

Dissertação de Mestrado

CAMILLE ALVES BRITO DE MOURA

Avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a análise do polimorfismo do gene *pspA* (tipagem *pspA*)

Orientação: Profa. Dra. Lúcia Martins Teixeira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CAMILLE ALVES BRITO DE MOURA

Avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a análise do polimorfismo do gene *pspA* (tipagem *pspA*)



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientação: Profa. Dra. Lúcia Martins Teixeira



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Moura, Camille Alves Brito

Avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a análise do polimorfismo do gene *pspA* (tipagem *pspA*) / Camille Alves Brito de Moura – Rio de Janeiro, 2010

XIX, 89.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientador: Lúcia Martins Teixeira

Referências bibliográficas: 150

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Sorotipos 9N, 9V e 14 3. Proteína de superfície pneumocócica A 4. Tipagem *pspA* 5. *pspA* PCR 6. Diversidade genética 7. Eletroforese em campo pulsado (PFGE). I. Teixeira Lúcia Martins. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a análise do polimorfismo do gene *pspA* (tipagem *pspA*)

Camille Alves Brito de Moura

Avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae*
dos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo
pulsado (PFGE) e a análise do polimorfismo do gene *pspA*
(tipagem *pspA*)

Rio de Janeiro, 12 de Março de 2010.

Lúcia Martins Teixeira, PhD, IMPPG, UFRJ (Orientador)

Ana Paula Vieira Colombo, PhD, IMPPG, UFRJ

Renata Martins do Souto, PhD, IMPPG, UFRJ

Rubens Clayton da Silva Dias, PhD, HUCFF, UFRJ

Rafael Silva Duