (95%CI) were assessed by logistic regression. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was applied to assess the genetic similarity between PNSp serotype 14 and NTPn isolates. PCR was performed for the presence of pneumococcal capsule gene locus. For comparison purpose we also evaluated the genetic profile of PNSp serotype 14 invasive strains derived from the current pneumococcal invasive disease surveillance for the same pediatric population. Isolates were epidemiologically related if they shared  $\geq 80\%$  similarity on the dendrogram (Dice coefficient). A cluster was defined as three or more related isolates.

**Results:** A total of 686 pneumococci were isolated for a colonization rate of 57.6% and 178 (25.8%) were PNSp. Among the PNSp isolates the usual common types were found: 14 (53%), 23F (10.2%), 6B (6%), 19F (4.8%) and 19A (4.2%). PSSp isolates displayed 30 different serotypes although serotype 14 was the most common. Overall a high prevalence of NTPn (11.1%) was observed with 62.9% PNSp. Serotypes coverage

for the PCV7, PCV10 and PCV13 vaccines were 55.2%, 55.9% and 65.1%, respectively. Being less than 24 months of age (OR=1.79; p=0.006), hospitalization in the previous three months (OR=2.19; p=0.025), and recurrent acute otitis media (OR=2.89; p=0.013) were independently associated with PNSp in a multivariate model. Among the 123 PNSp submitted to PFGE (106/carriage and 17/ invasive isolates) a major group of 34 serotype 14 strains (8 invasive and 26 carriage) was identified and found to be genetically related to the global pneumococcal clone Spain<sup>9V</sup>-3 (82.7% similarity). All NTPn presented capsule gene locus and 10 (45.4%) of them presented capsule gene locus to type 14.

**Conclusions:** (i) DCC attendees with history of recurrent AOM could significantly contribute to the spread of nasopharyngeal PNSp strains into the community; (ii) epidemiologic and molecular evidences support the findings that pneumococcal non-typeable carriage isolates are genetically similar to carriage and invasive isolates expressing capsular type 14; (iii) carriage and invasive isolates circulating in Goiânia belong to a serotype 14 variant of the Spain<sup>9V</sup>-3 clone and play a critical role in the spread of PNSp strains to the entire pediatric community of Goiânia.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae* carriage, nonsusceptible pneumococcal carriage, risk factors for pneumococcal carriage, day care centers, molecular epidemiology, non(sero)-typeable *S. pneumoniae*, pneumococcal clone Spain<sup>9V</sup>-3.

## 1. PREFÁCIO

Este trabalho integra um esforço conjunto de pesquisas epidemiológicas conduzidas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) com o objetivo de melhor compreender a colonização por pneumococo em uma população sem imunização prévia. Foram investigados a suscetibilidade antimicrobiana, sorotipos e fatores de risco para *Streptococcus pneumoniae* não suscetíveis (SpNP) em crianças saudáveis que frequentam creches em Goiânia, capital do Estado de Goiás. Neste sentido, amplia-se o conhecimento sobre o *S. pneumoniae* em seu *habitat* natural, uma vez que, é o primeiro estudo conduzido em creches do Brasil para identificar fatores de risco associados à ocorrência de cepas de pneumococo resistentes à penicilina. Faz uso da epidemiologia molecular para verificar o relacionamento genético entre cepas de pneumococos de nasofaringe de crianças que frequentam creches. Possibilita a construção de uma linha de base para avaliar o impacto da vacinação na transmissão da resistência antimicrobiana do *S. pneumoniae*, que é um importante aspecto a ser considerado no planejamento da introdução dessa vacina na rotina de imunização, e também, o impacto na seleção e emergência de novos clones.

Esta tese é composta de uma revisão da literatura sobre o tema, descrição detalhada da metodologia, dois artigos e conclusão.

## 2. INTRODUÇÃO

### **Colonização pelo *S. pneumoniae* na infância**

O *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva, capsulada em forma de cocos arranjados aos pares (diplococos), pertencente ao gênero *Streptococcus*, família *Streptococcaceae* (Deibel & Seeley 1974). A cápsula é responsável pela diferenciação da espécie em tipos sorológicos, ou sorotipos, baseados nas suas diferenças químicas e imunogênicas (Henrichsen 1995).

Doenças causadas por *S. pneumoniae* constituem o principal problema de saúde pública nos dias atuais. Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em um milhão o número de mortes por infecções pneumocócicas em crianças menores de cinco anos de idade. A maioria dessas mortes ocorreu em países pobres e em crianças menores de dois anos de idade (WHO 2007).

O pneumococo causa doenças como otite, sinusite, conjuntivite aguda e doenças invasivas como pneumonia, meningite, bacteremia e septicemia (Mulholland 2003, Shouval et al. 2006, WHO 2007). Nos países em desenvolvimento, a pneumonia por pneumococo é responsável pela maioria das mortes em crianças menores de cinco anos (WHO 2007). Dentre as doenças preveníveis por vacinas, as pneumocócicas são as principais causas de mortalidade em crianças (PneumoADIP 2008). No Brasil, estima-se que os gastos anuais com internação por pneumonia na infância vêm crescendo substancialmente desde 1999, ultrapassando sessenta e quatro milhões de dólares, em 2003 (Fuchs 2005).

Como reservatório natural, a nasofaringe é a porta de entrada para o pneumococo, de onde ocorre a disseminação na comunidade, por meio do contato interpessoal (Bogaert et al. 2001). Assim, embora seja alta a morbidade e mortalidade associada ao *S. pneumoniae* a doença pneumocócica é menos frequente do que a colonização (CDC 2000). A colonização das vias respiratórias pelo *S. pneumoniae* precede a ocorrência de infecção comunitária e doença invasiva (Bogaert et al. 2004). A colonização depende principalmente da idade, inicia precocemente nas primeiras semanas de vida em países em desenvolvimento, com aumento significativo antes dos

dois anos de vida (Gray et al. 1980, Hill et al. 2006, Granat 2007). Em estudos prospectivos em Gâmbia, a média de idade do portador para a primeira aquisição é de 33 dias (Hill et al. 2008). Na Papua Nova Guiné a taxa de portador em bebês de um mês de idade e aos três meses de idade foi respectivamente de 84% e 100% (Gratten et al. 1986). Diferentemente, na Finlândia somente 12% dos bebês encontram-se colonizados aos três meses de idade, aumentando para 43% aos dois anos (Syrjanen et al. 2001). As razões para tais diferenças geográficas não estão bem determinadas. É possível que a colonização materna seja o principal fator (Hill et al. 2006). Dentre os fatores associados à colonização da nasofaringe, está a permanência em creches e berçários, devido ao contato muito próximo e constante entre as crianças (Dunais et al. 2003, Bogaert et al. 2004a,). Em creches, altas taxas de portador de *S. pneumoniae* têm sido descritas em vários países, como Islândia (50%) (Hjaltested et al. 2003), Suécia (52%) (Henriques et al. 2003) e França (54,7%) (Dunais et al. 2003). Em Portugal, a taxa de crianças portadoras em creches aumentou de 47% em 1996 para 60% em 1998 (Sá-Leão et al. 2000). As razões para tal aumento não estão claramente elucidadas. Especula-se que esse aumento deve-se a otimização da técnica de coleta dos espécimes de nasofaringe (Nunes et al. 2005).

### **Sorotipos associados à colonização**

Os tipos capsulares de portadores de nasofaringe apresentam variações intra e inter países, e com o grupo etário. Entretanto, em geral, a distribuição dos sorotipos de portadores é semelhante nos países industrializados com predomínio dos sorotipos 19F, 6B, 6A, 14, 18C e 23F em crianças com menos de três anos de idade (Parry et al. 2000, Syrogiannopoulos et al. 2000, Bogaert et al. 2001, Coles et al. 2001, Syrjanen et 2001). Nos países em desenvolvimento, a distribuição dos sorogrupos é ligeiramente diferente, sendo igualmente importantes os sorogrupos 15, 33, 12 e 3 (Mbelle et al. 1999, Soewignjo et al. 2001). Na América Latina, a frequência dos sorotipos é similar aos encontrados em países americanos e europeus, predominando os sorotipos 14, 6A, 6B, 19F e 23F (Mogdasy et al. 1992, Novales et al. 1997, Inostroza et al. 1998, Peñuela et al. 1999, Gómez-Barreto et al. 2002, Rey et al. 2002a, Ochoa et al. 2005, Laval et al. 2006, Berezin et al. 2007). Os resultados obtidos no Brasil estão sumarizados na Tabela 1, onde se observa que: (i) os estudos se iniciam no final da década de 90; (ii) são

conduzidos em creches, em crianças saudáveis e com doença invasiva; (iii) a prevalência de portador varia de 13,9% a 72%, sendo a maior prevalência encontrada em crianças em creche; (iv) os testes de sorotipagem são recentes; (v) a alta resistência vem crescendo; e (vi) nenhum estudo avaliou fatores de risco para resistência à penicilina.

**Tabela 1.** Estudos de *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe de crianças realizados no Brasil, 2000 - 2008.

Referência bibliográfica	Local	Período	População			Prevalência			Sorotipos	Resistência à penicilina
			Idade	N	Elegibilidade	N	%	(IC 95%)		
Wolf et al. 2000	Fortaleza-CE	98 - 98	< 5 anos	ND <sup>a</sup>	Pneumonia Creches Sala vacinação	435	ND	--	1, 3, 4, 6, 7, 0, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 33A	CIM <sup>b</sup> ≥0,12mg/L
Ferreira et al. 2001	São Paulo-SP	97 - 98	< 5 anos	400	IRA <sup>c</sup>	139	34,8	(30,1-39,6)	NR <sup>d</sup>	15,6%
Ribeiro et al. 2001	Salvador-BA	2000	< 5 anos	44	Saudáveis	30	68,2	(52,4-81,4)	NR	--
Rossi et al. 2001	4 macro-regiões	99 - 00	< 5 anos	2521	Creches	350	13,9	(12,5-15,3)	NR	9,2% - RI <sup>e</sup>
Rey et al. 2002, 2002a	Fortaleza-CE	98	< 5 anos	911	Total: Pneumonia Creches	500	55,0 50,0 72,0	(50,2-59,5) (43,5-56,5) (62,1-79,9)	6, 19, 23, 14, 15	45% - RI e 4% - AR <sup>f</sup> 49,8% 54,6%
Lucarevski et al. 2003 <sup>g</sup>	Taubaté-SP	98	< 6anos	987	Creches saudáveis	209	21,1	(18,7-23,8)	6A/6B, 19F, 18C, 23F, 9V, 14, 10A	--
Fonseca et al. 2005 <sup>h</sup>	São Paulo-SP	02 - 03	4 meses-17 anos	98	Falcêmicos em profilaxia >1mes penicilina	13	13,3	(7,0-22,0)	18C, 23F, 6B, NT, 19F, 10A, 23B, 19A, 6A, 33, 18C	21,4% - RI
Cardoso et al. 2006 <sup>i</sup>	Ribeirão Preto-SP	02 - 03	< 18 anos	112	Crianças HIV (+) sem DPI	32	28,6	ND	6A, 6B, 7C, 9V, 11A, 13, 14, 15A, 16F, 18C, 19B, 19F, 23B, 23F, 34, NT	15,9% - RI 9,4% - AR
Laval et al. 2006	Goiânia-GO	00 - 01	< 5 anos	648	Saudáveis Pneumonia Meningite	232	35,8	(32,1-39,6)	14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F, 18C, 19A, 9N, 18A, 9V, 11A, 15B, 19A, 7F, 23A, 12F	19,8%-nasofaringe. 19,2%-DPI <sup>j</sup>
Berezin et al. 2007	São Paulo-SP	97 - 01	< 5 anos	520	Crianças com IRA, sem vacina pneumocócica	181	35,0	--	1, 5, 6A, 14, 9N, 9V, 10A, 11A, 4, 15B, 18C, 19F, 20, 23F	1º período: 16,4% - NF; 17% DPI. 2º período: 42% - NF; 45% DPI.
Reis et al. 2008	Salvador-BA	00 - 01	< 5 anos	50	Saudáveis	33	66,6	(51,2-78,8)	19F, 23F, 18C, 14, 6B, 6A, NT, 34, 23B, 19A, 16F, 22F, 10A, 15B	15%

<sup>a</sup>ND- Não Disponível; <sup>b</sup>CIM- Concentração Inibitória Mínima; <sup>c</sup>IRA-Infecção Respiratória Aguda; <sup>d</sup>NR-Não realizado; <sup>e</sup>RI-Resistência Intermediária; <sup>f</sup>AR-Alta Resistência; <sup>g</sup> coleta em orofaringe;

<sup>h</sup> vacina 23-valente aplicada em 69,4% das crianças; <sup>i</sup>vacina 23-valente aplicada em 81,3% das crianças; <sup>j</sup>DPI- Doença Pneumocócica Invasiva; <sup>k</sup>NF- Nasofaringe.

-- não pesquisado



## Relação entre cepas de nasofaringe e doença invasiva

Existem evidências de que os sorotipos de *S. pneumoniae* encontrados na nasofaringe do portador são a fonte primária dos sorotipos associados com doenças pneumocócicas recentemente adquiridas (Lloyd-Evans et al. 1996, Andrade et al. 2003). O epitélio da mucosa nasofaríngea pode albergar, simultaneamente, diferentes sorotipos. O estado de portador de um determinado sorotipo nem sempre induz a imunidade local ou sistêmica suficiente para evitar a recolonização pelo mesmo sorotipo (Fedson et al. 1999, Graffar et al. 1999). Portanto, múltiplos sorotipos podem coexistir na nasofaringe e nem sempre existe associação entre sorotipos que colonizam as vias respiratórias e os isolados de pessoas com doenças invasivas (Andrade et al. 2004, Bogaert et al. 2004). A capacidade reduzida de produzir anticorpos contra antígenos da cápsula polissacarídica em crianças menores de dois anos e a alta frequência de colonização podem, em parte, explicar a maior suscetibilidade à infecção pneumocócica nessa faixa etária (Graffar et al. 1999).

Atualmente mais de 90 sorotipos estão identificados com base na estrutura da cápsula polissacarídica (Bentley et al. 2006), mas somente cerca de 23 sorotipos produzem a maioria dos casos de doença pneumocócica invasiva (Hausdorff et al. 2000). A cápsula pode ser detectada por reação com anti-soro específico. Entretanto, alguns isolados de pneumococos apresentam resultado negativo para todos os 90 anti-soros tipo específicos, sendo designados como *S. pneumoniae* não tipáveis (SpNT), para os quais há necessidade de se descartar o *Streptococcus viridans* como diagnóstico diferencial (Shayegani et al. 1982, Whatmore et al. 2000, Carvalho et al. 2003, Hanage et al. 2005).

Em estudo recente de portador de *S. pneumoniae* em crianças de Gâmbia, de um total de 2.872 isolados, detectou-se 40 (1,4%) pneumococos não tipáveis, dos quais 31 (77%) apresentavam o gene para cápsula A, específica para o pneumococo. Os autores argumentam que dentre os nove pneumococos sem o gene da cápsula é possível que alguns SpNT possam conter o gene cápsula A, no entanto não estejam expressando a cápsula (Sankareh et al. 2008). A ausência de cápsula torna o pneumococo mais suscetível à transformação genética (Weiser & Kapoor 1999).

Em Goiânia, Brasil, nenhum SpNT foi observado em 222 isolados de *S. pneumoniae* de nasofaringe de crianças, na vigilância conduzida nos anos de 2000 e 2001 (Laval et al. 2006) e, em Fortaleza, somente um dos 269 isolados eram SpNT (Rey et al. 2002a). A percentagem de SpNT encontrada em Portugal e Gâmbia foi também baixa, respectivamente 6% e 2,4% (Sá-Leão et al. 2006, Hill et al. 2006).

Os sorotipos não tipáveis apresentam como característica uma alta contagiosidade e têm sido detectados em casos de conjuntivite (CDC 2002, 2003), ocasionalmente em otites, infecções do trato respiratório e doenças invasivas (Bérton et al. 2005, Buck et al. 2006, Porat et al. 2006). Assim, a frequência de sorotipos SpNT é maior em sítios não estéreis (10%) do que em sítios estéreis (0,5% a 2,2%) (Carvalho et al. 2003). Em uma epidemia de conjuntivite que ocorreu no Brasil nos anos 90, mais de 50% dos *S. pneumoniae* isolados eram SpNT (Medeiros et al. 1998).

O potencial dos isolados pneumocócicos em causar doenças invasivas tem sido associado à expressão capsular (Brueggemann et al. 2003). Os sorotipos 1 e 5 são frequentemente isolados de crianças com doença pneumocócica, mas raramente isolados da nasofaringe de portadores sãos (Di Fabio et al. 2001, Hausdorff et al. 2001, Lagos et al. 2002, Brandileone et al. 2003, Hausdorff et al. 2005). Especula-se que o sorotipo 1 permaneça curto período de tempo colonizando a nasofaringe devido seu grande potencial para invasão (Hausdorff et al. 2005). Esta observação sugere que o pneumococo sorotipo 1 tem uma alta taxa de ataque. Recentemente, uma epidemia de meningite pneumocócica de alta letalidade causada pelo sorotipo 1 foi descrita na África (Leimkugel et al. 2005, Yaro et al. 2006).

No Brasil, o estudo da caracterização genética de 134 isolados de *S. pneumoniae* sorotipo 1, obtidos a partir de 1977, identificou duas linhagens principais desse sorotipo, linhagens A e B. A partir de 2000, houve nítido predomínio da linhagem A, em substituição à linhagem B representada pelo clone Sweden<sup>1</sup>-40, sabidamente não associado à resistência aos antimicrobianos. No entanto, os autores identificaram três cepas resistentes, no conjunto das cepas pertencentes ao Sweden<sup>1</sup>-40 (Chiou et al. 2008).

Os sorotipos 14, 6B, e 23F são frequentes tanto em doença invasiva como em portadores. Os sorotipos 3 e 4 são mais frequentes em adultos, enquanto o sorotipo 14 predomina em crianças, independentemente da doença, sendo o sorotipo mais associado

à resistência antimicrobiana. No Brasil, os sorotipos 6B, 6A e 19F são os mais comuns em nasofaringe (Laval et al. 2006, Berezin et al. 2007).

### **Suscetibilidade antimicrobiana *S. pneumoniae* colonizadores**

Nas últimas décadas, a dispersão de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina tem representado um problema de saúde pública em escala mundial (Appelbaum PC 1992), com implicação direta nos indicadores de morbidade e mortalidade da doença pneumocócica. O aumento da resistência do pneumococo aos antimicrobianos tem sido identificado em isolados invasivos e não invasivos (Lee et al. 2001, Muhlemann et al. 2003, Mato et al. 2005, Cardozo et al. 2006).

O principal mecanismo de resistência do pneumococo às penicilinas é a alteração das transpeptidases existentes na parede celular, as quais apresentam uma menor afinidade para a penicilina. Toda alteração de síntese de proteínas ligadoras de penicilina no pneumococo é mediada cromossomicamente. Essas alterações são decorrentes, da substituição de segmentos de cromossomo por fragmentos provenientes de outras espécies de streptococos, em um processo denominado transformação (Tomaz 2000). Esse processo de transformação resulta em recombinações homólogas interespecíficas, e conseqüentemente em grande variabilidade no grau de sensibilidade do pneumococo aos antimicrobianos, com o aparecimento das linhagens com sensibilidade intermediária (Vilhelmsson et al. 2000, Sogstad et al. 2006).

As três principais estratégias para o controle da resistência antimicrobiana são o desenvolvimento de novos antimicrobianos, a redução do uso inapropriado de antimicrobianos e as vacinas. O desenvolvimento de novos antimicrobianos, ou de versões mais potentes de fármacos já existentes, pode ser útil para o tratamento de infecções resistentes. Entretanto, é importante postergar a utilização de novos fármacos, preservando os antibióticos existentes pelo maior tempo possível para minimizar a possibilidade de seleção de cepas resistentes (Friedman & Whintney 2008). Além disso, o desenvolvimento de novos fármacos demanda tempo, recursos financeiros em larga escala, e a produção desses para doenças infecciosas não tem sido prioridade para indústrias farmacêuticas atualmente (Spellberg et al. 2004). A diminuição da resistência do pneumococo é um dos objetivos da utilização da vacina nos países onde ela foi

introduzida (Kaplan et al. 2004, Pelton et al. 2004, Kyaw et al. 2006). A vacina interrompe a transmissão de isolados resistentes ao bloquear a aquisição dos sorotipos vacinais que são resistentes ao antibiótico. A emergência de resistência antimicrobiana no pneumococo tem ocorrido quase exclusivamente em sorotipos comumente colonizadores de nasofaringe de crianças, sugerindo que a seleção é favorecida pelo longo período de tempo que esses sorotipos são carregados por crianças (Gray et al. 1980). A vacinação, que contabiliza efeitos diretos e indiretos, é uma estratégia que mostra uma relação altamente positiva de custo benefício (WHO 2007).

Os sorotipos 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F, que colonizam a nasofaringe e também causam infecção em crianças, estão associados à resistência aos antibióticos (Klugman & Koornhof 1988, Dagan et al. 2003). Na última década o sorotipo 14 tem sido responsável por um rápido aumento na resistência à penicilina em doenças pneumocócicas invasivas no Brasil (Brandileone et al. 1998, Ko et al. 2000), sendo responsável por 50% dos isolados não suscetíveis à penicilina (SpNP) (Brandileone et al. 2006). Ademais, o sorotipo 14 é o que mais se associa à resistência a eritromicina (Dias & Caniça 2004). Em Goiânia, a prevalência de sorotipos de indivíduos portadores ou com doença invasiva de *S. pneumoniae* não diferiu significativamente quanto ao padrão de resistência à penicilina (Laval et al. 2006). Em alguns países, pneumococos não tipáveis tem sido associado à resistência à penicilina e às múltiplas drogas, tais como eritromicina, clindamicina e sulfametoxazol-trimetoprima (Sá-Leão et al. 2006, Porat et al. 2006).

### **Similaridade genética entre cepas colonizadoras e invasivas**

A relação entre os sorotipos colonizadores e invasivos está bem estabelecida em vários estudos de epidemiologia molecular que verificam similaridade genética entre isolados invasivos e colonizadores (Lloyd-Evans et al. 1996, Robinson et al. 2001, Andrade et al. 2003, Brueggemann et al. 2003). Do ponto de vista da epidemiologia molecular, utiliza-se o termo isolado para qualquer microrganismo, enquanto o termo cepa é utilizado para os microrganismos já caracterizados pelos métodos de tipagem molecular (Sader et al. 1995, Tenover et al. 1995, Pfaller et al. 2001). Assim, de forma geral, um clone de pneumococo é constituído por cepas de *S. pneumoniae* que

apresentem as mesmas características fenotípicas e genéticas (Perez-Trallero et al. 1999). Portanto, são considerados como clones os isolados geneticamente relacionados, indistinguíveis entre si por uma variedade de testes genéticos, ou que sejam semelhantes, a ponto de que se possa presumir como sendo derivados de um parental comum (Tenover et al. 1995).

A rede internacional *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN) foi estabelecida em 1997 com objetivo de padronizar a nomenclatura e a classificação dos clones de pneumococo em todas as regiões. Até o momento, foram descritos 43 clones de *S. pneumoniae*, dos quais 15 com CIM para a penicilina  $\geq 1,0$   $\mu\text{g/ml}$  ([www.sph.emory.edu/PMEN/](http://www.sph.emory.edu/PMEN/)). No entanto, o espectro da doença pneumocócica invasiva é composto por um pequeno número de clones. Nos EUA, por exemplo, menos que dez clones altamente resistentes à penicilina foram identificados como causadores da maioria das infecções pneumocócicas (Corso et al. 1998, Richter et al. 2002). A identificação dos clones internacionais é realizada principalmente pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). A PFGE é uma das várias técnicas de tipagem molecular utilizadas na epidemiologia do *S. pneumoniae*. Característica marcante da PFGE é o seu alto poder discriminatório (McDougal et al. 1995, Moreno et al. 1995, Tenover et al. 1995, Doit et al. 1996), com grande capacidade em identificar isolados de pneumococos não relacionados geneticamente (Hermans et al. 1995, Hall 1998).

Estudos de vigilância molecular do *S. pneumoniae* têm mostrado que cepas resistentes circulando dentro de uma área geográfica pertencem a um pequeno número de clones multi-resistentes (Klugman 2002). O predomínio desses clones difere de acordo com a região geográfica, provavelmente em decorrência das diferenças de fenótipos do pneumococo, e talvez diferenças regionais na utilização dos antimicrobianos (Klugman 2002, Okeke et al. 2005, 2005a). No Brasil, foram detectados seis clones internacionais, todos em crianças e três deles em nasofaringe de crianças que frequentavam creches. Dos três clones resistentes, dois foram obtidos de amostras de nasofaringe. Chama atenção que os clones 1 e 3 foram detectados em amostras de sorotipo 14 geneticamente similares aos sorotipos 23F e 9V, respectivamente. A Tabela 2 apresenta as características desses clones.

A disseminação de resistência a antibióticos ocorre por meio da difusão de clones de bactérias resistentes, entre pacientes colonizados ou infectados, por contato

direto ou por meio de indivíduos saudáveis, como por exemplo, profissionais da saúde. Esse mecanismo, referido como “expansão clonal”, é o principal mecanismo de disseminação do *S. pneumoniae* resistente à penicilina entre hospitais, países e continentes (Munoz et al. 1991). Um exemplo é o clone “Spanish/USA”, representado pelo sorotipo 14, resistente à penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e, muitas vezes, também a macrolídeos e ao sulfametoxazol-trimetoprima. Esse clone foi identificado como agente de colonização e infecção na Europa, África do Sul, EUA e América Latina (Munoz et al. 1991, Klugman et al. 1994, Setchanova & Tomasz 1999). Outro clone bastante disseminado, referido como “French/Spanish”, que normalmente expressa os tipos capsulares 9 ou 14, encontra-se também espalhado por vários países da Europa (Setchanova & Tomasz 1999) e América Latina (McGee et al. 2001). No Brasil, a presença do clone Spain<sup>9V</sup>-3 foi detectada tanto em crianças com doença pneumocócica invasiva (Brandileone et al. 1998), como na nasofaringe de adultos com HIV (Nicoletti et al. 2007). Esse clone pode apresentar alta resistência à penicilina, ser resistente a múltiplas drogas e apresentar alteração fenotípica, sem alteração genotípica, como descrito para os isolados identificados no Brasil (Nicoletti et al. 2007).

No Brasil, a relação genética entre cepas invasivas e de nasofaringe vem sendo estudada recentemente (Andrade et al. 2003, Reis et al. 2008). Estudos mostram que existe grande diversidade no perfil genético das cepas de portador, enquanto observa-se uma homogeneidade entre cepas que causam doença invasiva (Lyoyd-Evans et al. 1996, Robinson et al. 2001, Andrade et al. 2003, Brueggemann et al. 2003, Reis et al. 2008). Os estudos de epidemiologia molecular evidenciam que cepas de sorogrupos diferentes podem ser geneticamente similares e, contrariamente, cepas do mesmo sorogrupo podem diferir geneticamente (Robinson et al. 2001, Brueggemann et al. 2003). A cápsula pode ser mais importante do que o genótipo na capacidade do pneumococo causar doença invasiva (Brueggemann et al. 2003). Clones de pneumococo podem diferir na capacidade de colonizar ou de causar doença invasiva (Robinson et al. 2001). No Brasil e em outros países, tem se verificado ampla variação no perfil genético das cepas suscetíveis à penicilina em contraposição à pequena variabilidade genética entre cepas resistentes à penicilina (Soares et 1993, Tomasz et al. 1998, Wolf et al. 2000). Nos pacientes com doença invasiva, a maioria dos isolados não suscetíveis pertencem a

um pequeno número clonal, sendo o clone Spain<sup>9V</sup>-3 o mais frequente (Brandileone et al. 1998, Ko et al. 2000).

**Tabela 2.** Clones internacionais de *Streptococcus pneumoniae* detectados no Brasil e publicados no site PMEN\*.

Referência	Clone	Sorotipo do clone	CIM-PEN <sup>a</sup>	Sorotipo <sup>b</sup> detectado	Espécime	Período	Nº	Elegibilidade	Idade
Brandileone et al. 1998	Spain <sup>9V</sup> -3	9V	1,5	14	Fluidos estéreis	1993-1996	1.252	Pacientes hospitalizados	RN <sup>c</sup> -88 anos
Nicoletti et al. 2007					Nasofaringe	2000-2001			385
Wolf et al. 2000	Spain <sup>23F</sup> -1	23F	1,0	14	Nasofaringe	1998	435	Pneumonia e Saudáveis: Creches CV <sup>d</sup>	2meses - 5anos
Wolf et al. 2000	Spain <sup>6B</sup> -2	6B	0,5	SR <sup>e</sup>	Nasofaringe	1998	435	Pneumonia e Saudáveis: Creches CV	2meses - 5anos
Sá-Leão et al. 2000a	Colombia <sup>23F</sup> -26	23F	0,064	SR	Nasofaringe	1996-1998	503	Saudáveis em creches	Pré-escolar
Gamboa et al. 2002	Colombia <sup>5</sup> -19	5	0,003	SR	Fluidos estéreis	1993-1999 2000 1988-1989	172	Meningite, Pneumonia, Septicemia, Artrite e Abscesso	< 5 anos
Chiou et al. 2008 <sup>f</sup>	Sweden <sup>1</sup> -40	1	0,012	SR	Fluidos estéreis	1977-2005	134	Pacientes hospitalizados	≤ 10anos ≥ 50anos
Brandileone et al. 1998						1993-1996	8.892		

\* [www.sph.emory.edu/PMEN/](http://www.sph.emory.edu/PMEN/)<sup>a</sup>CIM-PEN – concentração inibitória mínima para penicilina; <sup>b</sup>Sorotipo da mesma linhagem do clone; <sup>c</sup>RN – Recém Nascido; <sup>d</sup>CV- Centro de Vacinação; <sup>e</sup>SR- Sem Relato;<sup>f</sup>Três cepas com CIM entre 0,12 - 0,25µg/mL



### **Epidemiologia molecular do *Streptococcus pneumoniae***

As informações geradas pelos estudos de epidemiologia molecular do pneumococo são importantes, uma vez que permitem conhecer os tipos e subtipos genéticos circulantes, bem como identificar a presença de clones em uma determinada região, em um período de tempo. O conhecimento sobre as características moleculares das cepas circulantes, sua frequência, diversidade e a eventual substituição, são fundamentais para o monitoramento das doenças pneumocócicas (Brandileone et al. 1998, Tomasz et al. 1998, Sá-leão et al. 2000, McGee et al. 2001, Bruggemann et al. 2003).

Uma grande quantidade de estudos, voltados ao desenvolvimento do conhecimento da epidemiologia molecular do pneumococo, foi realizada ao longo dos últimos anos. A Tabela 3 apresenta um resumo dos principais estudos publicados na última década sobre a similaridade genética de cepas de pneumococos colonizadores em crianças. Nessa tabela, observa-se que, aproximadamente, 60% dos trabalhos foram realizados em países desenvolvidos. A maioria desses estudos utilizou a técnica de PFGE para verificar o perfil genético das cepas de pneumococo estudadas. Quase a metade dos estudos (14 em um total de 29) envolveu crianças que frequentam creches, mais de 90% deles utilizaram a técnica de PFGE para avaliar a similaridade genética do pneumococo.

**Tabela 3.** Estudos sobre a similaridade genética de cepas colonizadoras de *Streptococcus pneumoniae* em crianças.

Referência	População		País / Cidade	Período	Nº de isolados estudados	Sorotipos estudados e predominantes	Técnica utilizada	Resultados	Clones
	Elegibilidade	Idade							
Craig et al. 1999	Crianças em contato com caso de meningite	5 meses a 6 anos	Tennessee - USA	1999	46	Sorotipo 14	PFGE <sup>a</sup>	2 padrões de PFGE	
Dejsirilert et al. 1999	Crianças com infecção respiratória aguda	< 5 anos	Tailandia	1992 a 1994	53	6A, 6B, 9V, 14, 15B, 15C, 19F e 23F.	RFEL <sup>b</sup> Box-PCR PBP <sup>c</sup> genotyping	RFEL- 27 tipos distintos	Spain <sup>23F</sup> 9V Spanish/French
deLencastre et al. 1999	Saudáveis em Creches	Pré-escolar	Lisboa-Portugal	1999	66	19, 23, 14 e 6.			Spanish/USA sorotipo23 French/Spain sorotipo14
Wolf et al. 2000	Pneumonia Creches CV	2 meses a 5 anos	Fortaleza-Brasil	1998	205	1, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23 e 33A.	Ribotipagem	75 diferentes genótipos	Spain <sup>23F</sup> -1 e Spain <sup>6B</sup> -2
Sá-Leão et al. 2000	Saudáveis em creches	Pré-escolar	Lisboa-Portugal	1996 a 1998	413	23F, 6A, 6B, 14, 19F, 9Ve 15	PFGE	PFGE – 57 tipos distintos	7 clones (51% dos pneumococos) - foram também detectados em amostras internacionais.

Referência	População		País / Cidade	Período	Nº de isolados estudados	Sorotipos estudados e predominantes	Técnica utilizada	Resultados	Clones
	Elegibilidade	Idade							
Bogaert et al. 2001	Crianças em creches e crianças que não frequentam creches	3 a 36 meses	Amsterdã-Holanda	1999	305	19F, 6B, 6A, 23F e 9V	RFEL	10 linhagens geneticamente diferentes	Não em creches: Taiwan <sup>19F</sup> -14, France <sup>9V</sup> -3, Slovakia <sup>14</sup> -10 e Tennessee <sup>23F</sup> -4. Em creches: France <sup>9V</sup> -3, Slovakia <sup>14</sup> -10 e Tennessee <sup>23F</sup> -4.
Lee et al. 2001 <sup>d</sup>	Crianças em creches ou em ambulatório	< 5 anos	6 países da Ásia	1998 a 1999	67	19 e 23.	PFGE		Spain <sup>23F</sup>
McGee et al. 2001a	Crianças em creches e hospitalizadas	< 5 anos	Pequim – China	1997 a 1998	47	6A, 19F, 23F e 15	BOX-PCR PFGE PBP	22 padrões BOX-PCR 23 perfis de PFGE	Dois novos clones multi-resistentes: sorotipos 23F e 6A.
Samore et al. 2001	Crianças saudáveis que vivem em zona rural	< 8 anos	Duas comunidades rurais de Utah	1998	16		PFGE		Clone “USA cluster 5” 23F Spain/USA sorotipo 9 – French/Spanish
Bogaert et al. 2002	Crianças com infecção aguda do trato respiratório superior	< 5 anos	Hanoi - Vietnã	1997 a 1999	84	23F, 19F, 6B e 14.	RFEL	35 diferentes genótipos	As duas maiores linhagens - 24 isolados sorotipos 23F e 12 isolados sorotipos 14, os isolados são idênticos aos clones internacionais Spain <sup>23F</sup> -1 e Taiwan <sup>19F</sup> -14, respectivamente.

Referência	População		País / Cidade	Período	Nº de isolados estudados	Sorotipos estudados e predominantes	Técnica utilizada	Resultados	Clones
	Elegibilidade	Idade							
Robinson et al. 2002		≤ 5 anos 6 a 17 anos ≥ 18 anos	39 países	1989 a 1999 1982 a 1988	212	6A e 6B	MLST <sup>e</sup>	131 STs <sup>f</sup>	Spain <sup>6B</sup> -2 (ST19)
Sá-Leão et al. 2002	Saudáveis em creches	Pré-escolar	Lisboa-Portugal	1999	37	3, 6, 6A, 6B, 9V, 11 e 14.	PFGE	89% das cepas de NF <sup>g</sup> apresentavam o mesmo sorotipo, perfil de PFGE, <i>lytA</i> hibridação.	
Andrade et al. 2003	Criança com meningite	58 meses 4 meses	Goiânia-Brasil	2000	4	9V e 14	PFGE	1º caso: A, A e A. 2º caso: B e B.	O perfil idêntico do DNA de isolados de nasofaringe e de líquor de dois pacientes, ilustra a ligação entre cepas de portador e cepas de líquor na patogênese da meningite em crianças.
Henriques Normark et al. 2003	Crianças e adultos	1 a 6 anos	Estocolmo – Suécia	1997 a 1998	49	19, 35, 6 e 14.	PFGE MLST	Dispersão do clone 35B.	Clones: 9V, 19F e 23F.
Sandgren et al. 2004	Saudáveis em creches	1 a 6 anos	Estocolmo-Suécia	1997	343	34 sorotipos	PFGE MLST	Sorotipo 14 -9 diferentes tipos de padrão PFGE	Sorotipo 14 apresentou variação em um locus ST124/ST129 <sup>g</sup> . Sorotipo 14 (ST230)-somente em portador e ST307 doença invasiva.

Referência	População		País / Cidade	Período	Nº de isolados estudados	Sorotipos estudados e predominantes	Técnica utilizada	Resultados	Clones
	Elegibilidade	Idade							
Sulikowska et al. 2004	Saudáveis em creches, orfanatos e domicílio	6 meses a 5 anos	Varsóvia-Polônia	2000 a 2001	43	6B, 23F, 19F, 6A	PFGE MLST	PFGE -11 tipos MLST – 10 STs Um novo ST (ST1021)	Poland <sup>6B</sup> -20 (ST315), Spain <sup>23F</sup> -1 (ST81), Poland <sup>23F</sup> -16 (ST272).
Bayraktar et al. 2005	Saudáveis em escolas	7 a 13 anos	Malásia	2003	105		AP-PCR <sup>h</sup> PFGE	Tenover: 25 – Indistiguíveis 33 - diferentes	--
Frazão et al. 2005	Saudáveis em creches	6 meses a 6 anos	Lisboa-Portugal	2001 a 2003			PFGE	Maioria dos sorotipos resistentes à drogas apresentaram diferentes padrões de PFGE.	
Lauderdale et al. 2005	Saudáveis em jardim da infância	4 a 6,5 anos	Taiwan	2002	34	19F, 6B, 6A, 23F, 9V e 3.	PFGE	O perfil PGEF entre as cepas do líquido do caso index e as cepas isoladas de NF dos contatos diferem.	Taiwan <sup>23F</sup> -14 Variante do clone Taiwan <sup>23F</sup> -14
Mato et al. 2005	Saudáveis em creches	4 meses a 7 anos	Lisboa e Oeiras - Portugal	2001 a 2003	1285	6B, 14, 23F, 19F e 19A. SpNT(5%)	PFGE MLST	80 padrões de PFGE	11 padrões de PFGE semelhantes aos padrões de cepas do PMEN <sup>i</sup> .

Referência	População		País / Cidade	Período	Nº de isolados estudados	Sorotipos estudados e predominantes	Técnica utilizada	Resultados	Clones
	Elegibilidade	Idade							
Petrosillo et al. 2002	Saudáveis em creches	< 5 anos	Roma – Itália	1999	16	6, 23, 19, 14, 15 e 7. SpNT (3,5%)	PFGE	6A – PFGE – A a D.	
Pettigrew et al. 2006	Crianças com doença invasiva e saudáveis	< 5 anos	USA	1995 a 2001	342	4, 9V, 6B, 14, 19F, 18C, 23F, 6A, 9A, 9L, 9N, 18B, 19A, 19B, 19C, 23A, e 23B.	MLST	149 diferentes STs. 67 novos STs.	De 50 STs com maior nº de isolados, 11 tinham isolados com expressão capsular diferente. A prevalência da neuraminidaseC esteve associada aos sorotipos isolados de líquor quando comparado aos isolados de portador.
Sá-Leão et al. 2006	Saudáveis em creches	Pré-escolar	Lisboa-Portugal	1997 a 2003	213	SpNT	PFGE MLST	17 clusters PFGE: Um clone (48% isolados) 49 MLST: 8 novos alelos 8 novos STs	A coleção de pneumococos é geneticamente diversa.
Lipsitch et al. 2007	Crianças Navajo e Apache	< 2 anos	USA	1998 a 2000	590	Sorotipos incluídos na VPC- 7V e outros.	MLST	143 STs	ST199 foi o mais frequente

Referência	População		País / Cidade	Período	Nº de isolados estudados	Sorotipos estudados e predominantes	Técnica utilizada	Resultados	Clones
	Elegibilidade	Idade							
Rivera-Olivero et al. 2007	Crianças Warao	Até 72 meses	3 distritos e 9 regiões geográficas Venezuela	2004 a 2005	156	23F, 6A, 15B e 6B.	REEF	65 diferentes genótipos	Maior linhagem – sorotipo 6A
Reis et al. 2008	Saudáveis em favela	< 5 anos 5 a 17 anos >17 anos	Salvador - Brasil	2000 a 2002	94	29 sorotipos: 19F, 6A, 23F SpNT (8%)	BOX-PCR PFGE MLST	14 distintos grupos clonais	A maioria dos genótipos de portador podem não causar doença invasiva.
Sá-Leão et al. 2008	Crianças em creches	14 a 37 meses	Lisboa-Portugal	1998 a 1999	257	19F, 23F, 6B, 14, 10A, 19A, 9V, 11A, 16F, 18F, 15A, 8 e 23B. SpNT (7%)	PFGE	21 clones foram detectados	Clones: Portugal <sup>19F</sup> ST177, Spain <sup>23F</sup> ST81, Norway <sup>NT</sup> ST344 detectados durante todo período. Três variantes Spain <sup>9V</sup> ST156: cepas resistentes à penicilina sorotipos 9 ou 14 e cepas suscetíveis à penicilina do sorotipo 14.
Sánchez-Tatay et al. 2008	Crianças em centros de atenção primária à saúde ou em emergência hospitalar	6 meses a 6 anos	Seville - Espanha	2005 a 2006	635	33 diferente sorotipos: 6A, 14, 19A, 11 e SpNT-6%	PCR MLST	13 clones internacionais foram representados entre as cepas resistentes à penicilina e/ou a eritromicina, distribuídos similarmente entre os sorotipos vacinados e não vacinados.	74 ST identificados 73% desses STs eram idênticos ou relacionados (SLV <sup>j</sup> ou DLV <sup>l</sup> ) com 13 dos 43 clones PMEN. Clone Colombia <sup>23F</sup> - 26(ST338) – sorotipo 6A. Clone Spain <sup>9V</sup> -3(St156) – sorotipo14.

Referência	População		País / Cidade	Período	Nº de isolados estudados	Sorotipos estudados e predominantes	Técnica utilizada	Resultados	Clones
	Elegibilidade	Idade							
Vestrheim et al. 2008	Crianças saudáveis em creches não vacinadas	10 a 69 meses	Noruega	2006	509	30 diferentes sorotipos: 6A, 6B, 19F e 23F. 24 (4,7%) SpNT	MLST	102 STs identificados 31 novos STs 15 novos alelos	105 isolados <sup>d</sup> England <sup>14</sup> -9, Spain <sup>9V</sup> -3 SLV, Portugal <sup>19F</sup> -21, Portugal <sup>19F</sup> -21 SLV, Taiwan <sup>19F</sup> -14, Taiwan <sup>23F</sup> -15, Colombia <sup>23F</sup> -26, Portugal <sup>19F</sup> -21 SLV.

<sup>a</sup> PFGE – Pulsed field gel eletroforesis; <sup>b</sup>RFEL – Restriction fragment end labeling; <sup>c</sup>PBP genotyping – Genetic polymorphism of the penicilin resistance genes; <sup>d</sup>região nasal anterior;

<sup>e</sup>MLST – Multilocus sequence typing; <sup>f</sup>ST – Sequence typing; <sup>g</sup>NF – Nasofaringe; <sup>h</sup>AP-PCR – Arbitrary primed polymerase chain reaction; <sup>i</sup>PMEN – Pneumococcal Molecular Internacional;

<sup>j</sup>SLV – single-locus variants; <sup>k</sup>DLV – double-locus variants.



Na Tabela 3 observa-se que uma grande diversidade genética foi encontrada entre as cepas de pneumococo colonizadoras, e que, principalmente por meio da técnica PFGE identificou-se que o padrão genético do pneumococo de portador em creches é clonal. Em Portugal, foram encontrados 80 padrões de PFGE em crianças saudáveis e que frequentam creches, sendo que 11 deles se assemelhavam aos padrões de cepas de PMEN (Mato et al. 2005). Observa-se ainda, que houve um aumento da presença de clones em crianças que frequentam creches, uma vez que Sá-Leão et al. (2008) detectaram 21 clones em crianças. O padrão genético do pneumococo em portador encontrado em Portugal, onde concentra a maioria dos estudos em creches, foi semelhante na Europa e alguns países do Oriente (Dejsirilert et al. 1999, Sá-Leão et al. 2000, Bogaert et al. 2001, Lee et al. 2001, McGee et al. 2001a, Sá-Leão et al. 2002, Sandgren et al. 2004, Sulikowska et al. 2004, Frazão et al. 2005, Mato et al. 2005, Petrosillo et al. 2002, Sá-Leão et al. 2006, Sá-Leão et al. 2008, Vestrheim et al. 2008).

Nos EUA não foi encontrado estudo que tenha analisado o perfil genético do pneumococo em portador que frequenta creches e apenas um estudo utilizou a técnica PFGE, que detectou dois padrões de PFGE do sorotipo 14 (Craig et al. 1999). Da mesma forma, na América Latina, até o momento, nenhum estudo fez essa análise. No Brasil, Andrade et al. (2003) utilizou a PFGE para ilustrar a relação genética entre cepas de portador e cepas de líquido na patogênese da meningite em crianças. Em Salvador, estudo conduzido com crianças saudáveis, que vivem em favela, foi detectado 14 distintos grupos clonais (Reis et al. 2008).

Muitos clones detectados, relacionados à resistência à penicilina e a outras drogas, pertencem aos sorotipos pediátricos e foram encontrados em portadores saudáveis que frequentam creches e crianças com doenças invasivas. Tal fato salienta a importância do papel das crianças em creches na epidemiologia da disseminação da resistência do pneumococo aos antimicrobianos.

Identificar se as diferenças no potencial invasivo se relacionam ao sorotipo ou a propriedades específicas do clone de cepas de pneumococo é uma das preocupações dos estudos de epidemiologia molecular do *S. pneumoniae*.

As propriedades associadas com um tipo clonal em particular, em adição ao sorotipo capsular, podem ser importantes para determinar o potencial para doença. Por exemplo, observou-se que isolados do sorotipo 14 incluíram clones que foram

encontrados apenas entre portadores (p.ex, ST230), bem como clones exclusivamente causadores de doença invasiva (p.ex, ST307), o que sugere que esses clones têm diferente potencial para doença. Ademais, observou-se que a variação no sorotipo dentro de um ST é resultado de um evento de recombinação e, em dois exemplos, encontrou-se evidência de uma troca de sorotipos entre os isolados 19F e 9V com o ST162 e o ST156. Observou-se também que o ST162 foi o que mais causou doença invasiva, porém um isolado foi encontrado colonizando a nasofaringe. O ST156 foi encontrado somente entre os portadores em ambos os sorotipos capsulares (Sandgren et al. 2004).

### **Fatores de risco para o portador resistente**

O uso de antibióticos, de forma apropriada ou inapropriada, contribui para selecionar a resistência aos antibióticos, tanto em nível coletivo como individual. A dose e a duração da terapia também influenciam a resistência (Schrag et al. 2001). A idade é um fator de risco adicional para a resistência, sendo que vários autores têm documentado a idade inferior a 24 meses como fator de risco para portador resistente à penicilina (Gray et al. 1980, Granat et al. 2007, Hill et al. 2008). A prescrição de antibióticos *per capita* é maior para crianças do que para pessoas de mais idade, e vários estudos mostram que no mundo desenvolvido, a permanência em creches é a principal força de amplificação da resistência (Klugman et al. 2004, Vanderkooi et al. 2005). Em Israel, um estudo prospectivo utilizando testes moleculares mostrou que *S. pneumoniae* resistentes, isolados de crianças que não frequentam creches, foram adquiridos de seus irmãos mais velhos, frequentadores de creches (Givon-Lavi et al. 1999).

Em creches, o desenvolvimento e dispersão de organismos resistentes devem-se à presença de grande número de crianças, contato próximo e frequente entre as mesmas e amplo uso de antimicrobianos (Greenberg et al. 2008). De forma geral, o tratamento prévio com antibiótico aumenta a probabilidade de ocorrência de futuras infecções por patógenos resistentes (Klugman 2007). Crianças que frequentam creches são mais propensas a apresentarem otite média aguda (OMA), e conseqüentemente são submetidas a vários tratamentos antimicrobianos e albergam uma maior quantidade de

pneumococos resistentes às múltiplas drogas, quando comparadas com crianças saudáveis (van Kempen et al. 2004).

A nasofaringe exerce um papel importante de reservatório de clones resistentes às drogas e o critério para tal proposição é o enriquecimento da microbiota nasofaringeana por clones epidêmicos e a alta frequência de portador por um longo período de tempo. Para dar suporte a tais considerações, de Lencastre & Tomasz (2002) apresentaram dados comparativos de três períodos de vigilância em Lisboa. Oito clones amplamente disseminados tiveram alta frequência na maioria das creches, durante cada um dos períodos. A similaridade dos tipos clonais de pneumococo resistente à droga entre isolados causadores de doença e os que estão colonizando crianças em creches, não oferece por si só uma resposta inequívoca a essa questão. Entretanto essa similaridade representa uma forte evidência de que a direção de movimento desses clones se dá a partir do reservatório ecológico (nasofaringe) para os locais de doenças. (de Lencastre & Tomasz 2002).

Estudos de vigilância de isolados da nasofaringe de crianças com infecção respiratória têm mostrado prevalência de pneumococos não suscetíveis à penicilina, variando de 20% a 28% (Muhlemann 2003). Evidências *in vitro* indicam que o *S. pneumoniae* vem aumentando a resistência a agentes antimicrobianos (Marchese & Schito 2007). No Brasil, estudos de colonização nasofaríngea são ainda escassos, com prevalências de pneumococo resistentes à penicilina de até 50% em crianças que frequentam creches (Rossi et al. 2001, Rey et al. 2002). Alta resistência do pneumococo à penicilina e sulfametoxazol-trimetoprima vem sendo observada tanto em portador como em doença invasiva (Rey et al. 2002a, Brandileone et al. 2005), bem como resistência à eritromicina (Rey et al. 2002). A resistência do pneumococo a macrolídeos está aumentando em todas as regiões (Reinert et al. 2005). Embora a resistência a eritromicina em isolados invasivos seja ainda baixa no Brasil, um aumento gradual na resistência tem sido documentado desde 1990 (Mendonça-Souza et al. 2004, Brandileone et al. 2006).

O uso de uma vacina pneumocócica conjugada, imunogênica para crianças a partir dos dois meses de vida, tem sido considerada a estratégia principal para o controle das infecções pneumocócicas (Eskola & Anttila 1999). Em 2000, a vacina anti-pneumocócica conjugada à proteína foi licenciada para uso nos Estados Unidos

(FDA 2000). A vacina 7-valente (VPC7) contém 2 µg de cada sacarídeo dos sorotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F e 4 µg do 6B acoplado à proteína carreadora CRM197 (um mutante não tóxico da toxina diftérica). Essa vacina está distribuída em mais de 70 países, principalmente nos países industrializados e atualmente, faz parte do calendário oficial de imunização de 16 países: México, Holanda, França, Grécia, Noruega, Suíça, Alemanha, Inglaterra, Kuwait, Bélgica, Qatar, Luxemburgo, Austrália, Estados Unidos, Canadá e República Tcheca. O México foi o primeiro país em desenvolvimento a incluir a VPC7 no programa de imunização (Wyth 2006).

No Brasil, a VPC7 foi liberada em 2001 para uso em crianças até cinco anos de idade. No entanto, ainda não consta do calendário de imunizações do Ministério da Saúde por motivos do alto custo da vacina. Portanto, assim como em outros países da América Latina, a vacina é oferecida nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE), nas seguintes situações especiais: crianças menores de dois anos imunocompetentes, com doença pulmonar ou cardiovascular crônica, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, diabetes melito, cirrose hepática, fístula liquórica, asplenia congênita ou adquirida, hemoglobinopatia, imunodeficiência congênita ou adquirida, crianças HIV soro positiva assintomáticas e com AIDS e crianças menores de um ano de idade nascidas com menos de 35 semanas de gestação e submetidas a assistência respiratória (MS 2006).

Nos países onde a VPC7 foi introduzida, foi descrito uma diminuição expressiva da incidência de doenças pneumocócicas invasivas (DPI) em crianças e em adultos, bem como uma redução de isolados invasivos resistentes à penicilina (Black et al. 2001, Whitney et al. 2003, Termine et al. 2004, Dias & Caniça 2007). A imunização tem significativo impacto na prevalência de portador de *S. pneumoniae* acarretando diminuição dos sorotipos vacinais, no entanto alguns estudos têm documentado uma substituição por sorotipos não vacinais (Ghaffar et al. 2004, Pelton et al. 2004, Frazão et al. 2005, Huang et al. 2005, Hanage et al. 2007). Desconhecem-se os efeitos da vacina, em longo prazo, e a substituição por sorotipos não vacinais em nasofaringe de indivíduos assintomáticos tem sido acompanhada por um aumento significativo na incidência de DPI por sorotipos não vacinais (Hennessy et al. 2005, Huang et al. 2005, Revai et al. 2006). Vigilância domiciliar mostrou que crianças mais velhas e os adultos,

que vivem com crianças mais jovens, podem servir como reservatório de sorotipos substitutivos (Talarico et al. 2008).

Nos Estados Unidos, estudos de vigilância mostram aumento de doença pneumocócica invasiva causada por sorotipos não vacinais, especialmente por 19A, 7F, 6A, 22F, 15B/C e 3 (Katherine et al. 2008). O sorotipo 19A, que é resistente à penicilina, foi o principal causador de doença pneumocócica invasiva pelos sorotipos substitutivos (Pai et al. 2005). Nesse e em outros países, observou-se um aumento de mais de 300% na incidência de doença invasiva pelo sorotipo 19A (Moore et al. 2008). O clone ST199 (*Multilocus Sequence Typing*) é o mais frequente entre os isolados invasivos do sorotipo 19A. No entanto, o ST 320 resistente às múltiplas drogas, não identificado previamente nesse país, tem se tornado uma causa importante de doença (Pelton et al. 2007). Esses autores advertem que estudos focados exclusivamente nas doenças invasivas seriam insuficientes para observar mudanças na ecologia da nasofaringe e falhas em distinguir entre as cepas colonizadoras, com baixo potencial de causar doenças invasivas, daquelas com alta invasibilidade. Em crianças indígenas americanas (Navajo e Apache), estudo de portador conduzido de 1998 a 2008, mostrou aumento do portador e de DPI devido aos sorotipos não vacinais, sem aumentar a invasibilidade entre os sorotipos (Scott et al. 2008).

Em Portugal, observou-se a emergência de uma linhagem do sorotipo 1 em crianças em creches. A prevalência de cepas do sorotipo 1, em relação a todos os pneumococos, aumentou de 0% em 2001 para 3,1% em 2006. O aumento da prevalência do sorotipo 1 foi acompanhada do aumento da utilização da VPC7, que foi de 12% em 2002 para 64% em 2006. Considerando-se que o sorotipo 1 foi associado a meningites fatais e pneumonias complicadas e, uma vez que esse sorotipo não está incluso na VPC7, a expansão e evolução dessa cepa entre os portadores saudáveis se torna importante, e isto deverá ser monitorado nesse grupo de crianças, que sabidamente, é o maior reservatório de pneumococos (Nunes et al. 2008).

As pneumonias pneumocócicas são a complicação mais frequente pós-internação por infecções respiratórias virais, especialmente por vírus influenza A. Ensaio clínico duplo cego e randomizado mostraram que a vacina conjugada 9-valente (sorotipos da VPC7, mais os sorotipos 1 e 5) é eficaz na redução da morbidade associada à influenza. Crianças que receberam a vacina e desenvolveram influenza,

laboratorialmente confirmada, apresentaram um risco 39% menor de serem hospitalizadas por pneumonia, quando comparadas com crianças que não receberam a vacina (Madhi & Klugman 2004).

O impacto da VPC7 na transmissão da resistência antimicrobiana do *S. pneumoniae* é um aspecto importante a ser considerado no planejamento da introdução dessa vacina na rotina de imunização dos países. Por exemplo, no Alaska, em cinco anos de vacinação, não houve diminuição na taxa de portador, no entanto houve mudança na distribuição dos sorotipos vacinais e não vacinais. Observou-se redução nos tipos vacinais não suscetíveis, mas com aumento dos tipos não vacinais e não suscetíveis (Park et al. 2008). Na Espanha, houve um aumento na taxa de DPI por sorotipos não vacinais e uma redução na resistência antimicrobiana (Muñoz-Almagro et al. 2008). Portanto, determinar o quanto a VPC7 pode influenciar a incidência DPI ao longo do tempo, e o quanto a tendência da doença está ou não relacionada à vacina, é uma tarefa difícil. Em todas as regiões, embora tenham ocorrido mudanças no padrão da doença, a vacina não foi, obrigatoriamente, responsável por tais mudanças, uma vez que a incidência de doença pneumocócica pode variar de local para local, de um ano para outro e a distribuição das cepas pode diferir entre comunidades. Adicionalmente, mudanças no modo de operar os programas de vigilância, ou na forma de medir a doença, como por exemplo, o uso de hemocultura para avaliar bacteremia pneumocócica, pode afetar a estimativa da incidência da doença (Moore & Whitney 2008).

No Brasil, uma vigilância de *S. pneumoniae* invasivo, conduzida no período de 1993 a 2004 mostrou que a prevalência de resistência à penicilina aumentou de 10,2% para 27,9% à custa do aumento da alta resistência (Brandileone et al. 2006). Houve um aumento significativo do número de isolados pertencentes aos sorotipos incluídos na VPC7, em pacientes com idade inferior a cinco anos e um aumento, principalmente, da frequência do sorotipo 14. Os resultados provenientes desses 12 anos de vigilância enfatizam a necessidade dessa vacina como importante ferramenta para reduzir a disseminação dos sorotipos vacinais associados à resistência antimicrobiana (Brandileone et al. 2006).

Em Goiânia, a cobertura potencial da VPC7 para os isolados de portador (52,2%) e isolados invasivos (62,4%) não diferiu significativamente ( $p=0,06$ ), bem

como não houve diferença significativa na cobertura para os isolados não suscetíveis à penicilina, para os isolados de portador SpNP (34,5%) e isolados invasivos SpNP (28,2%) (Laval et al. 2006). No Estado de São Paulo, estudos mostram que vacinas que incluam os sorotipos 1 e 5, poderiam prevenir mais de 90% dos casos de doenças pneumocócicas invasivas e, a vacina VPC7 poderia prevenir a maioria (66%) das doenças pneumocócicas invasivas (Berezin et al. 2007).

As vacinas 10-valente e 13-valente estão em desenvolvimento. A vacina 10-valente, prevista para ser licenciada em 2008, contém a proteína D de *Haemophilus influenzae* como proteína carreadora e os sorotipos da VPC7 mais os sorotipos 1, 5 e 7F. A vacina 13-valente, que contém a mesma proteína carreadora da VPC7 e os sorotipos 3, 6A, e 19A em adição aos sorotipos da VPC10, tem previsão para se tornar disponível antes de 2010. Adicionalmente, mais de 20 outras vacinas conjugadas estão em estágios iniciais de desenvolvimento (WHO 2007).

### 3. JUSTIFICATIVA

*Streptococcus pneumoniae* é uma importante causa de morbidade e mortalidade tanto em crianças como em idosos (Dagan et al. 2004). A colonização da nasofaringe por pneumococo é uma pré-condição para o desenvolvimento da doença, sendo essa condição a causa da transmissão do pneumococo de pessoa para pessoa. Aglomerações facilitam essa transmissão de forma direta, pelo aumento da frequência de contatos e, indiretamente, pelo aumento da prevalência de outras infecções respiratórias (Dunais et al. 2003, Bogaert et al. 2004).

A incorporação da vacina pneumocócica conjugada 7-valente (VPC7) nos programas nacionais de vacinação em alguns países tem reduzido a morbidade causada por pneumococo, incluindo infecções provocadas por cepas resistentes, tanto em crianças vacinadas como em adultos, por meio do efeito de rebanho (Whitney et al 2003, Dias & Caniça 2007). Estudos mostram também que a VPC7 reduz a colonização da nasofaringe por sorotipos vacinais, mas, por outro lado, pode levar a um aumento de sorotipos não vacinais (Frazão et al. 2005, Huang et al. 2005). A substituição com sorotipos não vacinais em portadores de pneumococo tem sido acompanhada por um aumento significativo na incidência de doença pneumocócica invasiva provocada pelos sorotipos não vacinais (Hennessy et al 2005, Huang et al 2005, Revai et al 2006).

Portanto, a vigilância da colonização por isolados de pneumococo permanece como uma necessidade para identificação de mudanças rápidas nos sorotipos e do impacto da introdução da VPC sobre a colonização por pneumococo em países como o Brasil, onde a vacinação está sendo considerada para inclusão no Programa Nacional de Imunização. Antecipando a introdução da VPC no Brasil, pesquisadores do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) têm se dedicado a várias investigações sobre a distribuição de sorotipos, suscetibilidade e padrão molecular de isolados de pneumococo causadores de doença invasiva no Brasil (Laval et al 2006, Andrade et al 2003, Andrade et al 2004, Brandileone et al 2003, 2005, 2006). Mais recentemente, estudos em portador foram conduzidos para monitorar a colonização por pneumococos não suscetíveis. Por exemplo, foi verificado que os sorotipos de portador não diferem significativamente dos sorotipos de isolados invasivos de *S. pneumoniae*, assim como o



padrão de resistência e a cobertura potencial pela VPC7 (Laval et al 2006). O resultado da vigilância de base populacional sobre *S. pneumoniae* e *H. influenzae* na infância em Goiânia detectou que a frequência a creches é o maior fator de risco para pneumonia em crianças menores de cinco anos (Andrade et al 2004, 2004a). Está bem documentado que creches constituem reservatórios de *S. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos, onde as crianças estão expostas a crescente risco de colonização por pneumococo (de Lancastre & Tomaz 2002). No Brasil, país com a maior população de crianças da América Latina, pouca atenção tem sido dedicada à colonização por pneumococo (Rey et al 2002, Laval et al 2006, Berezin et al, 2007). Até esse momento, não há estudo investigando os fatores associados ao *S. pneumoniae* não suscetível (SpNP) em creches.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Identificar fatores associados à colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae* não suscetíveis à penicilina em crianças que frequentam creches no Município de Goiânia e caracterizar geneticamente as cepas não suscetíveis.

### Objetivos específicos

- Determinar a cobertura das vacinas conjugadas pneumocócicas 7, 10 e 13 valente em relação aos sorotipos colonizadores.
- Avaliar o relacionamento genético entre cepas de pneumococos, do sorotipo 14 e pneumococos não tipáveis.
- Comparar a similaridade genética entre cepas colonizadoras e cepas invasivas de vigilância populacional conduzida atualmente em Goiânia.
- Identificar a presença de cepas colonizadoras relacionadas geneticamente aos clones internacionais de *S. pneumoniae*.

## 5. METODOLOGIA

### População e área de estudo

A investigação foi conduzida entre agosto e dezembro de 2005 em Goiânia, capital do Estado de Goiás, situada na região central do Brasil. Goiânia conta com 1.201.007 habitantes (MS, DATASUS 2005), ocupa uma área de 739.492 km<sup>2</sup> e vem apresentando acelerado ritmo de crescimento ao longo dos últimos dez anos (IBGE 2002). Uma vigilância de corte transversal de portadores de *Streptococcus pneumoniae* não suscetíveis (SpNP) em nasofaringe foi conduzida com crianças de dois a cinquenta e nove meses de idade, atendidas em 62 dos 70 Centros Municipais de Educação Infantil (CMEIs) do município. Os oito CMEIs não incluídos estavam em reforma na ocasião do estudo. Crianças foram consideradas não elegíveis se tivessem tomado antibiótico nos últimos sete dias e, ou, apresentassem alguma doença que contra indicasse a coleta de *swab* em nasofaringe. O protocolo do estudo foi submetido ao Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG) e ao Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP), atendendo à resolução 196/96 do MS (Anexo 1). O projeto está protocolado no Comitê de Ética do HC/UFG sob o n.º. 054/2005. O consentimento livre e esclarecido, por escrito, foi obtido dos pais ou responsáveis pelas crianças.

### Coleta de dados

Informações sobre as características sócio-demográficas da família e potenciais fatores de risco para SpNP foram obtidas por meio de entrevistas com os pais ou responsáveis pela criança, após obtenção do consentimento livre e esclarecido e antes da coleta do *swab*. Foram obtidas informações sobre idade da criança, gênero, tamanho da família, número de irmãos, além de aspectos relacionados à saúde como: ocorrência de febre, uso de antibiótico nos últimos 30 dias, hospitalização por alguma razão nos últimos três meses, presença de pneumonia no mês anterior e número de episódios de otite média aguda (OMA) nos últimos 12 meses. As entrevistas foram realizadas utilizando um formulário padronizado (Anexo 2). Os pesquisadores foram previamente treinados para condução da entrevista e aplicação do questionário. O trabalho de campo

foi conduzido utilizando manuais de preenchimento das fichas, bem como de codificação das variáveis para serem posteriormente digitalizadas.

### **Amostragem e tamanho da amostra**

O total de crianças que frequentam os CMEIs do município compuseram a população alvo do estudo. Cada CMEI forneceu a lista com a relação nominal. A seleção foi realizada por amostragem consecutiva, ponderada pelo tamanho da creche, até se alcançar o número amostrado para aquela creche. Com base em estudo anterior (Laval et al. 2006), estimou-se que, aproximadamente, 30% das crianças poderiam ser portadoras de *S. pneumoniae*, e 20% desses portadores (6% dos participantes) poderiam ter cepas de *S. pneumoniae* com diminuição da suscetibilidade à penicilina. Assim, estimou-se que uma amostra com 1100 crianças seria suficiente para estimar o risco de portador de *Streptococcus pneumoniae* não suscetível à penicilina com intervalo de 95% de confiança (efeito do desenho = 1,5).

### **Coleta de swabs de nasofaringe**

Após as entrevistas, espécimes de nasofaringe foram coletados. Os swabs foram coletados de acordo com técnica de introdução pernasal, seguindo os critérios estabelecidos pela OMS (WHO 1994), que consiste na introdução de *transwab* calcium alginate, 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. Um espécime de nasofaringe foi coletado por criança. O material coletado foi acondicionado em meio modificado de Stuart para transporte (*Transwab*<sup>TM</sup>, Medical Wire & Equipment, Whiltshire, United Kingdom) e encaminhado, em até duas horas da coleta, ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, onde as amostras foram processadas imediatamente. Os procedimentos técnicos para obtenção e transporte do swab e o armazenamento dos isolados de pneumococos seguiram as recomendações da OMS para detecção de portador de *S. pneumoniae* de nasofaringe (O'Brien & Nohynek 2003).

## Isolamento e Identificação

Os procedimentos laboratoriais para isolamento e identificação foram realizados em acordo com as técnicas recomendadas pela OMS (WHO 1994). O isolamento foi realizado pela semeadura das amostras em ágar sangue Columbia Blood Agar (Difco, Detroit, Mich.) suplementado com 5% de sangue de carneiro e 5 µg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.). As placas foram incubadas em condições de microaerofilia a temperatura de 35°C por 24 horas. A identificação do *S. pneumoniae* foi baseada em metodologia padronizada que inclui a morfologia colonial, coloração de Gram, sensibilidade à optoquina (disco com 5 µg/mL - Cecon, São Paulo, Brasil) e lise pelos sais biliares (Facklam & Wahington 1991). Todos os isolados sensíveis a optoquina (halo  $\geq$  14 mm) foram identificados como sendo *Streptococcus pneumoniae* e confirmados pela sorotipagem pelo método de Quellung. Os isolados ainda foram repicados em caldo de TSB (tripticase soy broth) suplementado com 20% de glicerol e estocados a -80°C para provas adicionais.

## Sorotipagem

A sorotipagem foi realizada no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-Brasil por meio da reação de Quellung com aglutinação de látex, com anti-soros padrões obtidos junto ao *Statens Seruminstitut*, Copenhague-Dinamarca (Sorensen 1993). Isolados não tipáveis foram subcultivados duas vezes em ágar sangue, antes de uma nova tipagem. A sorotipagem foi realizada em todos os isolados resistentes à penicilina (PEN) e em amostra de isolados suscetíveis à PEN pareada por SpNS e creche. Para avaliar a similaridade genética entre os isolados de portador (sorotipo 14 e PnNT) e isolados invasivos (sorotipo 14) obtidos de crianças de Goiânia utilizou-se amostras de isolados invasivos de um estudo maior de vigilância populacional que vem sendo conduzido desde 2007.

### **Ensaio *Multibead***

Os isolados não sorotipáveis, e uma amostra de vinte e seis isolados do sorotipo 14 não susceptíveis, foram retestados pela técnica de imunensaio para polissacarídeos capsulares usando anticorpos monoclonais específicos (mAbs) para os tipos capsulares e dois conjuntos de látex (Yu et al. 2008). O conjunto 1 continha polissacarídeos (PSs) conjugados pertencentes aos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 11A $\beta$ , 14, 18C, 19A, 19F, e 23F. O conjunto 2 continha PSs conjugados pertencentes aos sorotipos 2, 6A, 8, 10A, 11A $\alpha$ , 12F, 15B, 17F, 20, 22F, e 33F. Cada conjunto foi incubado com um lisado bacteriano e uma mistura apropriada de anticorpos monoclonais. O lisado bacteriano foi diluído 5 ou 10 vezes. Após a incubação, a mistura resultante foi lavada com PBS contendo 0.1% Tween 20 e misturada com imunoglobulina anti-camundongo conjugada com fluoresceína. Após 30 minutos de incubação, o produto foi lavado e analisado quanto a sua fluorescência, em citômetro de fluxo (FACSArray, Becton Dickinson, San Jose CA). Se uma cepa de pneumococo expressa o sorotipo 14, seu lisado inibe a fluorescência das partículas do látex conjugadas com o sorotipo 14 PS, mas não inibe outras partículas do látex.

### **Teste de suscetibilidade**

**Difusão em disco** - Todos os *S. pneumoniae* identificados foram submetidos ao teste de difusão em disco conforme preconizado pelo CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2007). Um inóculo padrão de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml (0,5 da concentração do tubo 1 da Escala de Mac Farland) foi obtido após subcultivos bacterianos em ágar sangue com menos de 24 horas de incubação em microaerofilia a 35°C. Placas de ágar Muller-Hinton, suplementados com 5% de sangue de carneiro, foram semeadas com o auxílio de *Swab* esterilizado. Sobre as placas já inoculadas foram depositados os discos de antimicrobianos a seguir: eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprima, clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina, oxacilina, rifampicina, vancomicina e levofloxacina (OXOID, Basingstoke, Inglaterra). O controle de qualidade foi realizado com cepas ATCC de *S. pneumoniae* 49619. A leitura e identificação dos halos de inibição foram realizadas segundo os critérios do CLSI (CLSI 2007).

**Etest<sup>®</sup>** - Os isolados de *S. pneumoniae* que mostraram redução da sensibilidade à oxacilina (halo  $\leq$  19 mm) pelo método de difusão em disco foram submetidos à técnica do Etest<sup>®</sup>, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em relação à penicilina. Os *S. pneumoniae* foram cultivados em ágar sangue e incubados em microaerofilia por menos de 24 horas a 35°C. Após crescimento inicial, um inóculo foi preparado em caldo Muller-Hinton (Difco, Detroit, Mich) para obtenção de uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml e, inoculados em ágar Muller-Hinton enriquecido com 5% de sangue de carneiro. Tiras de Etest<sup>®</sup> (contendo concentrações seriadas de penicilina) foram depositadas sobre as placas já inoculadas e incubadas a 35°C por 24 horas. A leitura da CIM foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e a interpretação segundo documento do CLSI (CLSI 2007).

#### **Análise do DNA cromossômico**

Toda a etapa de tipagem molecular foi realizada no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), para *S. pneumoniae* resistentes à penicilina (somente sorotipo 14 e NTs), pela técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE), após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *Sma*I. Esta técnica é uma variação da eletroforese convencional, onde a corrente elétrica varia alternadamente de direção e o uso de enzimas de restrição com sítios de reconhecimento longos permite a digestão do cromossomo em fragmentos maiores.

O isolado teste foi inoculado em ágar sangue e incubado em microaerofilia por 14-16 horas a 35°C. Após a incubação, duas a quatro colônias do isolado foram repicadas em seis mL de caldo BHI (Brain heart infusion – DIFCO. Detroit, Mich.) enriquecido com 1% de soro de cavalo e incubadas por cinco a seis horas a 35°C. A concentração da suspensão celular foi ajustada com solução salina até atingir uma leitura de turbidez de 0,7 a 0,9. A suspensão de células ajustada foi centrifugada a 4000 x g por 15 minutos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. O sedimento foi resuspenso em 1 mL de tampão PIV (Tris 10 mM pH 8,0 NaCl 1 M), transferido para um tubo de microcentrífuga e novamente centrifugado a 12000 x g por 5 minutos. Após o sobrenadante ser cuidadosamente desprezado, o sedimento foi resuspenso em 200  $\mu$ L de tampão PIV e ajustado com o mesmo tampão pelo cálculo da OD<sub>620nm</sub>. Uma alíquota

de 120  $\mu$ L da suspensão celular ajustada foi homogeneizada com 120  $\mu$ L de gel de agarose LPM 1,5% (*Low Melting Point*, Invitrogen) para formação de pequenos blocos de gel (*plugs*) contendo DNA cromossômico. Os blocos de gel de cada isolado de *S. pneumoniae* foram incubados em 1 mL de solução ES (EDTA pH 9,0 N-laurilsarcosina) acrescida de 1 mg/mL de Proteinase K por um período mínimo de 12 horas a 50°C. A seguir, os blocos de gel foram lavados várias vezes em solução tampão Tris-EDTA (Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Para cada isolado de *S. pneumoniae*, um plug foi digerido com 2  $\mu$ l da enzima *Sma*I (Invitrogen n°. 15228-018, 10U/  $\mu$ l) em 45  $\mu$ l do tampão de restrição 1x, com incubação a 25°C por quatro a cinco horas. Os fragmentos de restrição resultantes foram colocados em gel de agarose a 1% e a eletroforese realizada no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) com corrente alternando de 5 a 35 segundos a 6 V/cm e temperatura de 11°C durante 22 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio (1,5  $\mu$ g/mL) por vinte minutos, descorados em água bidestilada por mais 45 minutos, e fotografados sob luz ultravioleta com filme FUJI FTI-500. As fotos foram digitalizadas e salvas como arquivo TIF para análise posterior.

Foi utilizado como padrão de peso molecular, o Lambda DNA ladder (New England Biolabs, EUA) na primeira e última coluna de cada gel. Além do peso molecular, foram incluídas três cópias da cepa de referência *S. pneumoniae* R6, posicionadas a cada cinco ou seis amostras, em todos os géis de PFGE. A amostra R6 foi gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup>. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal (número de acesso GenBank NC003098). Cepas invasivas de doença pneumocócica isoladas durante os anos de 2007 e 2008 do sangue de crianças menores de cinco anos, residentes no município de Goiânia (ST283/08, ST551/07, ST145/08, ST890/07, ST555/07 e ST147/08), foram utilizadas para finalidades de comparação da similaridade genética com as cepas colonizadoras. Estas cepas invasivas integram a rede de vigilância SIREVA-II, motivo pelo qual a sorotipagem e testes de suscetibilidade das mesmas foram realizados no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Também foram incluídas na análise 23 amostras de *S. pneumoniae* representativas de clones internacionais, reconhecidos pelo *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (McGee et al. 2001), que estão listados na Tabela 4. Todos os clones internacionais foram gentilmente cedidos pela Dra. Maria Cristina Brandileone, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. A análise dos perfis migratórios dos fragmentos de



restrição (bandas) produzidos após eletroforese foi realizada visualmente utilizando os critérios sistematizados por Tenover et al. (1995). Estes critérios nortearam a análise de parentesco entre as cepas.

Os géis para construção dos dendrogramas foram incluídos e processados pelo programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) como imagens preto e branco invertidas de 8 bits. Para cada imagem, foi realizada análise espectral para determinar o tamanho do disco a ser utilizado na extração do plano de fundo da imagem, pela técnica de rolamento de disco.

A cepa de referência *S. pneumoniae* R6, após digestão com a enzima *Sma*I, produz 15 bandas visivelmente definidas, distribuídas entre 340 kb e 16 kb. A cepa *S. pneumoniae* R6 é considerada padrão internacional de referência para normalização dos fragmentos cromossômicos de amostras de *S. pneumoniae* submetidas à PFGE. O processo de normalização é etapa essencial e obrigatória para corrigir as distorções intra e inter géis que podem ocorrer na técnica de PFGE. Bandas de amostras clínicas situadas acima da maior banda da R6 (340 kb) não são incluídas para análise, pois estas bandas não serão normalizadas. Da mesma maneira, bandas abaixo de 16 kb são excluídas da análise pela menor resolução destas bandas de baixo peso molecular e impossibilidade de normalização das mesmas (Carricho et al. 2005).

**Tabela 4.** Clones internacionais de *Streptococcus pneumoniae* utilizados para avaliar a similaridade genética entre cepas colonizadoras e invasivas circulantes no município de Goiânia, 2005.

Nº do clone	Clone	Referência	Sorotipo	CIM-PEN <sup>a</sup>
2	Spain <sup>6B</sup> -2	ATCC 700670	6B	0,5
3	Spain <sup>9V</sup> -3	ATCC 700671	9V	1,5
4	Tennessee <sup>23F</sup> -4	ATCC 51916	23F	0,125
5	Spain <sup>14</sup> -5	ATCC 700902	14	1,5
6	Hungary <sup>19A</sup> -6	ATCC 700673	19A	1
7	S.Africa <sup>19A</sup> -7	ATCC 700674	19A	0,19
8	S.Africa <sup>6B</sup> -8	ATCC 700675	6B	0,19
9	England <sup>14</sup> -9	ATCC 700676	14	0,016
10	CSR <sup>14</sup> -10	ATCC 700677	14	8
11	CSR <sup>19A</sup> -11	ATCC 700678	19A	6
14	Taiwan <sup>19F</sup> -14	ATCC 700905	19F	2
15	Taiwan <sup>23F</sup> -15	ATCC 700906	23F	0,75
16	Poland <sup>23F</sup> -16	ATCC BAA-343	23F	8
17	Maryland <sup>6B</sup> -17	ATCC BAA-342	6B	1,5
18	Tennessee <sup>14</sup> -18	ATCC BAA-340	14	4
19	Colombia <sup>5</sup> -19	ATCC BAA-341	5	0,003
20	Poland <sup>6B</sup> -20	ATCC BAA-612	6B	0,064
21	Portugal <sup>19F</sup> -21	ATCC BAA-657	19F	0,032
22	Greece <sup>6B</sup> -22	ATCC BAA-658	6B	0,023
23	N.Carolina <sup>6A</sup> -23	ATCC BAA-659	6A	1
24	Utah <sup>35B</sup> -24	ATCC BAA-660	35B	1
25	Sweden <sup>15A</sup> -25	ATCC BAA-661	15A	0,064
26	Colombia <sup>23F</sup> -26	ATCC BAA-662	23F	0,064

Fonte: <http://www.sph.emory.edu/PMEN/>

<sup>a</sup>CIMPEN – Concentração inibitória mínima para penicilina

Em todas as imagens, a definição de bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida individualmente, por comparação visual. O coeficiente de similaridade utilizado foi o de Dice (Dice 1945), baseado na presença e posição de bandas. O dendrograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (*Unweighted Pair-Groups Method using Arithmetic Averages*) (Sneath &

Sokal 1973). Este algoritmo realiza as análises pelo agrupamento de médias não ponderadas. Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 0,7 e 1,5%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada linhagem de isolados (Gertz et al. 2003, Sá-Leão et al. 2006).

### **Análise dos dados**

A base de dados foi construída no programa EpiInfo Windows 3.2. e a análise realizada utilizando o programa SPSS v.15.0 (SPSS Inc., Chicago. IL, EUA). Portador nasofaríngeo de *S. pneumoniae* foi calculado como a razão entre o número de pneumococos isolados da nasofaringe e o número de *swabs* coletados. A taxa de portador de pneumococo não suscetível à penicilina foi calculada como a razão entre o número de pneumococos não suscetíveis e o número de pneumococos isolados da nasofaringe. A idade foi estratificada em grupos por faixa etária. Foram constituídos dois grupos:  $\leq 23$  meses e  $\geq 24$  meses. História de três episódios de OMA em seis meses ou mais de três episódios em 12 meses, diagnosticados no último ano, foi definido como sendo OMA recorrente.

A concordância entre os sorotipos incluídos na formulação das vacinas conjugadas 7-valente (sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), 10-valente (VPC7 mais 1, 5 e 7F) e 13-valente (VPC10 mais 3, 6A e 19A) e aqueles encontrados em isolados de nasofaringe foram usados como indicador da cobertura dos sorotipos da vacina. O critério de interpretação CLSI foi usado para definir os pontos de corte da CIM para penicilina, os quais são: suscetível ( $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ ), intermediária (0,12 a  $1,0\mu\text{g/mL}$ ) e resistente ( $2,0 \mu\text{g/mL}$ ). Os isolados classificados como de resistência intermediária ou resistentes, foram considerados como não suscetíveis. Isolado com resistência a pelo menos dois antimicrobianos em adição a resistência à penicilina foi definido como *S. pneumoniae* resistente a múltiplas drogas.

Análise exploratória, com construção de gráfico-caixa foi realizada para permitir a comparação do nível, dispersão e simetria da distribuição da CIM para a penicilina dentro de cada classe de antimicrobiano testado para a resistência (R) e suscetibilidade (S). Esse mesmo procedimento foi realizado para as diferentes linhagens, detectadas pelo dendrograma da similaridade genética das cepas dos sorotipos 14 e dos não tipáveis. Para a comparação das medianas da CIM entre as linhagens, foi utilizado o

teste Kruskal Wallis, estabelecendo-se o nível de probabilidade de 0,05 para a significância estatística. Médias geométricas (MG) da CIM foram estimadas utilizando transformação logarítmica da CIM para PEN. Comparações entre MG da CIM foram determinadas por análise de variância. Regressão logística foi usada para analisar a relação entre o portador de pneumococo não suscetível e fatores de risco. Os resultados foram apresentados como *odds ratio* (OR) com intervalo de 95% de confiança (IC 95%). Todas as variáveis com valor de p menor que 0,10 na análise univariada foram incluídas no modelo multivariável para identificar fatores independentemente associados ao portador SpNP. As possíveis variáveis de confusão consideradas no estudo foram idade, febre nos últimos 30 dias, hospitalização nos últimos três meses, recorrência de otite média e a existência de irmãos mais velhos. Variáveis significantivas foram selecionadas com base no teste de ratio (Hosmer & Lemeshow 2000). O nível de probabilidade de 0,05 foi utilizado para determinar a significância estatística.

### **Análise do Gel**

Inicialmente a interpretação dos padrões da PFGE foi realizada visualmente utilizando os critérios sistematizados por Tenover et al. (1995):

- Cepas geneticamente indistinguíveis - quando o padrão de PFGE apresentar o mesmo número de bandas (fragmentos de DNA) e essas bandas mostrarem um mesmo tamanho aparente.
- Cepas proximamente relacionadas - quando os padrões de PFGE diferirem em duas a três bandas.
- Cepas possivelmente relacionadas - quando os padrões de PFGE diferirem em quatro a seis bandas
- Cepas não relacionadas - quando os padrões de PFGE diferirem em sete ou mais bandas.

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. As cepas proximamente relacionadas e aquelas possivelmente relacionadas 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.

O padrão da PFGE também foi analisado utilizando o programa BioNumerics por meio do coeficiente de similaridade de Dice (SC) com uma tolerância de posição da banda de 1,5% e otimização de 0,7%. Para este estudo definiu-se como linhagem a presença de três ou mais cepas de pneumococos com similaridade genética  $\geq 80\%$  (Nichol et al 2008).

## 6. 1º ARTIGO

Carriage and risk factors for penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil.

Caritas Marquez Franco<sup>1</sup>, João Guimarães Andrade<sup>2</sup>, Simonne Almeida e Silva<sup>3</sup>, Renato M Oliveira<sup>3</sup>, Fabiana C Pimenta<sup>4</sup>, Juliana Lamaro-Cardoso<sup>5</sup>, Samanta Grassi Almeida<sup>6</sup>, Juan J. Calix<sup>7</sup>, Moon H. Nahm<sup>7</sup>, Maria-Cristina de Cunto Brandileone<sup>6</sup>, Ana-Lucia Sgambatti Andrade<sup>3\*</sup>.

1. Secretariat of Health, Municipality of Goiania, Goias State, Brazil;
2. Department of Tropical Diseases and Dermatology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil;
3. Department of Community Health, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil;
4. Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control & Prevention, Atlanta, USA;
5. Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil;
6. Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil;
7. Departments of Pathology and Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA

\* Corresponding author: Ana Lucia Sgambatti Andrade, Departamento de Saúde Coletiva. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, Esq. 1a. Avenida, S. Leste Universitário. CEP: 74605-050, Goiânia-GO Brasil. Phone: +55 (62) 32027942, Fax: +55 (62) 32029051. Email: ana@iptsp.ufg.br

Running head: *S. pneumoniae* in day care centers in Brazil

Key words: *Streptococcus pneumoniae* carriage, nonsusceptible pneumococcal carriage, risk factors for pneumococcal carriage, day care centers

## Abstract

**Background** - To date, no study has investigated factors associated with penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (PNSp) carriage in day care centers (DCCs) in Brazil, a country where pneumococcal vaccination has still not been introduced routinely.

**Methods** - A cross-sectional survey of nasopharyngeal carriage of PNSp was conducted among 1,192 children attending 62 out of 70 DCCs in Central Brazil. Capsular typing was performed in all PNSp and in a sample of susceptible isolates matched to PNSp by DCCs. Standard antisera methods and multibead assay were used for ascertain and confirm the capsular type. Logistic regression was performed to detect risks associated with PNSp carriage.

**Results** –Nasopharyngeal *S. pneumoniae* was isolated in 686 (57.6%) infants, and 178 (25.9%) of them carried PNSp. Serotypes 14 (53%), 23F (10.2%), 6B (6%), 19F (4.8%) and 19A (4.2%) comprised 78.2% of the PNSp capsular types. There was a high prevalence (11.1%) of non-typeable isolates, of which 62.9% were penicillin-resistant. Serotypes coverage for the PCV7, and for the investigational 10-valent vaccine and 13-valent vaccine were 55.2%, 55.9% and 65.1%, respectively. Being less than 24 months of age (OR=1.79; p=0.006), hospitalization with the previous three months (OR=2.19; p=0.025), and recurrent acute otitis media (OR=2.89; p=0.013) were independently associated with PNSp in a multivariate model.

**Conclusion** – Recurrent acute otitis media may favor nasopharyngeal colonization by PNSp isolates. Consequently, DCC attendees with history of recurrent AOM could significantly contribute to the spread of nasopharyngeal PNSp strains into the community.



## Introduction

*Streptococcus pneumoniae* is a major cause of lower respiratory tract infections and severe invasive diseases in childhood. It is responsible for a range of infections, such as acute otitis media, pneumonia, meningitis and sepsis, especially in developing countries.<sup>1</sup> Nasopharyngeal (NP) colonization by *S. pneumoniae* is a necessary first step in the pathogenesis of pneumococcal infection<sup>2</sup> and often occurs during the first weeks of life.<sup>3,4</sup> There is evidence that serotypes carried in the nasopharynx, especially those recently acquired, match the serotypes responsible for the pneumococcal diseases<sup>[5,6]</sup>.

The incorporation of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) into national vaccination programs has decreased pneumococcal morbidity in vaccinated children and adults through herd immunity, including the infections caused by resistant strains<sup>[7]</sup>. Studies have also shown that PCV7 reduces the NP carriage of vaccine serotypes, but can in turn lead to an increase in non-vaccine serotypes.<sup>8,9</sup> Therefore, baseline data on pneumococcal NP carriage in unvaccinated children are required to monitor the effect of PCV introduction in countries like Brazil, where this vaccination is being considered for addition to the National Immunization Program.

We have previously shown that the serotypes of carriage and invasive isolates of *S. pneumoniae* did not differ significantly; nor did the resistance pattern and potential coverage of PCV7.<sup>10</sup> In a population-based surveillance of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* in infants, we detected that day care center (DCC) attendance is the greatest risk factor for pneumonia in children under five years of age in our municipality.<sup>11</sup> It is acknowledged that DCCs constitute pockets of reservoir of drug-resistant *S.*

*pneumoniae*, where young children are at increased risk of colonization by pneumococci.<sup>12,13</sup> Brazil is the country with the largest child population in Latin America, however, little attention has been dedicated to pneumococcal NP colonization. To date, no study has investigated the factors associated with antibiotic non-susceptible pneumococcal infections in DCCs. In order to obtain insights into the carriage of pneumococcus in a population without previous immunization, we investigated the antimicrobial susceptibility, serotypes, and risk factors of antibiotic non-susceptible pneumococci in healthy children attending DCCs in central Brazil.

## **Material and Methods**

### *Study population*

The investigation was conducted between August and December 2005 in Goiânia (1,201,007 inhabitants), the capital of Goiás State, located just west of central Brazil. Goiânia is a newly urbanized municipality with an area of 739,492 square kilometers, and has been undergoing a period of accelerated population growth over the last ten years.<sup>14</sup> There are 70 public DCCs in the city. A cross-sectional survey of NP carriage of penicillin nonsusceptible pneumococcal (PNSp) isolates was carried out among children between the ages of two and 59 months attending 62 out the 70 municipal DCCs. The remaining eight DCCs were under renovation when the study commenced. Children were not considered eligible for the study if they had taken antibiotics in the previous seven days or had an underlying illness that contraindicated an NP swabbing. The study protocol was approved by the Regional Ethical Committee of the Federal University of

Goiás. Written informed consent was obtained from each child's parents or legal representative.

#### *Data collection*

The socio-demographic characteristics of the families and the potential risk factors for PNSp carriage were obtained by parent interviews, immediately after obtaining consent and before collecting swabs. Information was obtained regarding the child's age, sex, history of fever, household size, number of siblings, antibiotic use in the previous month, hospitalization for any reason in the previous three months, pneumonia in the previous month, and number of episodes of acute otitis media (AOM) in the previous 12 months.

#### *Sampling and sample size*

The overall population attending DCC was considered as the target population for sampling purposes. The number of children sampled per DCC was proportional to the number of children per DCC. Based on previous studies [10] we estimated the rate of *S. pneumoniae* carriage to be between 30% and 20% of them (6% of all participants) to be PNSp. Therefore, we calculated that a sample size of 1,100 children would be necessary to estimate risks of PNSp carriage with a 95% confidence interval (design effect = 1.5). Study participants were recruited sequentially within each DCC until the estimated recruitment number was met.

*Collection of NP swabs and microbiological procedures*

After obtaining informed consent from the children's parents, two trained nurses collected NP specimens with pernasal, extra-thin, flexible, calcium alginate swabs, which were placed into Stuart transport medium tubes (Medical Wire, Corsham, UK). A single NP specimen was obtained per child. The swabs were transferred to the Laboratory of Bacteriology of the Federal University of Goias within two hours of collection, and processed immediately according to the WHO recommendations.<sup>15</sup> The NP swabs were plated on a tryptic soy agar containing 5% sheep blood (Difco, Detroit, MI) and 5 µg/mL gentamicin sulphate (Sigma Chemical, St. Louis, MO), and incubated under 5-7% CO<sub>2</sub> pressure at 37°C for 24 h. Two *S. pneumoniae*-like colonies (different colony morphologies) per plate were picked from the primary culture for identification. *S. pneumoniae* was identified using standard laboratory procedures, including analysis of morphology after Gram's staining, susceptibility to a 5 µg optochin disk (Cecon, São Paulo, Brazil), and bile solubility testing.<sup>16</sup> The isolates were stored in glycerol broth or skim milk at -80°C. Pneumococci were first screened for decreased susceptibility to penicillin (PEN) with 1 µg of oxacillin by the disk-diffusion method. Isolates that presented inhibition zones  $\leq$  19 mm to oxacillin were then tested for minimum inhibitory concentrations (MIC) to PEN using Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). Susceptibility to erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMZ), tetracycline, clindamycin, chloramphenicol, rifampicin and vancomycin was routinely performed by the disk-diffusion method. The breakpoints and MICs for all antimicrobials were determined and interpreted according to the CLSI guidelines.<sup>17</sup> The *S. pneumoniae* ATCC 49619 strain was used for quality control of the disks, and also as an internal control in the susceptibility tests.

*Serotyping of isolates*

Capsular typing was performed in pneumococcal isolates resistant to PEN and in a sample of isolates susceptible to PEN matched to PNSp by DCCs whenever possible. Serotyping was performed at the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil) by Quellung reactions using standard antisera obtained from the Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark).<sup>18</sup>

*Multibead assay*

To confirm the serotypes of non-(sero)typeable pneumococci, they along with a sample of 26 nonsusceptible isolates expressing serotype 14 were retested with a multiplexed inhibition immunoassay for capsular polysaccharides using monoclonal antibodies (mAbs) specific for the capsule types and two sets of latex bead mixture.<sup>19</sup> Bead set 1 contained beads conjugated with polysaccharides (PSs) of serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 11A $\beta$ , 14, 18C, 19A, 19F, and 23F. Bead set 2 contained beads conjugated with PSs of serotypes 2, 6A, 8, 10A, 11A $\alpha$ , 12F, 15B, 17F, 20, 22F, and 33F. Each set of bead mixture was incubated with a bacterial lysate and an appropriate mixture of mAbs. The bacterial lysate was diluted either 5 fold or 10 fold. After incubation, the reaction mixture was washed with PBS containing 0.1% Tween 20 and mixed with fluorescein-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin. After 30 min of incubation, the latex beads were washed and analyzed for their fluorescence in a flow cytometer (FACSArray, Becton Dickinson, San Jose CA). If a pneumococcal strain expresses serotype 14, its lysate inhibits fluorescence of the latex particles conjugated with serotype 14 PS but no other latex particles.

### *Data analysis*

Data analysis was performed using the SPSS v.15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The data were stratified into age groups of  $\leq 23$  months and  $\geq 24$  months. History of 3 episodes of AOM in 6 months or  $> 3$  episodes in 12 months was defined as recurrent AOM. The concordance between the serotypes included in the formulations of the 7-valent (serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), 10-valent (PCV7 plus 1, 5, 7F) and 13-valent (PCV10 plus 3, 6A, 19A) conjugate vaccines and those found in NP isolates was used as an indicator of the serotype coverage of the vaccine. The CLSI interpretive criteria were used for the MIC breakpoints for penicillin as  $\leq 0.06$   $\mu\text{g/mL}$  (S, susceptible), 0.12–1.0  $\mu\text{g/mL}$  (IR, intermediate), and  $\geq 2.0$   $\mu\text{g/mL}$  (HR, resistant). Isolates that were classified as either intermediately resistant or resistant were considered as non-susceptible (R). Multidrug-resistant *S. pneumoniae* were defined as isolates with resistance  $\geq 2$  antimicrobial classes in addition to resistance to penicillin. Box-plot techniques were used to allow the comparison of the level, spread, and symmetry of the distribution of the MIC to penicillin within each class of anti-microbial agent tested for resistance (R) and susceptibility (S). The geometric mean (GM) of the MIC was estimated using logarithmic transformation of the MIC to PEN. Comparisons between the GM of the MIC were determined using analysis of variance. Logistic regression was used to analyze the relationship between PNSp carriage and risk factors. Results were presented as odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI). All variables with p-values less than 0.10 in univariate analyses were included in a multivariable model to identify the factors independently associated with PNSp carriage. The potential confounding variables considered in this study were age, fever

over the previous 30 days, hospitalization over the previous three months, recurrent otitis media, and having an older sibling. The significant variables were selected based upon likelihood ratio tests.<sup>20</sup> A probability level of 0.05 (two-tailed) was used to determine the statistical significance.

## **Results**

### *Study population*

The DCCs had an average number of attendees of 54.7 (range, 25-243). The mean number of children sampled per DCC was 19.5 (range, 7-50). A total of 1192 children were recruited for the study, which represented 32% of 3,720 children under 5 years old attending DCCs in Goiânia city. All of the children lived in the urban area, and 96.3% of them attended childcare full-time. The median age of the participants was 39 months, and more than half (54.1%) were male.

### *S. pneumoniae carriage, susceptibility and serotypes*

NP cultures of 686 children yielded pneumococcal isolates indicating that the NP carriage rate in our population is 57.6% (i.e., 686 out of 1192) (Figure 1). Among 686 isolates, 178 (25.9%) isolates were PNSp and the remainder (508 isolates) were penicillin susceptible (PSSp). Capsular typing was performed for 166 PNSp and 149 PSSp isolates and the serotyping results are shown in Figure 1. Among PNSp, serotypes 14 (53%), 23F (10.2%), 6B (6%), 19F (4.8%) and 19A (4.2%) comprised 78.2% of the isolates. Serotype 14 isolates accounted for 85.7% of the 42 highly

resistant isolates. PSSp isolates displayed diverse serotypes and included pneumococci expressing 30 different serotypes although serotype 14 was the most common (24 out of 149). Among 35 isolates initially tested as non-(sero)typeable pneumococci (NTPn) by Quellung reaction, 20 non-susceptible and 4 susceptible isolates were confirmed to be NTPn by multibead assay. Two discrepancies, perhaps from human errors, were noted between the two serotyping assays: one NTPn by Quellung was typed to be 19F and one type 14 isolate by Quellung was identified as NTPn. 62.9% of NTPn (22/35) were resistant to penicillin. Coverage by the PCV7 ranged from 42.3% for PSSp isolates to 77.1% for PNSp pneumococcal isolates. There was significantly ( $p < 0.001$ ) higher vaccine serotype coverage for the investigational pneumococcal PCV13-valent vaccine (65.1%) compared to PCV7 (55.2%) and to the investigational PCV10-valent vaccine (55.9%).

The results for the 141 PNSp isolates tested with antimicrobials other than penicillin are shown in Table 1. High rates of resistance to TMP-SMZ were found for all serotypes. Multidrug resistance (i.e.; resistance to PEN and at least two other antibiotics) was found in 28.4% of pneumococcal isolates. A total of 75% of NTPn were multidrug resistant. All serotypes were susceptible to levofloxacin and vancomycin. The geometric mean of the MIC for PEN was higher for non-susceptible (R) erythromycin and clindamycin isolates when compared with susceptible (S) isolates (Figure 2).

#### *Risk factors for NP carriage of S. pneumoniae*

Table 2 shows the results of the univariate and multivariate analyses comparing clinical and demographic factors between the 178 children carrying PNSp and the 508 children



carrying penicillin-susceptible *S. pneumoniae*. The significant factors independently associated with the risk of carrying penicillin-resistant *S. pneumoniae* in the multivariable model were: age less than 24 months (OR, 1.79; 95% CI, 1.19-2.70; p=0.006), hospitalization during the previous three months (OR, 2.19; 95% CI, 1.10-4.35; p= 0.025), and recurrent AOM (OR, 2.89; CI 95%, 1.24-6.67; p=0.013). Having older siblings was identified as a protective factor for carriage of PNSp (OR, 0.66; 95% CI, 0.46-0.95; p=0.024).

## Discussion

To our knowledge, this is the first published survey of pneumococcal NP carriage in Brazilian DCCs that sampled large enough numbers of DCC attendees to represent the entire population, instead of a convenient sample of one or a few centers. We found that more than half of all DCC children in our study carried pneumococci in the nasopharynx. This high carriage rate is consistent with results of DCC carriage investigations in Europe, North America, and developing countries.<sup>2</sup>

It is important for public health authorities in our country to identify the factors significantly associated with the risk of PNSp carriage in DCCs since large-scale pneumococcal conjugate vaccination is planned. Our data suggest that recurrent otitis media may favor NP colonization by penicillin-resistant *S. pneumoniae* isolates. Since DCCs may be a significant distribution site of antibiotic-resistant pneumococci to the community, we wonder if attendees with history of recurrent otitis media might contribute in the spread of NP PNSp strains to the entire community. Children with recurrent otitis media are often exposed to several courses of antibiotics, and harbor significantly more antimicrobial-resistant pneumococci in the nasopharynx, when compared with healthy children.<sup>21</sup> Although several authors have detected a positive connection between the carriage of penicillin-resistant pneumococcus and a history of antibiotic use during the month preceding the time of NP specimen collection.<sup>12,22</sup> we did not find evidence of such an association. Being less than 24 months of age was the strongest risk factor for carrying penicillin-resistant pneumococci, as has previously been documented by others.<sup>3,4</sup> This is not surprising, because colonization by *S. pneumoniae* occurs early in life and young infants tend to have more visits to pediatric

clinics and emergency rooms due to respiratory tract infections when compared with older children. The protective effect of older sibling on the carriage of penicillin-resistant strains as suggested in this study needs to be further confirmed. In a prospective study of NP carriage in DCC attendees in Israel, most antibiotic-resistant *S. pneumoniae* isolated from younger siblings in DDC were acquired from their older siblings.<sup>23</sup>

It is interesting to note that 35 (11.1%) out of 315 serotyped isolates could not be assigned a capsular type by Quellung reaction as well as the multibead assay. This percentage of NTPn carriage in this study was higher than those observed in children in The Gambia<sup>24</sup> and in small numbers of Brazilian children.<sup>10,25</sup> The levels of multidrug-resistant NTPn (91%) were also higher than those observed in attendees in Portugal<sup>26</sup> and in children of less than 36 months of age in Israel.<sup>27</sup> NTPn strains have been associated with outbreaks of conjunctivitis in daycare centers, and more rarely, with acute otitis media, respiratory infections, and invasive diseases.<sup>28,29,30</sup> Little is known about the genetic, epidemiology, and the true role of NTPn in NP carriage. In a recent study of 40 NTPn isolates from Gambian children, *cpsA* gene was found only in 31 isolates.<sup>31</sup> Since *cpsA* gene is a highly conserved capsule gene locus, the remaining 9 isolates presumably did not have the capsule gene locus. Molecular studies are underway to investigate the nature of our 35 NTPn isolates found in our study. Our preliminary data suggest that most NTPn have *cpsA* gene and some even have *cps14H* gene, which is specific for serotype 14 capsule gene locus. The NTPn isolates with *cps14H* gene presumably have non-functional serotype 14 capsule gene locus. Interestingly, an analogous example was described in a report of a NTPn isolate with non-functional serotype 8 capsule gene locus.<sup>32</sup>

The prevalence of penicillin resistant isolates was slightly higher in this study than the levels we have previously detected in carriage isolates in healthy children and in children at the time of hospital admission (25.9% versus 19.8%;  $p=0.06$ ). The high resistance to both penicillin and TMP-SMZ detected in this study has already been described in other carriage and invasive disease studies in Brazil.<sup>25</sup> Our results confirm that erythromycin and clindamycin resistance are associated with high levels of PNSp. Data from northeastern Brazil regarding pneumococcal carriage in children have also indicated that there is an association between penicillin resistance and resistance to erythromycin.<sup>33</sup> The macrolide resistance to pneumococcus is increasing worldwide,<sup>34</sup> and although resistance to erythromycin in pneumococcal invasive isolates is still low in Brazil, a gradual increase in resistance has been documented since 1990.<sup>35,36</sup>

Serotype 14 has been the most common serotype associated with erythromycin resistance in several reports<sup>37</sup>, and in Brazil it has been responsible for the rapid increase of penicillin resistance in pneumococcal invasive diseases in the last decade.<sup>38</sup> In fact, in this study, PNSp serotype 14 appeared to be the major type isolated. Serotype 19A ranked the fifth most common PNSp serotypable isolate and this finding deserves consideration as an important baseline data before the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine into the Brazilian universal immunization program. Similarly, other countries such as Israel and South Korea, have experienced an increase in the proportion of pneumococcal infection due to serotype 19A prior to vaccine introduction.<sup>39</sup> Recent studies have revealed an increase in 6C serotype in NP isolates after the introduction of PCV7 and also that the vaccine is not able to provide protection against capsular type

6C.<sup>40</sup> This issue needs to be further addressed in Brazil where preliminary data show that the prevalence of serotype 6C seems to be high.<sup>41</sup>

Some limitations of this study should be mentioned. The NP sampling was performed from August to December, covering the winter and spring seasons. However, we missed sampling from May to July, the autumn season, when the isolation of pneumococci is generally higher, according to our previous experience.<sup>10</sup> This gap in sampling could have led to an underestimation of the colonization rate or PNSp prevalence. In addition, we analyzed the serotype of just one isolate per plate; therefore, it was not possible to detect whether multiple serotypes were carried within a single child. The detection of multiple pneumococcal serotypes may occur as frequently as 12%, depending upon the methodology applied.<sup>15,42</sup>

In this study, 55.2% of the serotypes colonizing the nasopharynx of children were those present in the PCV7, but a significantly greater proportion of 65.1% would be covered by the PCV13. Therefore, even in countries where the PCV7 has still not been routinely introduced, the increase in non-vaccine serotypes, as well as NP pneumococcal resistance, cannot be ignored and should be the focus of continued surveillance. Investigational vaccines with formulations containing the emergent 19A serotype and serotypes 1 and 5 that frequently cause pneumococcal invasive disease in our country would be well received in Brazil.

**Potential conflicts of interest** - AL Andrade has received research grant from Wyeth.

**Acknowledgments:** This investigation was sponsored by the Brazilian Council for Research and Development/CNPq (Research Grants no. 473187/2004-3, 482646/2007-

1), the Secretariat of Health of Goiânia Municipality, and a grant from the US NIH (AI-31473) to MHN. AL Andrade (grant no. 309196/2007-8) and MC Brandileone (grant no. 301340/2007-2) receive fellowships from the CNPq.

## References

1. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. Weekly Epidemiological Record. No. 12, 2007, 82, 93–104. Available at <http://www.who.int/wer/2007/wer8212.pdf>. Accessed January 12, 2009.
2. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:144-154.
3. Granat SM, Mia Z, Ollgren J, et al. Longitudinal study on pneumococcal carriage during the first year of life in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:319-324.
4. Hill PC, Cheung YB, Akisanya A, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian infants: a longitudinal study. *Clin Infect Dis*. 2008;46:807-814.
5. 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.
6. 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.
7. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Méd.* 2003;348:1737-1746.
  8. Frazão N, Brito-Avô 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.
  9. Huang SS, Platt R, Rifas-Shiman SL, Pelton SI, Goldmann D, Finkelstein JA. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. *Pediatrics.* 2005;116:e408-413.
  10. Laval CB, de Andrade AL, Pimenta FC, et al. 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.
  11. 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.



12. Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Yagupsky P. Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 1996; 174:1352-5.
13. de Lencastre H, Tomasz A. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:75-81.
14. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Geociências. Área Territorial Oficial. Available at: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/areaterritorial/area.php?nome=Goi%E2nia&codigo=&submit.x=41&submit.y=4>. Accessed January 12, 2009.
15. O'Brien KL, Nohynek H. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22: e1-11.
16. Facklam RR, Washington JA. Streptococcus and related catalase-negative Gram positive cocci. In: Balows A, Hausler WJ, Hermann Jr KL, Isenberg HD, and Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1991:238-257.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2007.
18. Sorensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:2097-2100.
19. Yu J, Carvalho Mda G, Beall B, Nahm MH. A rapid pneumococcal serotyping system based on monoclonal antibodies and PCR. *J Med Microbiol.* 2008;57:171-8.
20. Hosmer DW, Lemeshow S. Multiple Logistic Regression. In: Hosmer DW, Lemeshow S, eds. Applied Logistic Regression, 2nd ed. New York: John Wiley, 2000:31-44.
21. van Kempen MJ, Vaneechoutte M, Claeys G, Verschraegen GL, Vermeiren J, Dhooge IJ. Antibiotic susceptibility of acute otitis media pathogens in otitis-prone Belgian children. *Eur J Pediatr.* 2004;163:524-529.
22. Arason VA, Kristinsson KG, Sigurdsson JA, Stefánsdóttir G, Mölstað S, Guðmundsson S. Do antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in children? Cross sectional prevalence study. *BMJ.* 1996;313:387-391.

23. 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.
24. Hill PC, Akisanya A, Sankareh K, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. *Clin Infect Dis.* 2006;43:673-679.
25. 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.
26. Sá-Leão R, Simões AS, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H. Identification, prevalence and population structure of non-typeable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. *Microbiology.* 2006;152:367-376.
27. Shouval DS, Greenberg D, Givon-Lavi N, Porat N, Dagan R. Site-specific disease potential of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes in pediatric invasive disease, acute otitis media and acute conjunctivitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25:602-607.

28. Buck JM, Lexau C, Shapiro M, et al. A community outbreak of conjunctivitis caused by nontypeable *Streptococcus pneumoniae* in Minnesota. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:906-911.
29. Porat N, Greenberg D, Givon-Lavi N, et al. The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis*. 2006;194:689-696.
30. Medeiros MI, Neme SN, da Silva P, et al. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* as etiological agents of conjunctivitis outbreaks in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40:7-9.
31. Sankareh K, Antonio M, Sealy T, Adegbola RA. Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* in The Gambia [Abstract P2-010, page 192]. In: 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Reykjavik, Iceland, 8 to 12 June, 2008.
32. Waite RD, Penfold DW, Struthers JK, Dowson CG. Spontaneous sequence duplications within capsule genes cap8E and tts control phase variation in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. *Microbiology*. 2003;149:497-504.
33. Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, de Andrade AL, Di Fabio JL. Increase in penicillin resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil after 1999. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:437-439.

34. Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1294-1300.
35. Mendonça-Souza CR, Carvalho Mda G, Barros RR, et al. Occurrence and Characteristics of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated in Three Major Brazilian States. *Microb Drug Resist.* 2004;10:313-320.
36. Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *J Med Microbiol.* 2006;55:567-574.
37. Dias R, Caniça M. Emergence of invasive erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in Portugal: contribution and phylogenetic relatedness of serotype 14. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:1035-1039.
38. Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, et al. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis.* 2000;30:78-86.
39. Black S. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease: a complicated story. *Clin Infect Dis.* 2008;47:485-486.

40. Nahm MH, Lin J, Finkelstein JA, Pelton SI. Increase in the Prevalence of the Newly Discovered Pneumococcal Serotype 6C in the Nasopharynx after Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine. *J Infect Dis.* 2009;199:320-325.
  
41. Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1225-33.
  
42. Vestrheim DF, Høiby EA, Aaberge IS, Caugant DA. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing children attending day-care centers in Norway. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2508-18.

Table 1. Number of nonsusceptible isolates of penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotypes recovered from nasopharyngeal carriage of day-care children. Goiânia, Brazil, 2005.

Serotypes	No. of isolates tested	Erythromycin (%)	SXT <sup>a</sup> (%)	Tetracycline (%)	Clindamycin (%)	Chloramphenicol (%)	Multidrug resistant <sup>b</sup> (%)
14	82	6 (7.3) <sup>c</sup>	70 (85.4)	8 (9.8)	7 (8.5)	7 (8.5)	18 (22)
19A	7	1 (14.3)	4 (57.1)	2 (28.6)	0	0	1 (14.3)
19F	7	0	6 (85.7)	1 (8.3)	0	2 (28.6)	3 (42.9)
23F	12	1 (8.3)	10 (83.3)	1 (8.3)	0	2 (16.7)	2 (16.7)
6B	8	0	4 (50)	0	0	0	0
9N	1	0	1 (100.0)	0	0	1 (100.0)	1 (100.0)
9V	1	0	1 (100.0)	0	0	0	0
6A	1	0	1 (100.0)	0	0	0	0
NTPn	20	1 (5.0)	18 (90.0)	2 (10.0)	4 (20.0)	6 (30.0)	15 (75.0)
Total	139	9 (6.5)	115 (82.7)	15 (10.8)	11 (7.9)	18 (12.9)	40 (28.8)

<sup>a</sup>SXT - trimethoprim-sulfamethoxazole; <sup>b</sup> nonsusceptible to penicillin and also to  $\geq 2$  antimicrobials; <sup>c</sup> numbers in parenthesis express the percentage of nonsusceptible isolates in relation to the number of isolates tested

Table 2. Potential variables associated with carriage of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* among infants attending DCCs in Brazil, 2005.

Variables	No. (%) of children		Univariate analysis			Multivariable analysis		
	PNSp <sup>1</sup> N=178	PSSp <sup>2</sup> N=508	OR	(IC 95%)	P	OR	(IC 95%)	P
Age-months								
< 24	50 (28.1)	92 (18.1)	1.77	(1.19-2.63)	0.005	1.79	(1.19-2.70)	0.006
24-59	128 (71.9)	416 (81.9)	1					
Sex								
male	99 (55.6)	280 (55.1)	1.02	(0.72-1.43)	0.908			
female	79 (44.4)	228 (44.9)	1					
Fever <sup>3</sup>								
yes	64 (36.0)	139 (27.4)	1.49	(1.03-2.14)	0.032	1.35	(0.93-1.96)	0.113
no	114 (64.0)	368 (72.6)	1					
Use of antibiotic <sup>3</sup>								
yes	34 (19.1)	92 (18.1)	1.05	(0.68-1.63)	0.823			
no	141 (79.2)	401 (78.9)	1					
Hospitalization <sup>4</sup>								
yes	17 ( 9.6)	21 ( 4.1)	2.44	(1.26-4.75)	0.008	2.19	(1.10-4.35)	0.025
no	161 (90.4)	486 (95.9)	1					
Pneumonia <sup>3</sup>								
yes	3 ( 1.7)	4 ( 0.8)	2.16	(0.38-11.52)	0.305			
no	175 (98.3)	504 (99.2)	1					
Recurrent acute otitis media								
yes	11 ( 6.2)	13 ( 2.6)	2.50	(1.10-5.69)	0.029	2.89	(1.24-6.67)	0.013
no	167 (93.8)	494 (97.4)	1					
Use of antibiotic by a child of household <sup>3</sup>								
yes	12 ( 6.7)	21 ( 4.1)	1.70	(0.81-3.53)	0.166			
no	159 (89.3)	473 (93.1)	1					
Having younger sibling								
yes	44 (24.7)	113 (22.2)	1.14	(0.77-1.71)	0.501			
no	134 (75.3)	395 (77.8)	1					
Having older sibling								
yes	105 (59.0)	345 (67.9)	0.68	(0.48-0.97)	0.031	0.66	(0.46-0.95)	0.024
no	73 (41.0)	163 (32.1)	1					
Hospitalized sibling <sup>4</sup>								
yes	11 ( 6.2)	18 ( 3.5)	1.78	(0.82-3.85)	0.152			
no	166 (93.2)	484 (95.3)	1					

Missing values for any predictor were excluded from the analysis, so the numbers may not add to totals

<sup>1</sup> Penicillin nonsusceptible

<sup>2</sup> Penicillin susceptible

<sup>3</sup> Previous 30 days

<sup>4</sup> Previous three months



Figure 1. Flow chart of nasopharyngeal (NP) swabs collected from children attending DCCs in Brazil, 2005.

PNSp=penicillin nonsusceptible pneumococcal; PSSp=penicillin susceptible pneumococcal; NTPn=notypeable pneumococcal

\* Other serotypes=1, 2, 5, 12F, 15A, 15C, 16F, 18B, 18F, 20

N=1,192 NP swabs from children in DCCs, Goiânia-Brazil, 2005

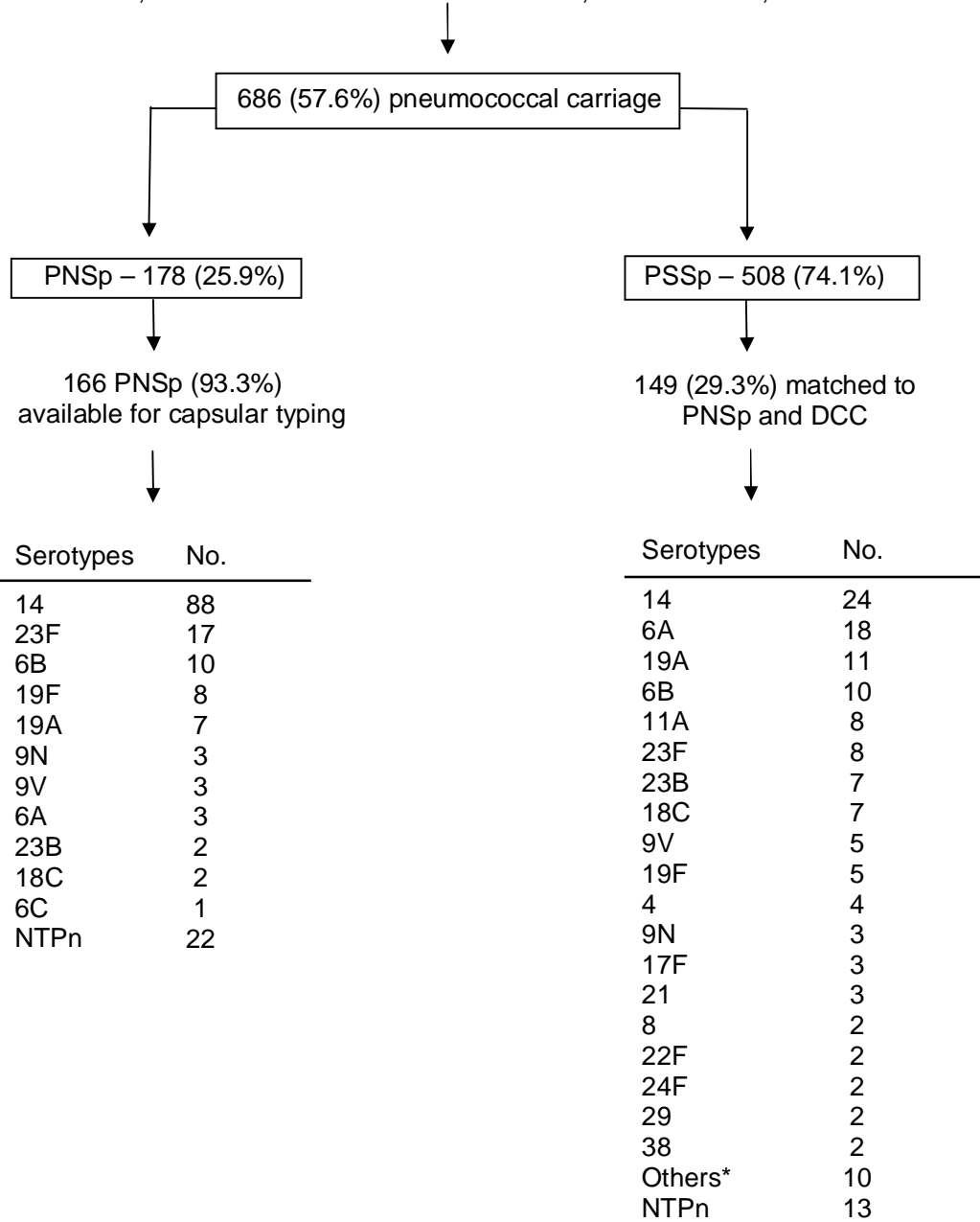
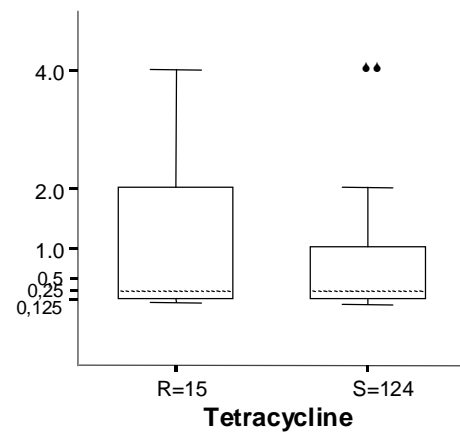
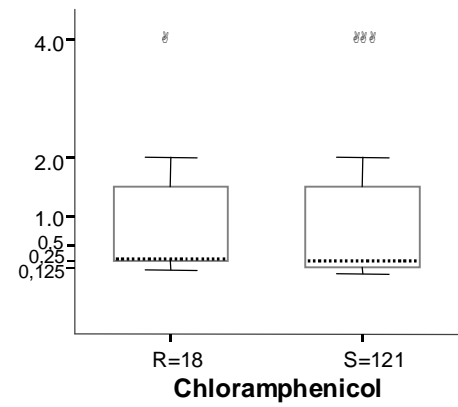
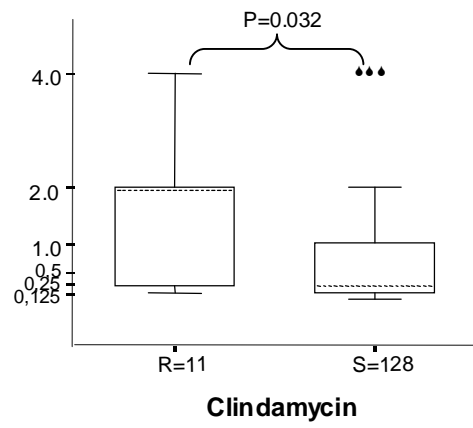
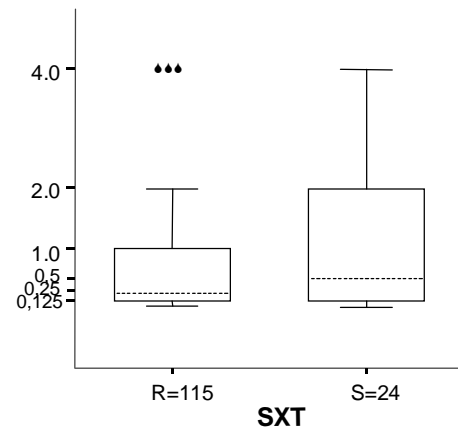
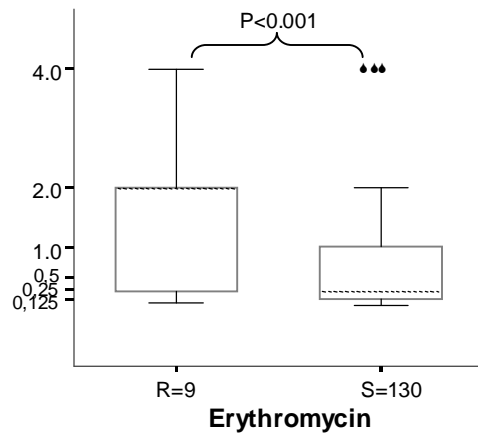


Figure 2. Box-plot of minimum inhibitory concentration (MIC  $\mu\text{g/mL}$ -1) to penicillin for nonsusceptible (R) and susceptible (S) isolates to the antimicrobials tested. Horizontal lines that cross the boxes indicate median values of the MIC distribution. Central vertical lines (whiskers) that extend from the boxes to the highest and lowest rates indicate the 95% and 5% of the MIC distribution, respectively. The circles are “outliers”, values between 1.5 and 3.0 box lengths from the top or bottom of the box. The asterisks are “extremes” values more than 3 box lengths distant. The axes are on log<sub>10</sub> scale. SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole. R= nonsusceptible pneumococcal; S= susceptible pneumococcal.

Minimum Inhibitory Concentration - Penicillin



Min-Max  
25-75%

## 7. 2º ARTIGO

### **Molecular epidemiology of penicillin nonsusceptible pneumococcal carriage and invasive isolates from children in Goiânia, Brazil.**

Cáritas M Franco<sup>a</sup>, Juliana Lamaro-Cardoso<sup>b</sup>, Maria Cláudia C Dantas<sup>b</sup>, Leandro LG Oliveira<sup>c</sup>, André Kipnis<sup>b</sup>, Cristyane GBB Rocha<sup>b</sup>, João G Andrade<sup>d</sup>, Sueli Lemes<sup>f</sup>, Juan J Calix<sup>h</sup>, Moon H Nahm<sup>h</sup>, Samanta Cristine G Almeida<sup>e</sup>, Maria Cristina C Brandileone<sup>e</sup>, Ana Lucia S Andrade<sup>i\*</sup>.

<sup>a</sup> Secretariat of Health of the Municipality of Goiânia, Goiás, Brazil; Catolica University of Goiás, Brazil

<sup>b</sup> Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

<sup>c</sup> Catolica University of Goiás, Brazil

<sup>d</sup> Department of Tropical Diseases and Dermatology, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

<sup>e</sup> Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Public Health Laboratory, Goias State, LACEN, Brazil

<sup>h</sup> Department of Pathology and Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA

<sup>i</sup> Department of Community Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

This investigation was sponsored by the Brazilian Council for Research and Development/CNPq (Research Grant no. 482646/2007-1), the Secretariat of Health of Goiânia Municipality, and a grant from the US NIH (AI-31473) to MHN. Wyeth Vaccines Research has funded the pneumococcal invasive disease component of the investigation. AL Andrade (grant no. 309196/2007-8) and MC Brandileone (grant no. 301340/2007-2) are fellowships from the CNPq.

**\*Address for correspondence:**

Ana Lucia Sgambatti Andrade, Departamento de Saúde Coletiva  
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás  
Rua 235, Esq. 1a. Avenida, S. Leste Universitário. CEP: 74605-050, Goiânia-GO  
Brasil. Phone: 55 62 32027942, Fax: 55 62 32029051. Email: [ana@iptsp.ufg.br](mailto:ana@iptsp.ufg.br);  
[alssandrade@gmail.com](mailto:alssandrade@gmail.com)

## Abstract

**Background:** In a recent investigation we found that the penicillin nonsusceptible pneumococcal isolates (PNSp) circulating in day-care centers (DCC) belonged to serotype 14. We also found a significant rate of non(sero)-typeable isolates (NTPn), with high proportion of PNSp. These findings prompted us to examine the genetic patterns of these carriage nonsusceptible serotype 14 and NTPn isolates compared with invasive isolates we have detected in the ongoing pneumococcal surveillance of the same pediatric population.

**Methods:** A total of 123 PNSp isolates were submitted to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): 106 carriage and 17 invasive isolates (blood). The carriage isolates were obtained from a survey on nasopharyngeal pneumococcal in DCCs and the invasive isolates were obtained from a population-based surveillance among children attending emergency rooms. Standard antisera methods and multibead assay were used to ascertain and confirm the capsular type. PCR reactions were applied to identify the presence of pneumolysin, capsule gene locus (*cpsA*) and type 14 gene locus (*cps14H*) for all NTPn isolates and for a sample of serotype 14 isolates. PFGE was used to detect pneumococcal clusters and isolates were defined as epidemiologically related if they shared  $\geq 80\%$  similarity on the dendrogram.

**Results:** One-hundred and five out of 123 pneumococcal strains grouped into eleven clusters. Three main pneumococcal clusters were identified. The major one grouped 34 serotype 14 strains (26 carriage and eight invasive isolates), with 82.7% of similarity and was found to be related to the global pneumococcal clone Spain<sup>9V</sup>-3. Overall, 90.9% of the NTPn carriage strains were genetically related with pneumococcal expressing capsular type 14, carriage or invasive strains. NTPn isolates were genetically diverse, however a dominant lineage was found which grouped 14 pneumococcal strains (83.6% of similarity) while a second lineage grouped 3 isolates. Almost half of the MRD isolates grouped into the NTPn cluster.

**Conclusions:** Epidemiologic and molecular evidences support the findings that NTPn carriage isolates are genetically similar to carriage and invasive isolates expressing

capsular type 14. The implications of these findings on the impact of the vaccination are unclear. Although the NTPn strains do not express the type 14 capsule, whether vaccinated people will be immune to NTPn genotype 14 is an intriguing subject for further investigation.

**Key word:** *Streptococcus pneumoniae*, molecular epidemiology, pneumococcal serotype 14, day-care centers, nontypeable *S. pneumoniae*, clone Spain<sup>9V</sup>-3.



## Introduction

Pneumococcal diseases are a major public health problem all over the world and in developing countries young children carry the major disease burden (WHO, 2007). The nasopharynx colonization by *S. pneumoniae* precedes the pneumococcal invasive disease (Bogaert et al. 2004) and there is evidence that serotypes carried in the nasopharynx, can reflect those associated to the pneumococcal disease in the community (Lloyd-Evans et al. 1996, Kellner et al. 1998). Penicillin resistance and multidrug-resistance have been gradually increasing among *S. pneumoniae* and are now common worldwide, and in many regions of the world constitute most pneumococcal isolates (Jacobs 2003, Dagan & Klugman 2008).

Studies show that day-care centers (DCC) are an ideal environment for the spread of penicillin nonsusceptible pneumococcal isolates (PNSp) (Klugman 2007, Greenberg et al. 2008). Clones of pneumococcus may differ in their ability to colonize or to cause invasive disease (Robinson et al. 2001). A great diversity in the genetic profile of carriage strains has been documented, while invasive disease strains have been associated with higher genetic similarity (Lloyd-Evans et al. 1996, Robinson et al. 2001, Brueggemann et al. 2003, Reis et al. 2008). Also, a wide range in the genetic profile of penicillin susceptible (PSSp) strains has been detected in contrast to the small genetic variability for PNsP strains (Soares et al. 1993, Tomasz et al. 1998, Wolf et al. 2000).

In most countries *S. pneumoniae* serotype 14 predominates among children, accounting for 50% of the PNsP isolates (Hausdorff et al. 2000, Di Fabio et al. 2001, Hausdorff et al. 2001, Brandileone et al. 2003). In Brazil, studies have documented the emergence and rapid spread of PNsP serotype 14, genetically similar to the global clone Spain<sup>9V</sup>-3 (Brandileone et al. 1998, Ko et al. 2000). The distinction between pneumococcal clones capable of producing invasive disease from those that remain as carriers must rely on studies that address pneumococcal isolates from both, nasopharynx and clinical specimens, obtained from children living in the same municipality and the same period of time as far apart as possible.

Anticipating the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, we have conducted several studies to assess the impact of the vaccination (Brandileone et al. 2003, Simões et al. 2004, Laval et al. 2006). However, little information has been produced on nasopharyngeal *S. pneumoniae* isolates from DCC (Wolf et al. 2000, Rey et al. 2002). In a recent study conducted in Goiânia, we found serotype 14 as the main capsular type in nasopharynx among children attending DCCs and more than half of serotype 14 isolates were PNSp (Franco et al. 2009). Of note, the non(sero)-typeable isolates (NTPn) ranked as the second among all the carriage isolates and 62.9% of them were resistant to penicillin, considered as unusual outcome in the epidemiology of *S. pneumoniae*. We have also found PNSp serotype 14 isolates to be highly prevalent in the ongoing invasive pneumococcal disease (IPD) surveillance we have been conducting among children up to three years in Goiania (Andrade et al. 2008).

These findings prompted us to assess the genetic similarity between PNSp serotype 14 and NTPn isolates obtained of the pneumococcal carriage survey. For comparison purpose we also analysed the genetic profile of PNSp serotype 14 invasive strains derived from the IPD ongoing surveillance in the same pediatric population. In this study, a total of 123 nonsusceptible pneumococcal strains were submitted to pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and PCR for genetic analysis. Knowledge of the genetic characteristics of pneumococci strains circulating in the community is needed to establish a robust baseline prior to vaccination.

## **Methodology**

### **Obtaining pneumococcal carriage and invasive strains**

#### *Survey in day-care centers*

As part of the efforts to assess the impact of the pneumococcal conjugate vaccine in Brazil we conducted a survey of pneumococcal nasopharyngeal (NP) carriage among children who attended DCCs in the city of Goiânia, central Brazil. Details of this survey were described elsewhere (Franco et al. 2009). Briefly, between August and December 2005 a cross-sectional study on nasopharyngeal carriage of PNSp was carried out among 1,192 children aged between 2 and 59 months attending 62

DCCs of the municipality. The number of children sampled per DCC was proportional to the number of children per DCC. The study protocol was approved by the Regional Ethical Committee from the Federal University of Goiás (UFG) and written informed consent was obtained from each child's parents or their legal representative. A single pernasal, extra-thin, flexible, calcium alginate nasopharyngeal swab was obtained per child (Transwabs, Medical Wire, Corsham, UK), following the WHO guidelines for collection and transport of nasopharyngeal samples (O'Brien & Nohynek 2003). Among 166 penicillin nonsusceptible isolates (PNSp), serotype 14 (53%) represented the majority of typed isolates, followed by NTPn (13.3%).

#### *Surveillance of invasive pneumococcal disease (IPD)*

Isolates were obtained from an active population-based surveillance of IPD that was launched in 2007, among children up to three years of age. The methodology and preliminary results of the surveillance were presented elsewhere (Andrade et al. 2008). In summary, children attending at the emergency rooms with body temperature  $\geq 39^{\circ}\text{C}$  and/or clinical suspicion of pneumonia, meningitis, sepsis, or other IPD (e.g., arthritis, osteomyelitis, or peritonitis) were invited to participate in the investigation. The surveillance project was approved by both, Regional and Brazilian Ethical Committee, and informed consent was obtained from parents of children. A case of IPD was defined as isolation of *S. pneumoniae* from a normally sterile site (e.g. cerebrospinal fluid, blood, pleural fluid) from May 2007 to December 2008. Only one isolate from each child was included in the analysis. Pneumococcal serotype 14 accounted for 59.4% of the PNSp invasive isolates, and were used as comparison group with those type 14 PNSp isolates obtained in the DCCs carriage survey.

#### *S. pneumoniae strain characterization*

Pneumococcal isolation and identification was performed at the Bacteriology Laboratory at the UFG and at the Public Health Laboratory of Goiás State (LACEN), respectively for carriage and invasive isolates using standardized methodologies. Isolates of *S. pneumoniae* were subcultured and sent to Adolfo Lutz Institute (IAL), São Paulo, Brazil for antimicrobial susceptibility testing. All isolates were screened for susceptibility to oxacillin (for penicillin) by disk diffusion (OXOID, Basingstoke,

Inglaterra) and if resistant, minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the Etest<sup>®</sup> (AB BIODISK, Solna, Sweden). Susceptibility to ceftriaxone, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMZ), levofloxacin, tetracycline, clindamycin, chloramphenicol, rifampicin and vancomycin, was routinely performed by disk-diffusion method, and confirmed by Etest<sup>®</sup>. Standard guidelines for antimicrobial susceptibility interpretation were based on the CLSI (CLSI 2007). *S. pneumoniae* ATCC 49619 was used for quality control of the disks and as internal control in the susceptibility tests. Isolates intermediately resistant or resistant to the antimicrobial were pooled as PNSp isolates. Multidrug-resistant (MDR) *S. pneumoniae* was defined as PNSp to at least three different antimicrobial classes.

### **Serotyping of isolates**

Pneumococci were serotyped at the IAL, by Quellung reactions using standard antisera obtained from the Statens Seruminstitut (Copenhagen, Denmark) (Sorensen 1993). For carriage isolates, all NTPn isolates and 24% of isolates expressing serotype 14 were sent to the University of Alabama at Birmingham-USA for confirmation of capsular type by multi-bead system and PCR for genetic studies.

### **Multibead assay**

Carriage isolates nontypeable by Quellung and a sample of twenty-six PNSp carriage isolates expressing serotype 14 were retested by a multiplexed inhibition immunoassay for capsular polysaccharides (Yu et al. 2008). Bead set 1 contained beads conjugated with polysaccharides (PSs) of serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 11A $\beta$ , 14, 18C, 19A, 19F, and 23F. Bead set 2 contained beads conjugated with PSs of serotypes 2, 6A, 8, 10A, 11A $\alpha$ , 12F, 15B, 17F, 20, 22F, and 33F. Each set of bead mixture was incubated with a bacterial lysate and an appropriate mixture of mAbs. The bacterial lysate was diluted either 5 fold or 10 fold. After incubation, the reaction mixture was washed with PBS containing 0.1% Tween 20 and mixed with fluorescein-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin. After 30 min of incubation, the latex beads were

washed and analyzed for their fluorescence in a flow cytometer (FACSArray, Becton Dickinson, San Jose CA).

### **PCR reactions for genetic studies**

NTPn isolates and isolates expressing serotype 14 were examined for the presence of pneumolysin (*ply*), *cpsA*, and *cps14H* genes by PCR. The presence of pneumolysin indicates that the isolates are *S. pneumoniae*, while the presence of *cpsA* shows the isolates have a capsule gene locus of any serotype. *cps14H* gene was used to verify if the isolates had type 14 gene locus which may be either functional or non-functional. PCR reaction mixtures contained 38.8  $\mu$ l of sterile water, 2  $\mu$ l of each 5-pmol/ $\mu$ l primer, 2  $\mu$ l of 10mM dNTP, 5  $\mu$ l of 10 x Taq buffer solution (Takara Biomedical, Shiga, Japan), and 0.2  $\mu$ l of LA Taq polymerase (2.5 U/ $\mu$ l, Takara Biomedical). For template, either chromosomal DNA isolated with Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI) was used. PCR mixture was incubated at 94 °C for 10 min for the initial denaturation. Then the sample was subjected to 30 cycles of thermal cycling and the conditions were denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min. PCR products were separated by electrophoresis in 1% agarose gel and visualized with ethidium bromide under a UV light. The sequences of the primers were 5'-atttctgtaacagctaccaacga-3' for pneumolysin forward, 5'-gaattccctgtcttttcaaagtc-3' for pneumolysin reverse, 5'-cttgcgcgaggtgcagaattccctctac-3' for *cps14H* forward, 5'-gccaaaatactgacaaagctagaatatagcc-3' for *cps14H* reverse, 5'-gcagtacagcagttgttgactgacc-3' for *cpsA* forward and 5'-gaatatttcattatcagtcaccagtc-3' for *cspA* reverse primers.

### **Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)**

The methodology for PFGE was adapted from a protocol previously described (Brandileone et al. 1998, Sá-Leão et al. 2000). Genomic DNA was prepared in situ in agarose blocks and was digested with 20 U of *Sma*I (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Restriction fragments of DNA were separated by PFGE with a contour-clamped homogeneous electric field CHEF DR-II apparatus (Bio-Rad, Laboratories, Birmingham, United Kingdom) in 1% agarose (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). The running parameters were as follows: initial pulse 5 s; final pulse, 35 s; field strength 6V/cm for

22h at 11°C. Lambda DNA ladder (New England Biolabs, EUA) was used as molecular weight standard. Pneumococcal strain R6 (GenBank accession number NC003098) was used for intra-gel normalization and inter-gel comparison purpose. All the gels had three R6 positioned at the second lane, the middle, and at the lane before the last. The R6 strain was kindly provided by Dr Herminia de Lencastre from Institute of Chemical and Biological Technology (Oeiras, Portugal). Gels were stained with ethidium bromide ( $0.5\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and photographed in a photo-gel system (Quality One Program, version 4.5, Universal HOOD II, Gel Doc EQ; Bio-Rad). PFGE band patterns were firstly assigned by visual inspection of the macrorestriction profiles following the Tenover criteria (Tenover et al. 1995), and further analysed using BioNumerics software (Applied Maths, version 5.01, Belgium).

### **Analysis**

The gel photos were scanned and imported into a Bionumerics database as inverted 8-bit gray-scale TIF images. The dendrogram was constructed by means of the Dice band-based similarity coefficient with a band position tolerance of 1.5% and an optimization of 0.7%. Isolates were defined as epidemiologically related if they shared  $\geq 80\%$  similarity on the dendrogram. A cluster was defined as three or more related isolates. PFGE fingerprint patterns were compared with 26 available global pneumococcal clones (McGee et al, 2001) stored at IAL on standard basis. Box-plot techniques were used to allow the comparison of the level, spread, and symmetry of distribution of the MIC of penicillin among clusters. Comparisons between the MIC of penicillin were determined using Kruskal-Wallis analysis of variance test.

### **Results**

Table 1 shows details of the two studies from where the pneumococcal carriage and invasive isolates were obtained. Among all 123 isolates submitted to PFGE, 106 were obtained of NP from DDC attendees of which 84 expressed capsule type 14 and 22 were NTPn isolates. All 17 invasive strains were serotype 14. Pneumococcal invasive strains were significantly ( $p=0.033$ ) more resistant compared with carriage strains.

One-hundred and five out of 123 strains grouped into eleven clusters (Table 2 and Figure 1) while 18 pneumococcal strains did not group: 12 carriage capsule type 14, four invasive type 14 and two NTPn strains. Three main pneumococcal clusters were identified. The major cluster grouped 34 serotype 14 strains (26 carriage and eight invasive strains), which shared 82.7% of similarity and were genetically related to the global pneumococcal Spain<sup>9v</sup>-3 clone. The second cluster contained two NTPn strains highly related with four pneumococcal carriage strains expressing capsular type 14. The third cluster grouped the majority of NTPn strains which were genetically related (82.3%) to three pneumococcal serotype 14. Overall, 20 (90.9%) out of 22 NTPn carriage strains were genetically related ( $\geq 80\%$ ) with pneumococcal expressing capsular type 14, carriage or invasive strains (data not shown). The dendrogram in Figure 2 showed that although the NTPn isolates were genetically diverse (54.5% similarity) there was a dominant lineage which grouped 14 pneumococcal strains (83.6% of similarity) while a second lineage grouped 3 isolates; one did not harbor capsule gene type 14. All NTPn had capsule gene locus and 10 (45.4%) of them presented capsule gene locus to type 14. Almost half (49%) of the MRD isolates grouped into the NTPn cluster.

There was a significant difference in the median values of MIC to penicillin (Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$ ) when comparing the three main pneumococcal clusters (Figure 3). The first pneumococcal cluster, which grouped the majority of invasive strains, presented the high median of MIC to penicillin in contrast to the third cluster which grouped the majority of NTPn strains.

## **Discussion**

To the best of our knowledge this is the greatest collection of serotype 14 submitted to molecular studies in Brazil, obtained concurrently from the same geographic area. This study provides solid evidences that several pneumococcal strains colonizing the nasopharynx are genetically close to the invasive strains currently causing pneumococcal disease in the pediatric population of the municipality. Previous report in Goiânia corroborates the observation that strains colonizing the nasopharynx are responsible for IPD in the community (Andrade et al. 2003).

In the investigation by Hathaway and colleagues (2004) the authors evaluated 27 nonencapsulated pneumococci and found evidences that the NTPn isolates were genetically related to encapsulated strains, especially capsular types 33F and 37. In Portugal, Sá-Leão et al. (2006) examined a collection of 213 NTPn isolates and observed that their genetic backgrounds differed from those found in serotypable strains. In contrast, our findings support that the NTPn strains are genetically similar to the genotype of invasive and carriage strains expressing capsular type 14.

We also detected the existence of a dominant lineage of pneumococci expressing capsular type 14 genetically similar to the international Spain<sup>9V</sup>-3 clone, which congregated the majority of the carriage and IPD pneumococcal strains. The penicillin-nonsusceptible serotype 9V clone 3, firstly identified in Spain and France, has become widely disseminated throughout the world and has been identified in several countries including South America (McGee et al. 2001). Serotype variants of the Spain<sup>9V</sup>-3 clone have been reported in a number of countries, however serotype 14 isolates are the most commonly encountered (Doit et al. 1996, Moissenet et al. 1997). This clone is highly prevalent in Brazil, and was first reported in the country in the mid-90s in children with IPD (Brandileone et al. 1998), and more recently in the nasopharynx of adults with HIV (Nicoletti et al. 2007). We also found that pneumococcal isolates related to Spain<sup>9V</sup>-3 clone presented higher levels of MIC to penicillin, especially  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ . It is probably the clone responsible for the spread of resistance to penicillin in our city, as observed in other places in Latin America (Albarracín et al. 2008).

The relevance of serotype 14 in invasive disease in children from all regions, including Brazil, as well as the clonal characteristic of this serotype, has been well documented (Hausdorff et al. 2000, Ko et al. 2000, Brandileone et al. 2006). In this era of evidence-based microbiology we showed that the NTPn strains share the same genotype as strains harboring type 14 capsule since 10 out of 22 NTPn isolates have type 14 capsule gene locus. We feel those with type 14 capsule gene locus but type as NTPn may not produce capsule. If they do, we believe they produce very little (perhaps less than 100 ng/ml). The implications of these findings on the impact of the vaccination are unclear. Although the NTPn strains do not express the type 14 capsule, whether vaccinated people will be immune to NTPn genotype 14 is an intriguing subject for further investigation. Meanwhile, studies of ancestry are in progress (Multilocus Sequence



Type) and may confirm the consistency of these findings and to ascertain the genetic origin of these strains.

An interesting observation we have made is that many NTPn strains settle down in the culture tubes during the culture where as type 14 isolates do not settle down. In this way, it is possible that capsule production interferes with bacteria precipitation. According to our data we may have two types of nontypeable strains. One is showing evidence for having the capsule gene locus for serotype 14 but also showing evidence for making no capsular polysaccharide of any type (eg typing is negative and culture settles). We have found examples like this phenomenon in the literature. For instance, Waite et al. (2003) reported strains with inactive capsule gene locus of serotype 8. Also, it is possible that some have lost the entire capsule gene locus as some rough strains would. In a recent publication, Hanage et al. (2006) detected a lineage of pneumococci which lost capsule, however preserved their ability to cause disease and spread widely.

In conclusion, epidemiologic and molecular evidences show that pneumococcal serotype 14 circulating in Goiânia are genetically similar to clone Spain<sup>9V</sup>-3 and play a critical role in the spread of PNSp strains to the entire pediatric community of Goiânia. Also, NTPn isolates are genetically similar to carriage and invasive pneumococci expressing capsular type 14. Overall, these findings provide an invaluable baseline data to assess the impact of the pneumococcal vaccination on the molecular epidemiology of the *S. pneumoniae* in the community.

**Potential conflicts of interest** - AL Andrade has received research grant from Wyeth.

**References:**

Albarracín Orio AG, Cortes PR, Tregnaghi M, Piñas GE; Argentinean Network Pneumococcus Study Group, Echenique JR 2008. A new serotype 14 variant of the pneumococcal Spain9V-3 international clone detected in the central region of Argentina. *J Med Microbiol* 57:992-999.

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, e 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, Brandileone MC, Alfieri F, Pagliarini R, Presa J, Gray S, Markowitz J, Rodgers G. Active Epidemiologic Surveillance of Invasive Pneumococcal Disease (IPD) and Chest Radiograph (CXR)- Confirmed Pneumonia (CXR+Pn) in Children in Goiania, Brazil. 2nd Vaccine Congress, December 7-9, 2008, Boston, MA, USA.

Bogaert D, De Groot R, Hermans PW 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4:144-154.

Brandileone MCC, Di Fabio JL, Vieira VSD, 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, de 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, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL 2006. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *J Med Microbiol* 55:567-5674.

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.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S17.

Dagan R, Klugman KP 2008. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 8:785-795.

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.

Franco CM, Andrade ALS 2009, Andrade J G, Silva SA, Oliveira RM, Pimenta F, Lamaro-Cardoso J, Almeida SG, Brandileone MCC. Carriage and risk factors for non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. Submitted.

Greenberg D, Hoffman S, Leibovitz E, Dagan R 2008. Acute otitis media in children: association with day care centers--antibacterial resistance, treatment, and prevention.

*Paediatr Drugs* 10:75-83.

Hanage WP, Kaijalainen T, Saukkoriipi A, Rickcord JL, Spratt BG 2006. A successful, diverse disease-associated lineage of nontypeable pneumococci that has lost the capsular biosynthesis locus. *J Clin Microbiol* 44:743-749.

Hathaway LJ, Stutzmann Meier P, Bättig P, Aebi S, Mühlemann K. 2004. A homologue of aliB is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 186: 3721–3729.

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* 30:100-21.

Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR 2001. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 357: 950–952.

Jacobs M 2003. Worldwide trends in antimicrobial resistance among common respiratory tract pathogens in children. *Pediatric Infect Dis J* 22: S109- S119.

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* 17:279-86.

Klugman K 2007. Clinical impact of antibiotic resistance in respiratory tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 29 Suppl 1:S6-10.

Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lôbo TS, Pinheiro RM, Salgado K, Ribeiro Dourado CM, Tavares-Neto J, Rocha H, Galvão Reis M, Johnson WD Jr, Riley LW 2000. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis* 30:78-86.

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.

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.

McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt B G, Tenover F C, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefèvre J C, Tomasz A and Klugman P 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J Clin Microbiol* 39: 2565–2571.

Moissenet D, Valcin M, Marchand V, Garabédian EN, Geslin P, Garbarg-Chenon A, Vu-Thien H 1997. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibility to penicillin in a Paris children's hospital. *J Clin Microbiol* 35:298-301.

Nicoletti C, Brandileone MC, Guerra ML, Levin AS 2007. Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV-infected adults. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:259-265.

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.

Rey LC, Wolf B, Moreira JL, Verhoef J, Farhat CK 2002. Nasopharyngeal isolates of *S. pneumoniae* from healthy carriers and children with pneumonia: colonization rates and antimicrobial susceptibility. *J Pediatr (Rio J)* 78(2):105-12.

Reis JN, Palma T, Ribeiro GS, Pinheiro RM, Ribeiro CT, Cordeiro SM, da Silva Filho

HP, Moschioni M, Thompson TA, Spratt B, Riley LW, Barocchi MA, Reis MG, Ko AI 2008. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. *J Infect* in press.

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.

Sá-Leão R, Tomasz A, Sanches IS, Brito-Avô A, Vilhelmsson SE, Kristinsson KG, de Lencastre H 2000. Carriage of internationally spread clones of *Streptococcus pneumoniae* with unusual drug resistance patterns in children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *J Infect Dis* 182:1153-1160.

Sá-Leão R, Simões AS, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H 2006. Identification, prevalence and population structure of non-typable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. *Microbiology* 152:367-376.

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.

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* 168:158-63.

Sorensen UBS 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 31: 2097-2100.

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.

Tomasz A, Corso A, Severina EP, Echániz-Aviles G, Brandileone MC, Camou T, Castañeda E, Figueroa O, Rossi A, Di Fabio JL 1998. Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: an overview. PAHO/Rockefeller University Workshop. Pan American Health Organization. *Microb Drug Resist.* Fall;4:195-207.

Waite RD, Penfold DW, Struthers JK, Dowson CG 2003. Spontaneous sequence duplications within capsule genes cap8E and tts control phase variation in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. *Microbiology* 149:497-504.

Wolf B, Rey LC, Brisse S, Moreira LB, Milatovic D, Fler A, Roord JJ, Verhoef J 2000. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 46: 757-765.

World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*. No. 12, 2007, 82, 93–104. Available at <http://www.who.int/wer/2007/wer8212.pdf>. Accessed January 12, 2009.

Yu J, Carvalho Mda G, Beall B, Nahm MH 2008. A rapid pneumococcal serotyping system based on monoclonal antibodies and PCR. *J Med Microbiol* 57:171-178.

Table 1. Characterization and origin of the penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates submitted to genetic analysis

Variables	Pneumococcal nasopharyngeal carriage isolates	Pneumococcal invasive isolates
Study design for obtaining strains	Period prevalence <sup>a</sup>	Active population-based surveillance <sup>b</sup>
Study period	August to December, 2005	May 2007 to December 2008
Study population	Health children attending 62 DCC <sup>c</sup>	Children with suspicion of IPD <sup>d</sup> attending 33 ER <sup>e</sup>
Age-group	3-59 months	28 days up to 36 months
Population-at-risk	3,720 day-care attendees	Cohort of 52,998 children ≤36 months
PNSp <sup>f</sup> /pneumococcal isolates	178 / 648	23 / 46
Serotype 14 / no. of serotyped	88 / 166	19 / 46
Serotype 14 submitted to PFGE <sup>g</sup> / no. of serotyped	84 / 88	17 / 19
Nontypeable submitted to PFGE <sup>g</sup> / nontypeable	22 / 23	-
MIC to penicillin - median (variance)	1.00 <sup>h</sup> (1.028)	2.00 <sup>h</sup> (1.901)
Total pneumococcal strains submitted to PFGE <sup>g</sup>	106	17

<sup>a</sup> Franco et al, 2009

<sup>b</sup> Andrade et al, 2008

<sup>c</sup> Day-care centers

<sup>d</sup> Invasive pneumococcal disease

<sup>e</sup> Emergency rooms

<sup>f</sup> Penicillin nonsusceptible pneumococcal

<sup>g</sup> Pulsed-field gel eletrophoresis

<sup>h</sup> Kruskal Wallis, p value = 0.033



Table 2. Characteristics and genetic similarity by PFGE<sup>a</sup> of pneumococcal clusters according to carriage and invasive strains and capsular type.

Clusters	No. of grouped pneumococcal strains (N=105)	Serotype 14		NTPn <sup>b</sup> carriage (N=20)	% of genetic similarity	Tenover classification <sup>c</sup>
		Carriage (N=72)	Invasive (N=13)			
1	34	26	8	-	82.7	A-A16; Spain <sup>9V</sup> -3
2	25	20	3	2	84.9	B-B5
3	18	3	-	15	82.3	C-C10
4	5	5	-	-	80.0	D-D2
5	4	4	-	-	94.7	E-E1
6	4	4	-	-	80.1	F-F3
7	3	-	-	3	80.0	H-H1
8	3	3	-	-	84.1	I-I2
9	3	3	-	-	87.0	G-G1
10	3	1	2	-	82.6	S-S1
11	3	3	-	-	83.1	X-X2

<sup>a</sup> pulsed field gel electrophoresis

<sup>b</sup> NTPn = non(sero)typeable pneumococcal

<sup>c</sup> Tenover et al. 1995

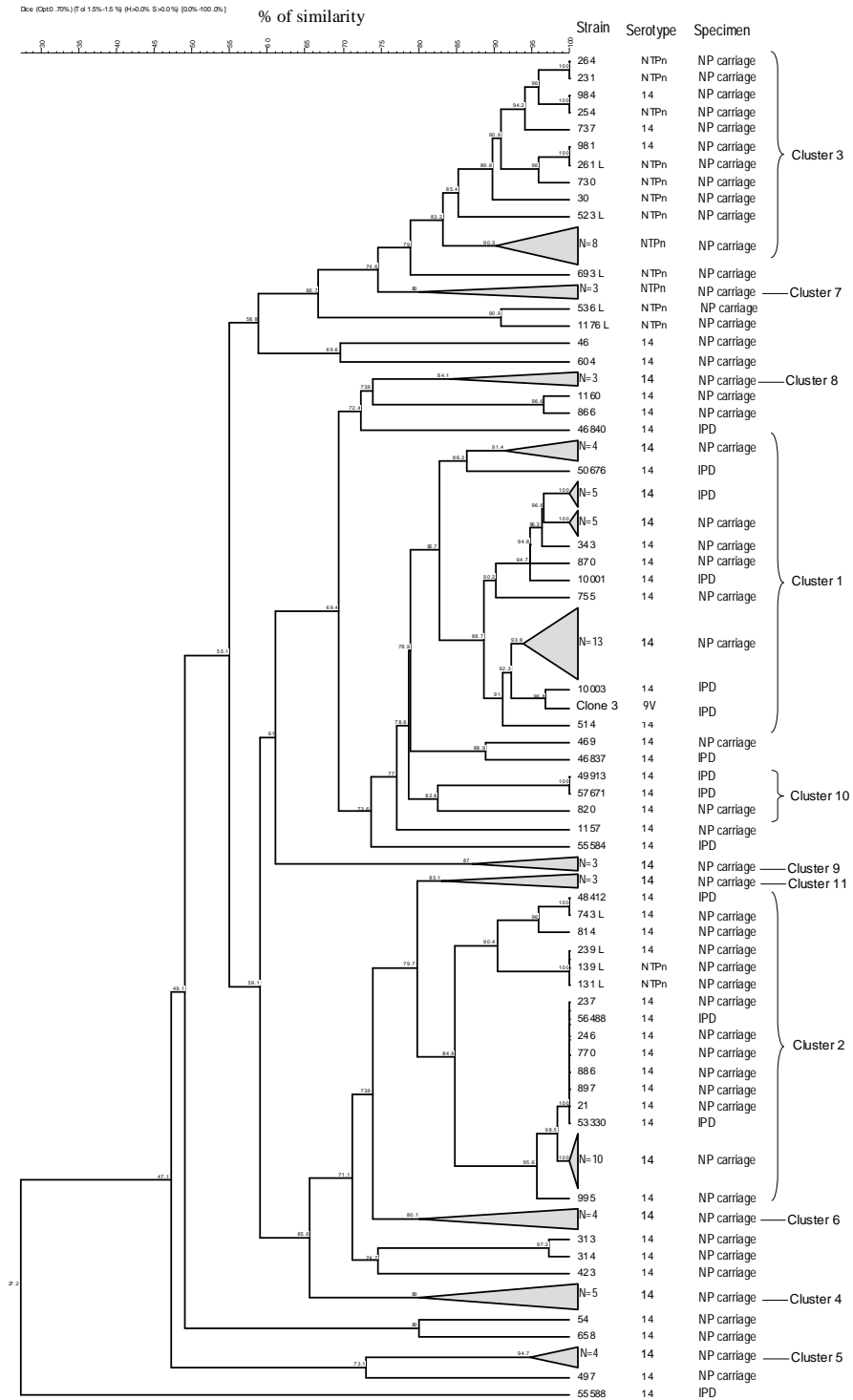


Figure 1. Dendrogram depicting the genetic relatedness among 101 penicillin nonsusceptible serotype 14 from carriage and invasive *S. pneumoniae* strains and 22 non(sero)typeable isolates. NTPn = non(sero)typeable isolates; NP= nasopharyngeal; IPD= invasive pneumococcal disease. The cluster was defined as  $\geq 3$  similar pneumococcal strains ( $\geq 80\%$ ). Each triangle concatenates similar serotypes grouped as cluster. Clone 3= International Spain<sup>9v</sup>-3 clone as described at the PMEN network (<http://www.sph.emory.edu/PMEN/>).

Dice (Opt:0.70%) (Tol 1.5%-1.5%) (H&gt;0.0% S&gt;0.0%) [0.0%-100.0%]

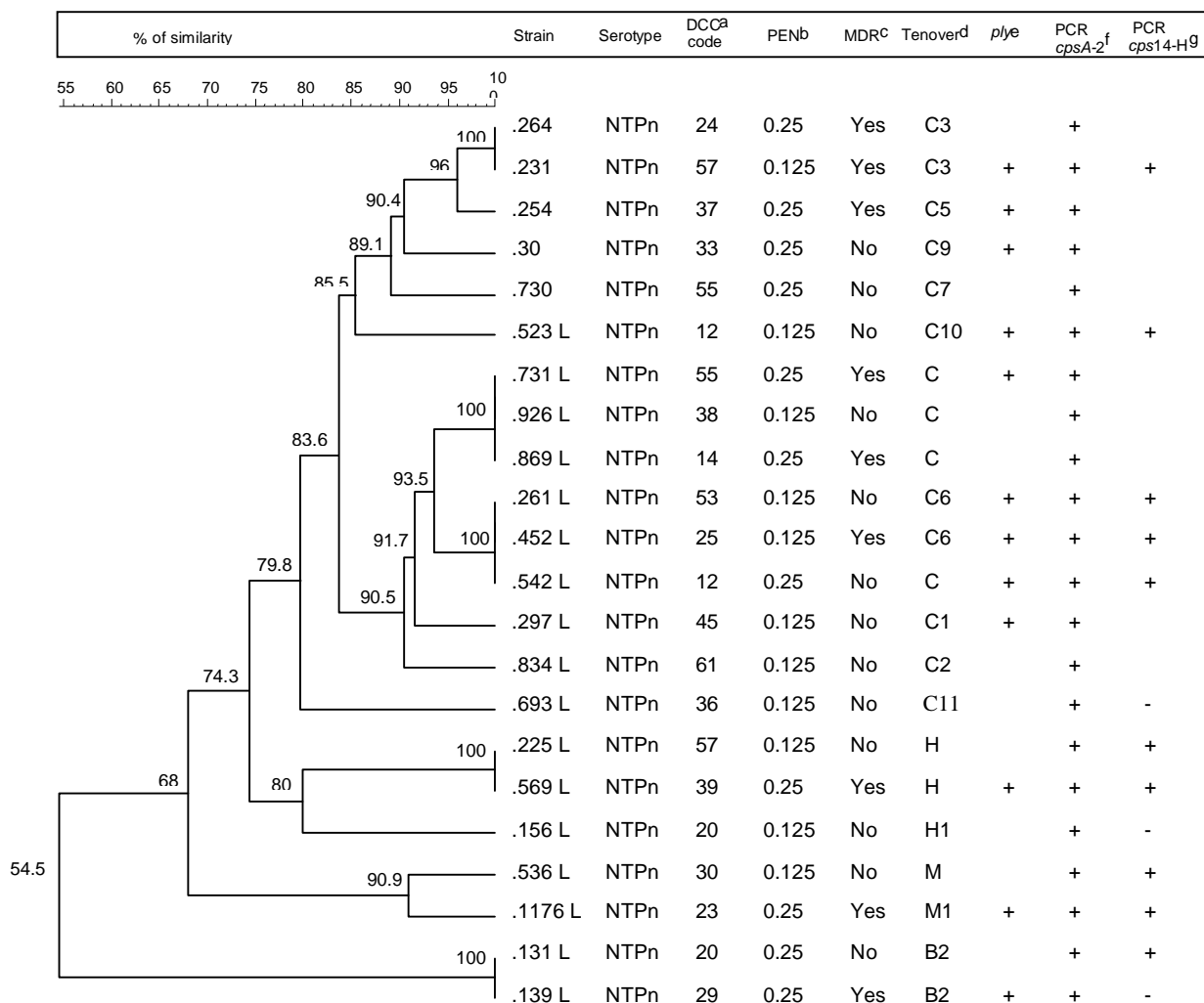


Figure 2. Dendrogram of the genetic relatedness of 22 nontypeable penicillin-nonsusceptible *S. pneumoniae* from carriage isolates. <sup>a</sup>DCC= day-care centers; <sup>b</sup>PEN= penicillin minimum inhibitory concentration; <sup>c</sup>MDR=multidrug resistance ( $\geq 2$  antimicrobial classes in addition to resistance to PEN); <sup>d</sup>Tenover et al, 1995; <sup>e</sup>ply=pneumolysin; <sup>f</sup>cpsA-2=pneumococcal capsule gene locus; <sup>g</sup>cps14H-2 = serotype 14 capsule gene locus. NTPn=nontypeable isolate.

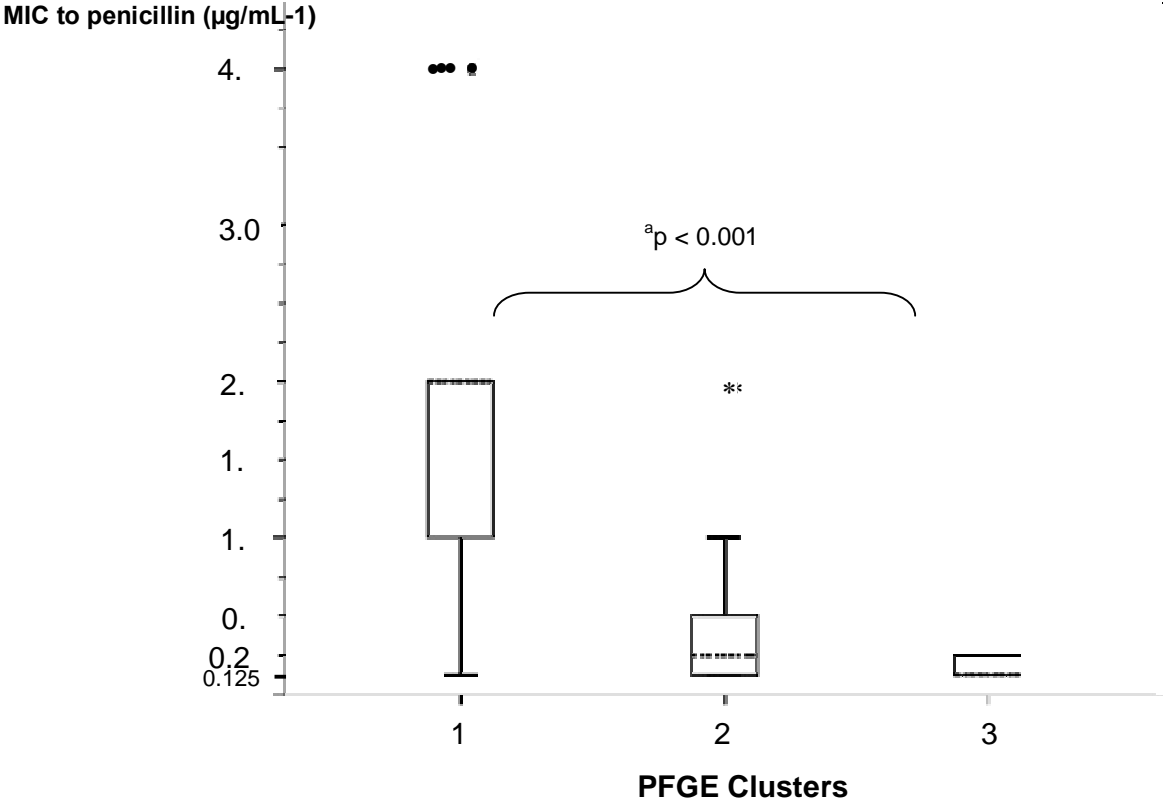


Figure 3. Box-plot of minimum inhibitory concentration (MIC µg/mL-1) to penicillin for *S. pneumoniae* clusters detected by the dendrogram of the genetic similarity of serotype 14 and non(sero)typeable strains. The box represents the interquartile range (75 to 25 percentile). Horizontal lines that cross the boxes indicate median values of the MIC distribution. Central vertical lines (whiskers) that extend from the boxes to the highest and lowest rates indicate the 95% and 5% of the MIC distribution, respectively. The circles are “outliers”, values between 1.5 and 3.0 box lengths from the top or bottom of the box. The asterisks are “extremes” values more than 3 box lengths distant. <sup>a</sup>Kruskal-Wallis test,  $p < 0.001$ . Clusters 1, 2 and 3 represent the Tenover classification displayed in Table 2.

## 8. LIMITAÇÕES

Algumas limitações deste trabalho devem ser mencionadas. A amostragem de NP foi realizada de agosto a dezembro, cobrindo o inverno e a primavera. Entretanto, não foi realizada a amostragem de maio a julho, período de outono, em que o isolamento de pneumococos costuma ser alto como bem documentado em trabalho prévio (Laval et al. 2006). Isso pode ter subestimado a taxa de colonização ou a prevalência de SpNP. Ademais, a sorotipagem foi realizada em apenas um isolado por placa, portanto impossibilitando a detecção de portadores de múltiplos sorotipos. A detecção de sorotipos pneumocócicos múltiplos pode ocorrer em até 12%, dependendo da metodologia aplicada (O'Brien & Nohynek 2003, Bogaert et al. 2004a, Bronsdon et al. 2004).

O estudo foi conduzido utilizando a PFGE, que apresentou evidências epidemiológicas e moleculares da relação genética entre as cepas de *Streptococcus pneumoniae* circulantes no município de Goiânia e o clone Spain<sup>9V</sup>-3. Sabe-se que o uso de uma técnica de tipagem molecular adicional como o MLST (*Multilocus Sequence Typing*), poderia tornar mais robusta as comparações entre os perfis genéticos dos isolados de *S. pneumoniae* (Nichol et al. 2008), assim como poderia avançar no entendimento do parentesco genético entre as cepas. Estudos utilizando outras técnicas moleculares estão em andamento e farão parte de publicações futuras.

## 9. CONCLUSÕES

### 1º. Artigo

- O sorotipo 14, não suscetível, predomina em crianças portadoras de pneumococo que frequentam creches em Goiânia.
- A prevalência de pneumococos não tipáveis detectada é alta entre as crianças portadoras que frequentam creche.
- Crianças que frequentam creches, e que apresentam otite média recorrente, podem exercer papel importante na disseminação de pneumococos não suscetíveis na comunidade.
- As vacinas 7-valente, 10-valente e 13-valente cobrem respectivamente 55,2%, 55,9% e 65,1% dos sorotipos de pneumococos encontrados em crianças que frequentam creches.

### 2º. Artigo

- O sorotipo 14 não suscetível à penicilina, isolado de crianças portadoras de pneumococo que frequentam creches, apresenta grande diversidade em seu perfil genotípico.
- As cepas de portadores de pneumococo, apresentam genótipos similares aos das cepas que causam, atualmente, doença pneumocócica invasiva na comunidade pediátrica de Goiânia.
- As cepas com valores de CIM  $\geq 2\mu\text{g/ml}$  estão associadas ao clone Spain<sup>9V</sup>-3.

- Sólidas evidências epidemiológicas e moleculares revelam que a principal linhagem de *S. pneumoniae* circulantes no município pertence ao clone Spain<sup>9V</sup>-3, responsável pela disseminação da resistência do pneumococo em Goiânia.
- Evidências genéticas apóiam os achados de que cepas de pneumococo não tipáveis assemelham-se ao genótipo das cepas do sorotipo 14.



## 10. REFERÊNCIAS

- 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, Pimenta FC, Laval CA, de Andrade JG, Guerra ML, Brandileone MC 2004. Invasive pneumococcal infection in a healthy infant caused by two different serotypes. *J Clin Microbiol* 42: 2345-2346.
- Andrade AL, de Andrade JG, Martelli CM, e Silva SA, de Oliveira RM, Costa MS, Laval CB, Ribeiro LH, Di Fabio JL 2004a. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine on childhood pneumonia: a case-control study in Brazil. *Int J Epidemiol* 33: 173-181.
- Appelbaum PC 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis* 15(1):77-83.
- Baquero F 1995. Pneumococcal resistance to beta-lactam antibiotics: a global geographic overview. *Microb Drug Resist* 1: 115-120.
- Baquero F 1999. Evolving resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*: a link with long-acting macrolide consumption? *J Chemother* 11 Suppl 1:35-43.
- Bayraktar MR, Durmaz B, Kalcioglu MT, Durmaz R, Cizmeci Z, Aktas E 2005. Nasopharyngeal carriage, antimicrobial susceptibility, serotype distribution and clonal relatedness of *Streptococcus pneumoniae* isolates in healthy children in Malatya, Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 26: 241-246.
- Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail M A, Samuel G, Skovsted I C, Kalltoft M S, Barrell Bt, Reeves P R, Parkhill J, Spratt B G 2006. Genetic analysis of the

- capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2:e31.
- Berezin EN, Cardenuto MD, Ferreira LL, Otsuka M, Guerra ML, Brandileone MC 2007. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 26:643-645.
- Berrón S, Fenoll A, Ortega M, Arellano N, Casal J 2005. Analysis of the genetic structure of nontypeable pneumococcal strains isolated from conjunctiva. *J Clin Microbiol* 43:1694-1698.
- Black SB, Shinefield HR, Hansen J, Elvin L, Laufer D, Malinoski F 2001. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 20:1105-1107.
- Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, Tyler R, Smith A, Findlay R, Keegan E 2004. Community-wide vaccination with the heptavalent pneumococcal conjugate significantly alters the microbiology of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 23:829-833.
- 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, Ha NT, Sluijter M, Lemmens N, De Groot R, Hermans PW 2002. Molecular epidemiology of pneumococcal carriage among children with upper respiratory tract infections in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 40: 3903-3908.
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PW 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4: 144-154.
- Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rümke HC, Verbrugh HA, Hermans PW 2004a. Colonization by *Streptococcus pneumoniae* and

- Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 363:1871-1872.
- 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. *Microbial Drug Resistance* 4:209-217.
- Brandileone MC, de 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.
- Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, de Andrade AL, Di Fabio JL 2005. Increase in penicillin resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil after 1999. *J Antimicrob Chemother* 56:437-439.
- Brandileone MCC, Casagrande ST, Guerra MLLS, Zanella RC, Andrade ALSS and Di Fabio JL 2006. Increase in numbers of b-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *Journal of Medical Microbiology* 55: 567–574.
- Bronsdon MA, O'Brien KL, Facklam RR, Whitney CG, Schwartz B, Carlone GM 2004. Immunoblot method to detect *Streptococcus pneumoniae* and identify multiple serotypes from nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol* 42:1596-600.
- 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, Spratt BG 2003. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol* 41: 4966–4970.
- Buck JM, Lexau C, Shapiro M, Glennen A, Boxrud DJ, Koziol B, Whitney CG, Beall B, Danila R, Lynfield R 2006. A community outbreak of conjunctivitis caused by

- nontypeable *Streptococcus pneumoniae* in Minnesota. *Pediatr Infect Dis J* 25:906-911.
- Cardoso VC, Cervi MC, Cintra OA, Salathiel AS, Gomes AC 2006. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr (Rio J)* 82:51-57.
- Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H, Almeida JS 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 43:5483-5490.
- Carroll KC 2002. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. *J Clin Microbiol* 40:3115-3120.
- Carvalho MG, Steigerwalt AG, Thompson T, Jackson D, Facklam RR 2003. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 41(9):4415-4417.
- CDC 2000. Centers for Disease Control & Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb Mortal Wkly Rep* 49, 1–35.
- CDC 2002. Centers for Disease Control & Prevention. Outbreak of bacterial conjunctivitis at a college – New Hampshire, January–March, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 51, 205–207.
- CDC 2003. Centers for Disease Control & Prevention. Pneumococcal conjunctivitis at an elementary school – Maine, September 20–December 6, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 52, 64–66.
- Chiou AC, Andrade SS, Almeida SC, Zanella RC, Andrade AL, Brandileone MC 2008.

- Molecular assessment of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in Brazil: evidence of clonal replacement. *J Med Microbiol* 57:839-844.
- CLSI 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S17.
- 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.
- Corso A, Severina EP, Petruk VF, Mauriz YR, Tomasz A 1998. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microb Drug Resist* 4:325-337.
- 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.
- Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Yagupsky P 1996. Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J Infect Dis* 174:1352-1355.
- 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, Jacobs MR, Greenberg D. Pneumococcal infections 2004. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan S, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. 5th ed. Vol. 1. Philadelphia: Saunders:1204-1258.

- Dagan R, O'Brien KL 2005. Modeling the association between pneumococcal carriage and child-care center attendance. *Clin Infect Dis* 40:1223-1226.
- De Lencastre H, Kristinsson KG, Brito-Avô A, Sanches IS, Sá-Leão R, Saldanha J, Sigvaldadottir E, Karlsson S, Oliveira D, Mato R, Aires de Sousa M, Tomasz A 1999. Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *Microb Drug Resist* 5: 19-29.
- de Lencastre H & Tomasz A 2002. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, Suppl. S2, 75-81.
- Deibel RH, Seeley JR HW. Family II: Streptococcaceae 1974. In: Buchanan RE & Gibbons NE, (ed). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, p. 490-517.
- Dejsirilert S, Overweg K, Sluijter M, Saengsuk L, Gratten M, Ezaki T, Hermans PW 1999. Nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children with acute respiratory tract infections in Thailand: a molecular epidemiological survey. *J Clin Microbiol* 37:1832-1838.
- 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.
- Dias R, Caniça M 2004. Emergence of invasive erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in Portugal: contribution and phylogenetic relatedness of serotype 14. *J Antimicrob Chemother* 54:1035-1039.

- Dias R, Caniça M 2007. Invasive pneumococcal disease in Portugal prior to and after the introduction of pneumococcal heptavalent conjugate vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:35-42.
- Dice LR 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26:297-302.
- 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, Anttila M 1999. Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 18:543-551.
- Facklam RR, Washington JA II. 1991. *Streptococcus* and related catalase-negative Gram positive cocci, p. 238-257. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Hermann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- FDA 2000. Food and Drug Administration. First pneumococcal vaccine approved for infants and toddlers. Disponível em <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00716.html> Acessado em 07 de setembro de 2008.
- Fedson DS, Musher DM, Eskola J 1999. Pneumococcal vaccine. In: Plotkin AS, Orestein WA. *Vaccines* 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia Saunders. p.553-608.
- 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.
- Finney, M 1993. Pulsed-field gel electrophoresis, p. 2.5.9–2.5.17. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. Current Protocols, Greene-Wiley, New York.
- Fonseca PB, Braga JA, Machado AM, Brandileone MC, Farhat CK 2005. Nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease receiving prophylactic penicillin. *J Pediatr (Rio J)*. 81:149-1454.
- Frazão 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.
- Friedman CR, Whitney CG 2008. It's time for a change in practice: reducing antibiotic use can alter antibiotic resistance. *J Infect Dis* 197:1082-1083.
- Fuchs SC, Fischer GB, Black RE, Lanata C 2005. The burden of pneumonia in children in Latin America. *Paediatr Respir Rev* 6:83-87.
- Gamboa L, Camou T, Hortal M, Castañeda E; Sireva-Vigía Working Group 2002. Dissemination of *Streptococcus pneumoniae* clone Colombia<sup>5</sup>-19 in Latin America. *J Clin Microbiol* 40:3942-3950.
- Gertz RE Jr, McEllistrem MC, Boxrud DJ, Li Z, Sakota V, Thompson TA, Facklam RR, Besser JM, Harrison LH, Whitney CG, Beall B 2003. Clonal distribution of invasive pneumococcal isolates from children and selected adults in the United States prior to 7-valent conjugate vaccine introduction. *J Clin Microbiol* 41:4194-4216.



- Ghaffar F, Friedland IR, McCracken Jr GH 1999. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 18:638-644.
- Ghaffar F, Barton T, Lozano J, Muniz LS, Hicks P, Gan V, Ahmad N, McCracken GH Jr. 2004. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. *Clin Infect Dis* 39:930-938.
- Givon-Lavi N, Dagan R, Fraser D, Yagupsky P, Porat N 1999. Marked differences in pneumococcal carriage and resistance patterns between day care centers located within a small area. *Clin Infect Dis* 29:1274-1280.
- 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.
- Granat SM, Mia Z, Ollgren J, Herva E, Das M, Piirainen L, Auranen K, Mäkelä PH 2007. Longitudinal study on pneumococcal carriage during the first year of life in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 26:319-324.
- Gratten M, Gratten H, Poli A, Carrad E, Raymer M, Koki G 1986. Colonization of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of neonates in Papua New Guinea: primary acquisition, duration of carriage, and relationship to carriage in mothers. *Biol Neonate* 50:114-120.
- Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr 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, Hoffman S, Leibovitz E, Dagan R 2008. Acute otitis media in children: association with day care centers--antibacterial resistance, treatment, and prevention. *Paediatr Drugs* 10:75-83.

- Hall LM 1998. Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol* 51: 270-274.
- Hanage WP, Kaijalainen T, Herva E, Saukkoriipi A, Syrjänen R, Spratt BG 2005. Using multilocus sequence data to define the pneumococcus. *J Bacteriol* 187:6223-6230.
- Hanage WP, Huang SS, Lipsitch M, Bishop CJ, Godoy D, Pelton SI, Goldstein R, Huot H, Finkelstein JA 2007. Diversity and antibiotic resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates in the post-heptavalent conjugate vaccine era. *J Infect Dis*. 195:347–352.
- 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 1. *Clin Infect Dis* 30:100–121.
- 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.
- Hennessy TW, Singleton RJ, Bulkow LR, Bruden DL, Hurlburt DA, Parks D, Moore M, Parkinson AJ, Schuchat A, Butler JC 2005. Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on invasive disease, antimicrobial resistance and colonization in Alaska Natives: progress towards elimination of a health disparity. *Vaccine* 23:5464- 5473.
- Henrichsen J 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 33: 2759-2762.
- Henriques Normark B, Christensson B, Sandgren A, Noreen B, Sylvan S, Burman LG,

- Olsson-Liljequist B 2003. Clonal analysis of *Streptococcus pneumoniae* nonsusceptible to penicillin at day-care centers with index cases, in a region with low incidence of resistance: emergence of an invasive type 35B clone among carriers. *Microb Drug Resist.* 9:337-344.
- 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.
- Hill P C, Akisanya A, Sankareh K, Cheung Y B, Saaka M, Lahai G, Greenwood B M and Adegbola R A 2006. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian Villagers. *Clinical Infectious Diseases* 43:673–679.
- Hill PC, Cheung YB, Akisanya A, Sankareh K, Lahai G, Greenwood BM, Adegbola RA 2008. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian infants: a longitudinal study. *Clin Infect Dis* 46:807-814.
- Hjaltested EK, Bernatoniene J, Erlendsdottir H, Kaltenis P, Bernatoniene G, Gudnason T, Haraldsson A, Kristinsson KG 2003. Resistance in respiratory tract pathogens and antimicrobial use in Icelandic and Lithuanian children. *Scand J Infect Dis* 35:21-26.
- Hosmer DW & Lemeshow S 2000. Applied Logistic Regression. 2ND ed. Wiley, John & Sons, Incorporated. 672 pp.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L 2007. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 357:1018-1027.
- Huang SS, Finkelstein JA, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Platt R 2004. Community-level predictors of pneumococcal carriage and resistance in young children. *Am J Epidemiol* 159:645–654.

- Huang SS, Platt R, Rifas-Shiman SL, Pelton SI, Goldmann D, Finkelstein JÁ 2005. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. *Pediatrics* 116:e408–e413.
- IBGE 2002. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Base de informações por setor censitário. Censo 2000 – Resultados do Universo, Goiás – Goiânia [CD-ROM]. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002.
- 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
- Jacobs M 2003. Worldwide trends in antimicrobial resistance among common respiratory tract pathogens in children. *Pediatric Infect Dis J* 22: S109- S119.
- Kaleida PH, Nativio DG, Chao HP, Cowden SN 1993. Prevalence of bacterial respiratory pathogens in the nasopharynx in breast-fed versus formulafed infants. *J Clin Microbiol* 31:2674–8.
- 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.
- Katherine KH, Shea KM, Stevenson AE, Pelton SI 2008. Non-Vaccine Serotype Pneumococcal Disease in Massachusetts: 2001–2007. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Reykjavik, Iceland. P1-057.
- 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.

- Klugman KP, Coffey TJ, Smith A, Wasas A, Meyers M, Spratt BG 1994. Cluster of an erythromycin-resistant variant of the Spanish multiply resistant 23F clone of *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:171-174.
- Klugman K P & Koornhof H J 1988. Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979–1986. *J Infect Dis* 158: 959–964.
- Klugman KP 2002. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 50: 1–5.
- Klugman KP, Low DE, Metlay J, Pechere JC, Weiss K 2004. Community-acquired pneumonia: new management strategies for evolving pathogens and antimicrobial susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents* 24:411-422.
- Klugman K 2007. Clinical impact of antibiotic resistance in respiratory tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 29 Suppl 1:S6-10.
- Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lôbo TS, Pinheiro RM, Salgado K, Ribeiro Dourado CM, Tavares-Neto J, Rocha H, Galvão Reis M, Johnson WD Jr, Riley LW 2000. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis* 30:78-86.
- Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, Thomas AR, Harrison LH, Bennett NM, Farley MM, Facklam RR, Jorgensen JH, Besser J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG 2006. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 354:1455-1463.
- 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.
- Lauderdale TL, Lee WY, Cheng MF, Huang IF, Lin YC, Hseih KS, Huang IW, Chiou CC 2005. High carriage rate of high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a Taiwan kindergarten associated with a case of pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis* 5:96.
- 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.
- 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.
- Leimkugel J, Adams Forgor A, Gagneux S, Pflüger V, Flierl C, Awine E, Naegeli M, Dangy JP, Smith T, Hodgson A, Pluschke G 2005. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. *J Infect Dis* 192:192-199.
- Lipsitch M, O'Neill K, Cordy D, Bugalter B, Trzcinski K, Thompson CM, Goldstein R, Pelton S, Huot H, Bouchet V, Reid R, Santosham M, O'Brien KL 2007. Strain characteristics of *Streptococcus pneumoniae* carriage and invasive disease isolates during a cluster-randomized clinical trial of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *J Infect Dis* 196: 1221-1227.
- 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.
- 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.
- Madhi SA, Klugman KP; Vaccine Trialist Group 2004. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med* 10:811-813.
- Marchese A & Schito GC 2007. Recent findings from multinational resistance surveys: are we 'PROTEKTeD' from resistance? *Int J Antimicrob Agents* 29 Suppl 1:S2-5.
- Mato R, Sanches IS, Simas C, Nunes S, Carriço JA, Sousa NG, Frazão N, Saldanha J, Brito-Avô A, Almeida JS, Lencastre HD 2005. Natural history of drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* colonizing healthy children in Portugal. *Microb Drug Resist* 11:309-322.
- 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.
- 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.
- McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt B G, Tenover F C, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefèvre J C, Tomasz A and Klugman P 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J Clin Microbiol* 39: 2565–2571.

- McGee L, Wang H, Wasas A, Huebner R, Chen M, Klugman KP 2001a. Prevalence of serotypes and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children in Beijing, China: identification of two novel multiply-resistant clones. *Microb Drug Resist* 7:55-63.
- Medeiros MI, Neme SN, da Silva P, Silva JO, Carneiro AM, Carloni MC, Brandileone MC 1998. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* as etiological agents of conjunctivitis outbreaks in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40:7-9.
- Mendonça-Souza CR, Carvalho Mda G, Barros RR, Dias CA, Sampaio JL, Castro AC, Facklam RR, Teixeira LM 2004. Occurrence and Characteristics of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated in Three Major Brazilian States. *Microb Drug Resist* 10:313-320.
- Ministério da Saúde do Brasil. Datasus 2005. Secretaria Executiva. Informações em Saúde. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/popgo.def> Acessado em 18 de junho de 2008.
- Ministério da Saúde do Brasil 2006. Manual dos Centros de Referência para imunobiológicos Especiais. Organizado pela Coordenação de Imunizações e Auto-Suficiência em Imunobiológicos - Brasília: Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância à Saúde, Programa Nacional de Imunizações 2005. Brasília/DF. 150p.
- 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.
- Moore MR, Whitney CG 2008. Emergence of Nonvaccine Serotypes following Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine: Cause and Effect? *Clinical Infectious Diseases* 46:183-185.



- Moore MR, Gertz RE Jr, Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C, Gershman K, Reingold A, Farley M, Harrison LH, Hadler JL, Bennett NM, Thomas AR, McGee L, Pilishvili T, Brueggemann AB, Whitney CG, Jorgensen JH, Beall B 2008. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis* 197:1016-1027.
- 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.
- 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.
- Mulholland K 2003. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatr Pulmonol* 36:469-474.
- Munoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J, Hakenbeck R, Jacobs M, Musser JM, Spratt BG, Tomasz A 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Infectious Diseases* 164, 302–306.
- Munoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia JJ, Pallares R 2008. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 46:174–182.
- Nichol KA, Adam HJ, Karlowsky JA, Zhanel GG, Hoban DJ 2008. Increasing genetic relatedness of ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in Canada from 1997 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1190-1194.
- Nicoletti C, Brandileone MC, Guerra ML, Levin AS 2007. Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV-infected adults. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:259-265.

- 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.
- Nunes S, Sá-Leão R, Carriço J, Alves CR, Mato R, Avô AB, Saldanha J, Almeida JS, Sanches IS, de Lencastre H 2005. Trends in drug resistance, serotypes, and molecular types of *Streptococcus pneumoniae* colonizing preschool-age children attending day care centers in Lisbon, Portugal: a summary of 4 years of annual surveillance. *J Clin Microbiol* 43:1285-1293.
- Nunes S, Sá-Leão R, Pereira L C, de Lencastre H 2008. Emergence of a serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* lineage colonising healthy children in Portugal in the seven-valent conjugate vaccination era. *Clin Microbiol Infect* 14:82–84.
- 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.
- Okeke I N, Klugman K P, Bhutta Z A, Duse A G, Jenkins P, O'Brien T, Pablos-Mendez A & Laxminarayan R 2005. Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment. *Lancet* 5:568–580.
- Okeke I N, Laxminarayan R, Bhutta Z A, Duse A G, Jenkins P, O'Brien T F, Pablos-Mendez A & Klugman K P 2005a. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet* 5:481–493.

- Pai R, Moore MR, Pilishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B 2005. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis* 192:1988–1995.
- Park S Y, Moore M R, Bruden D L, Hyde T B, Reasonover A L, Harker-Jones M, Rudolph K M, Hurlburt D A, Parks D J, Parkinson A J, Schuchat A, and Hennessy T W 2008. Impact of Conjugate Vaccine on Transmission of Antimicrobial-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Among Alaskan Children. *Pediatr Infect Dis J* 27: 335–340.
- 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.
- Pelton SI, Loughlin A, Marchant C 2004. Seven valent pneumococcal conjugate vaccine immunization in two Boston communities: changes in serotypes and antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Pediatr Infect Dis J* 23:1015–1022.
- Pelton S I, Heather Huot MA, Finkelstein J A, Bishop C J, Hsu K K, Joan Kellenberg, MPH, Huang S S, Goldstein R, Hanage W P 2007. Emergence of 19A as Virulent and Multidrug Resistant Pneumococcus in Massachusetts Following Universal Immunization of Infants With Pneumococcal Conjugate. *Pediatr Infect Dis J* 26: 468–472.
- 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.

- Perez-Trallero E, Marimón J M, Montes M, Orden B, Pablos M 1999. Clonal Differences among Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Emerg Infect Dis* 5:235-240.
- Petrosillo N, Pantosti A, Bordi E, Spanó 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.
- Pettigrew MM, Fennie KP, York MP, Daniels J, Ghaffar F 2006. Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. *Infect Immun* 74: 3360-3365.
- 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.
- PMEN. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. Disponível em <http://www.sph.emory.edu/PMEN> . Acessado em 01 de setembro de 2008.
- PneumoADIP- Diseases & Vaccines 2008. Disponível em <http://www.preventpneumo.org/diseases/> Acessado em 18 de agosto de 2008.
- Porat N, Greenberg D, Givon-Lavi N, Shuval DS, Trefler R, Segev O, Hanage WP, Dagan R 2006. The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis* 1;194:689-696.
- Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ 2005. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol* 43:1294-1300.
- Reis JN, Palma T, Ribeiro GS, Pinheiro RM, Ribeiro CT, Cordeiro SM, da Silva Filho HP, Moschioni M, Thompson TA, Spratt B, Riley LW, Barocchi MA, Reis MG,

- Ko AI 2008. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. *J Infect* 57:204-213.
- Revai K, McCormick DP, Patel J, Grady JJ, Saeed K, Chonmaitree T 2006. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization during acute otitis media. *Pediatrics* 117:1823-1829.
- Rey LC, Wolf B, Moreira JL, Verhoef J, Farhat CK 2002. Nasopharyngeal isolates of *S. pneumoniae* from healthy carriers and children with pneumonia: colonization rates and antimicrobial susceptibility. *J Pediatr (Rio J)* 78(2):105-12.
- Rey LC, Wolf B, Moreira JL, Milatovic D, Verhoef J, Farhat CK 2002a. 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(2):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.
- Richter SS, Heilmann KP, Coffman SL, Huynh HK, Brueggemann AB, Pfaller MA, Doern GV 2002. The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. *Clin Infect Dis* 34:330-339.
- Rivera-Olivero IA, Bogaert D, Bello T, del Nogal B, Sluijter M, Hermans PW, de Waard JH 2007. Pneumococcal carriage among indigenous Warao children in Venezuela: serotypes, susceptibility patterns, and molecular epidemiology. *Clin Infect Dis* 45:1427-1434.
- 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.

- Robinson DA, Briles DE, Crain MJ, Hollingshead SK 2002. Evolution and virulence of serogroup 6 pneumococci on a global scale. *J Bacteriol* 184: 6367-6375.
- 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.
- Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA 1995. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med* 15: 407.
- Sá-Leão R, Tomasz A, Sanches IS, Nunes S, Alves CR, Avô AB, Saldanha J, Kristinsson KG, de Lencastre H 2000. Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centers as autonomous epidemiological units. *J Clin Microbiol.* 38:4137-44.
- Sá-Leão R, Tomasz A, Sanches IS, Brito-Avô A, Vilhelmsson SE, Kristinsson KG, de Lencastre H 2000a. Carriage of internationally spread clones of *Streptococcus pneumoniae* with unusual drug resistance patterns in children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *J Infect Dis* 182:1153-1160.
- Sá-Leão R, Tomasz A, Santos Sanches I, de Lencastre H 2002. Pilot study of the genetic diversity of the pneumococcal nasopharyngeal flora among children attending day care centers. *J Clin Microbiol* 40: 3577-3585.
- Sá-Leão R, Simões AS, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H 2006. Identification, prevalence and population structure of non-typable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. *Microbiology* 152:367-376.
- Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Alves CR, Carriço JA, Saldanha J, Almeida JS, Santos-Sanches I, de Lencastre H 2008. High rates of transmission of and

- colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. *J Clin Microbiol* 46:225-234.
- Samore MH, Magill MK, Alder SC, Severina E, Morrison-De Boer L, Lyon JL, Carroll K, Leary J, Stone MB, Bradford D, Reading J, Tomasz A, Sande MA 2001. High rates of multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* from healthy children living in isolated rural communities: association with cephalosporin use and intrafamilial transmission. *Pediatrics* 108:856-865.
- Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Tarragó D, Lirola MJ, Porrás A, Fenoll A, Hausdorff WP, Brueggemann AB, Obando I 2008. Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of nasopharyngeal pneumococci from Spanish children. *Clin Microbiol Infect* 14:797-801.
- Sandgren A, Sjöstrom K, Olsson-Liljequist B, Christensson B, Samuelsson A, Kronvall G, Henriques Normark B 2004. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 189:785-96.
- Sankareh K, Antonio M, Sealy T, Adegbola RA. Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* in The Gambia [Abstract P2-010, page 192]. In: 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Reykjavik, Iceland, 8 to 12 June, 2008.
- Schrag SJ, Peña C, Fernández J, Sánchez J, Gómez V, Pérez E, Feris JM, Besser RE 2001. Effect of short-course, high-dose amoxicillin therapy on resistant pneumococcal carriage: a randomized trial. *JAMA* 286:49-56.
- Scott J, Millar E, Perilla M, Weatherholtz R, Reid R, Santosham M, Jackson D, Whitney C, Beall B, O'Brien K 2008. Relative invasiveness of pneumococcal serotypes in Native American children less than five years old. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Reykjavik, Iceland. P1-099.
- Setchanova L & Tomasz A 1999. Molecular characterization of penicillin-resistant

- Streptococcus pneumoniae* isolates from Bulgaria. *J Clin Microbiol* 37:638-648.
- Shayegani M, Parsons LM, Gibbons WE Jr, Campbell D 1982. Characterization of nontypable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of conjunctivitis. *J Clin Microbiol* 16:8-14.
- Shouval DS, Greenberg D, Givon-Lavi N, Porat N, Dagan R 2006. Site-specific disease potential of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes in pediatric invasive disease, acute otitis media and acute conjunctivitis. *Pediatr Infect Dis J* 25:602-607.
- Sneath PHA & Sokal RR 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W.H Freeman. p 573.
- 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* 168:158-63.
- 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.
- Sogstad MK, Høiby EA, Caugant DA 2006. Molecular characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol* 44:3225-3230.
- Sorensen UBS 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 31: 2097-2100.
- Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE Jr 2004. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis* 38:1279-1286.



- Sulikowska A, Grzesiowski P, Sadowy E, Fielt J, Hryniewicz W 2004. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from the nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharynx. *J Clin Microbiol* 42: 3942-3949.
- 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.
- Syrogiannopoulos 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.
- Talarico C, Foxman B, Koopman J, Anh DD, Tho LH, Kilgore P 2008. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* occurs almost exclusively among children and adults living with children in Vietnam. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Reykjavik, Iceland. P1-025.
- Temime L, Guillemot D, Boelle PY 2004. Short- and long-term effects of pneumococcal conjugate vaccination of children on penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2206 –2213.
- 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.
- Tomasz A 2000. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & mechanisms of disease. New York: *Mary Ann Liebert*.
- Tomasz A, Corso A, Severina EP, Echániz-Aviles G, Brandileone MC, Camou T,

- Castañeda E, Figueroa O, Rossi A, Di Fabio JL 1998. Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: an overview. PAHO/Rockefeller University Workshop. Pan American Health Organization. *Microb Drug Resist.* Fall;4:195-207.
- van Kempen MJ, Vaneechoutte M, Claeys G, Verschraegen GL, Vermeiren J, Dhooge IJ. Antibiotic susceptibility of acute otitis media pathogens in otitisprone Belgian children. *Eur J Pediatr.* 2004;163:524-529.
- Vanderkooi OG, Low DE, Green K, Powis JE, McGeer A 2005. Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. Toronto Invasive Bacterial Disease Network. *Clin Infect Dis* 40:1288-1297.
- Vestrheim DF, Høiby EA, Aaberge IS, Caugant DA 2008. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing children attending day-care centers in Norway. *J Clin Microbiol* 46: 2508-2518.
- Vilhjalmsson SE, Tomasz A, Kristinsson KG 2000. Molecular evolution in a multidrug-resistant lineage of *Streptococcus pneumoniae*: emergence of strains belonging to the serotype 6B Icelandic clone that lost antibiotic resistance traits. *J Clin Microbiol* 38:1375-1381.
- Weiser JN, Kapoor M 1999. Effect of intrastrain variation in the amount of capsular polysaccharide on genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*: implications for virulence studies of encapsulated strains. *Infect Immun* 67:3690-3692.
- Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, Broughton K, Woodard G, Sturgeon D, George R, Dowson CG 2000. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun* 68:1374-1382.

- Whitney C G, Farley M M, Hadler J, Harrison L H, Bennett N M, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam R R, Jorgensen J H and Schuchat A 2003. Decline in Invasive Pneumococcal Disease after the Introduction of Protein–Polysaccharide Conjugate Vaccine. *N Engl J Med* 348:1737.
- WHO 1994. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention. 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.
- WHO 2005. World Health Organization. The World Health Report. Make every mother and child count. Disponível em [http://www.who.int/whr/2005/whr2005\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2005/whr2005_en.pdf) Acessado em 18 de agosto de 2008.
- WHO 2007. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*. No. 12, 2007, 82, 93–104. Disponível em <http://www.who.int/wer/2007/wer8212.pdf> Acessado em 22 de julho de 2008.
- Wolf B, Rey LC, Brisse S, Moreira LB, Milatovic D, Fleer A, Roord JJ, Verhoef J 2000. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 46: 757-765.
- Wyth 2006. Press Releases. Disponível em <http://www.wyeth.com.br/br/> Acessado em 07 de setembro de 2008.
- Yaro S, Lourd M, Traoré Y, Njanpop-Lafourcade BM, Sawadogo A, Sangare L, Hien A, Ouedraogo MS, Sanou O, Parent du Châtelet I, Koeck JL, Gessner BD 2006. Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. *Clin Infect Dis* 43: 693–700.

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.







SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
 HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 054/05

Goiânia, 18/07/2005.

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Profª Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade

TÍTULO: "Correlação espacial entre áreas de pneumococos resistentes isolados de nasofaringe e consumo de antibióticos, de crianças residentes no município de Goiânia".

Área Temática: Grupo III

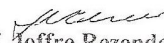
Local de Realização: CMEIs (Centro Municipal de Educação de Goiânia)

Senhor Pesquisador,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal, após a análise das respostas adequadas às solicitações deste CEPMHA/HC/UFG, aprovou sem restrições o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

→ Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

  
 // Prof. Joffre Rezende Filho  
 Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74.605-050 - FONE: 269 83 38 - FAX: 269 84 26

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**





## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contacto com os pesquisadores responsáveis, Dr<sup>a</sup> Cáritas Marquez Franco, telefone 202 7942. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contacto com o Comitê de Ética em Pesquisa do HC/ Universidade Federal de Goiás pelo telefone 2698338 ou 2698426.

### **Informações importantes sobre a pesquisa**

A pesquisa está sendo conduzida pela Universidade Federal de Goiás, sob coordenação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Coletiva em colaboração com as Secretarias de Saúde e de Educação do Município de Goiânia. O objetivo desta pesquisa é identificar se seu filho tem a bactéria pneumococo na região nasal, e se a bactéria é resistente à penicilina. Cerca de 1700 crianças residentes em Goiania com idade entre 2 meses e 2 anos de Goiania e que frequentam creches serão incluídas neste estudo.

#### Forma de participação

Uma amostra da secreção nasal de seu(sua) filho(a) será coletada para verificar a possibilidade de que seja portador(a) de bactérias resistentes à penicilina. Esta coleta será realizada na própria creche pela médica pediatra Dr<sup>a</sup> Cáritas Marquez Franco por meio de uma haste flexível contendo algodão em sua extremidade e introduzida na narina de seu filho. Este procedimento não implicará em risco para seu filho(a) podendo apenas causar pequeno desconforto, tal como tosse e/ou espirro no momento da coleta. Você poderá pleitear indenização em caso de dano decorrente da participação de seu filho(a) na pesquisa. O material coletado será enviado ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. O responsável pela criança deverá responder a um questionário com algumas perguntas sobre ela. Não haverá remuneração pela participação de sua criança. No entanto, os exames clínicos e laboratoriais serão inteiramente gratuitos. A participação de seu filho contribuirá para a identificação de áreas de alta prevalência de pneumococos resistentes. Estas áreas de risco devem ser priorizadas quando da introdução da vacina anti-pneumocócica no programa de imunização. Você pode recusar a participação de seu(a) filho(a) nesta investigação e você não será penalizado(a) ou sofrerá qualquer prejuízo por isso, tanto no atendimento no posto de saúde, quanto na permanência dele(a) na creche. Toda a informação coletada de seu filho será mantida em confidencialidade. Pedimos sua autorização para armazenar o material biológico de seu filho(a) para que possamos aprofundar as investigações utilizando novas tecnologias quando futuramente disponíveis.



### TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu fui informado(a) sobre este estudo, assim como dos procedimentos que implicam na participação de meu(minha) filho(a). Declaro que fui devidamente esclarecido(a) pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso recusar a participação de meu filho ou filha nesta investigação.

Responsável

Parentesco com a criança:

Nome: \_\_\_\_\_

Ass: \_\_\_\_\_

Impressão digital

Médico

Nome: \_\_\_\_\_

Ass: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Goiânia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA/UFG**  
**PORTADOR DE PNEUMOCOCO EM CRECHES**  
**QUESTIONÁRIO**

Etiqueta C..../05  
QUEST

**Preencher somente para crianças ELEGÍVEIS**

<p>1. Nome da creche: _____</p> <p>2. Número/Nome da sala da criança na creche _____</p> <p>3. Há quanto tempo a criança frequenta esta creche? _____ dias _____ meses</p> <p>4. Período que frequenta a creche: (1) integral (2) matutino (3) vespertino</p> <p>5. Já frequentou outra creche? (1) Não (2) Sim</p> <p>Se afirmativo</p> <p>6. Nome da creche _____</p> <p>7. Quando e por quanto tempo? Há _____ meses. Por _____ meses</p>	<p>NOMECR ( )</p> <p>NSALA ( )</p> <p>TC ( )</p> <p>PERIODO ( )</p> <p>OUTCR ( )</p> <p>OUTCRN ( )</p> <p>OUTCRQ ( )</p> <p>OUTCRT ( )</p>	
<p>8. Qual posto de saúde que a criança frequenta? _____ ou _____</p> <p>9. A criança esteve internada            (1) Nos últimos seis meses (2) Nos últimos três meses            (3) Não internou nos últimos 6 meses (9) NS/NR</p> <p>Se a resposta for negativa passe para a <b>pergunta 14</b></p> <p>10. Qual a duração da última internação? _____ dias (88)NA</p> <p>11. Qual o nome do hospital? _____</p> <p>12. A criança recebeu antibiótico na última internação? (1) Não (2) Sim (8)NA (9) NS/NR</p> <p>13. Se afirmativo, qual antibiótico? _____ (nome do antibiótico)</p> <p>14. A criança tomou antibiótico há quantos dias atrás? Se não tomou antibiótico passe para a <b>pergunta 17. (NÃO CONSIDERAR O ANTIBIÓTICO DA INTERNAÇÃO)</b>            (1) 7-30 (2) 31-60 (3) 61-90 (4) 91 ou mais (5) Não tomou (9)NS/NR</p> <p>15. Por quanto tempo utilizou ? _____ dias (88) NA (99)NS/NR</p> <p>16. Este antibiótico foi prescrito por:            (1) Médico (2) Farmacêutico (3) Mãe/outro (8) NA (9)NS/NR</p>	<p>PSAUDE1 ( )</p> <p>PSAUDE2 ( )</p> <p>INTERNA ( )</p> <p>INTERNAD ( )</p> <p>NOMEH ( )</p> <p>INTANTIB ( )</p> <p>INTANTQ ( )</p> <p>ANTIBIDIA ( )</p> <p>ANTIBQT ( )</p> <p>PRESCRI ( )</p>	
<p>17. Peso ao nascer (em gramas) _____</p>	<p>_____ (9,999) NS/NR</p>	<p>PESO ( )</p>
<p>18. A criança está sendo amamentada com Leite materno?</p>	<p>(1) Não (2) Sim (9) NS/NR</p>	<p>MATERNOH ( )</p>
<p>19. A criança já foi amamentada com leite materno?            Se negativo passe para a <b>pergunta 21</b></p>	<p>(1) Não (2) Sim (9) NS/NR</p>	<p>MATERNOF ( )</p>
<p>20. A criança recebeu leite materno exclusivo por quanto tempo?</p>	<p>_____ dias _____ meses</p>	<p>MATERNOT ( )</p>
<p>21. Indique o número de doses registradas no cartão de vacinação:</p> <p>Sabin _____</p> <p>BCG _____</p> <p>Hepatite B _____</p> <p>Tríplice Viral _____</p> <p>Prevenar (anti-pneumocócica) _____</p>	<p>Tetrata _____</p> <p>Sarampo _____</p> <p>Febre Amarela _____</p> <p>Hib _____</p>	<p>SABIN ( ...)</p> <p>BCG ( ...)</p> <p>HEPAB ( ...)</p> <p>TRIVIRAL ( ...)</p> <p>PREVNAR ( ...)</p> <p>TETRATA ( ...)</p> <p>SARAMPO ( ...)</p> <p>FEBREA ( ...)</p> <p>HIB ( ..)</p>

22. A criança é portadora de: Anemia Falciforme? Diabetes? Asma? Otite de repetição	(1)Não (2)Sim/médico (3) Sim/não médico (9)NS/NR (1) Não (2)Sim/médico (3) Sim/não médico (9)NS/NR (1) Não (2)Sim/médico (3) Sim/não médico (9)NS/NR (1) Não (2)Sim/médico (3) Sim/não médico (9)NS/NR	ANEMIAF ( ) DIABETE ( ) ASMA ( ) OTITEREP ( )
23. A criança apresentou alguma doença anteriormente? (Exceto as listadas acima) Se afirmativo, qual a doença?	(1)Não (2)Sim (3)Sim/não médico (9)NS/NR _____ nome da doença	DOENÇA ( ) DOENCAQ ( )
24. A criança apresentou nos últimos 30 dias? Gripe (resfriado) Amigdalite Otite Rinosinusite Pneumonia Tosse Febre Outros processos infecciosos Qual _____	Há quantos dias? (00)Não _____ (99) NS/NR (00)Não _____ (99) NS/NR (00)Não _____ (99) NS/NR (00)Não _____ (99) NS/NR (00)Não _____ (99) NS/NR (00)Não _____ (99) NS/NR (00)Não _____ (99) NS/NR (00)Não _____ (99) NS/NR	GRUPE ( ) AMIGDA ( ) OTITE ( ) RINOS ( ) PNEUMO ( ) TOSSE ( ) FEBRE ( ) OUTINF ( ) QUALIF ( )
25. Quantos irmãos tem a criança (vivos)? 26. Quantos irmãos são mais velhos que a criança? 27. Quantos são mais novos que a criança?	_____ (99) NS/NR _____ (88) NA (99) NS/NR _____ (88) NA (99) NS/NR	IRMVIV ( ) IRMVE ( ) IRMNOV ( )

28. A mãe biológica da criança tem (teve)? Bronquite Asma Rinite Otite Eczema	(1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS	MBRON ( ) MASMA ( ) MRINITE ( ) MOTITE ( ) MECZEMA ( )
29. O pai biológico da criança tem (teve)? Bronquite Asma Rinite Otite Eczema	(1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (9) NR/NS	PBRON ( ) PASMA ( ) PRINITE ( ) POTITE ( ) PECZEMA ( )
Pergunte somente se a criança tem irmãos vivos, se não tem passe para <b>pergunta 38</b>		
30. Algum irmão da criança tem (teve)? Bronquite Asma Rinite Otite Eczema	(1) Não (2) Sim (8)NA (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (8)NA (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (8)NA (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (8)NA (9) NR/NS (1) Não (2) Sim (8)NA (9) NR/NS	IBRON ( ) IASMA ( ) IRINITE ( ) IOTITE ( ) IECZEMA ( )
31. Quantos irmãos freqüentam atualmente alguma creche? _____ (88) NA Qual a idade de cada um deles? 1º _____ meses; 2º _____ meses; 3º _____ meses		IFCRE ( ) IFIDADE1 ( ) IFIDADE2 ( ) IFIDADE3 ( )
32. Algum irmão tomou antibiótico nos últimos (em dias): (1) 30 (2) 31-60 (3) 61-90 (4) 91 ou mais (5) Não tomou (8) NA (9)NS/NR Se não tomou passar para a <b>pergunta 35</b> . Se afirmativo		IANtib ( ) IANtibQ ( )
33. Qual antibiótico? _____ 34. Há quanto tempo utilizou? _____ dias Por quanto tempo utilizou? _____ dias		IANtibQT ( )

35. Algum irmão esteve internado nos últimos três meses? (1) Não (2) Sim (9) NS/NR Se afirmativo	IINTER ( )
36. Qual a duração desta internação? _____ dias	IINTERD ( )
37. Qual o nome do hospital? _____	INOMEH ( )
38. Alguma criança da casa tomou antibiótico nos últimos (em dias)? (1) 30 (2) 31-60 (3) 61-90 (4) 91 ou mais (5) Não tomou (8) NA (9)NS/NR Se não tomou passar para a pergunta 39. Se afirmativo Qual antibiótico _____ Por quanto tempo utilizou? _____ dias	CRANTIB ( ) CRANTIBQ ( ) CRANTQT ( )
39. A mãe desta criança tomou antibiótico nos últimos (em dias)? (1) 30 (2) 31-60 (3) 61-90 (4) 91 ou mais (5) Não tomou (8) NA (9)NS/NR	MANTIB ( )
40. O pai desta criança tomou antibiótico nos últimos (em dias)? (1) 30 (2) 31-60 (3) 61-90 (4) 91 ou mais (5) Não tomou (8) NA (9)NS/NR	PANTIB ( )
41. O cuidador desta criança tomou antibiótico nos últimos (em dias): (1) 30 (2) 31-60 (3) 61-90 (4) 91 ou mais (5) Não tomou (8) NA (9)NS/NR	CANTIB ( )
42. Algum adulto da casa foi internado nos últimos (em dias)? (1) 30 (2) 31-60 (3) 61-90 (4) 91 ou mais (5) Não (9)NS/NR Se afirmativo	ADULTINT ( )
43. Qual a duração desta internação? _____ dias _____ meses	ADULDUR ( )
44. Qual o nome do hospital? _____	ADULNH ( )

45. Que nível de escolaridade tem a mãe (ou responsável)? Não sabe ler nem escrever ( 0 )	<b>Completo</b>	<b>Incompleto</b>	ESCOM ( )	
1º grau	( 1 )	( 2 )		
2º grau	( 3 )	( 4 )		
Superior	( 5 )	( 6 )		
		( 9 ) NR/NS		
46. Que nível de escolaridade tem o pai (ou responsável)? Não sabe ler nem escrever ( 0 )	<b>Completo</b>	<b>Incompleto</b>	ES COP ( )	
1º grau	( 1 )	( 2 )		
2º grau	( 3 )	( 4 )		
Superior	( 5 )	( 6 )		
		( 9 ) NR/NS		
47. O domicílio é próprio?	(1) Não	(2) Sim	(9) NR/NS	DOMPRO ( )
48. Renda familiar R\$ _____,00				RENDAF ( )

Data da entrevista: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (dia/mês/ano)

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Letra de Forma

DENTREVQ ( )

ENTREVQ ( )

# 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](#)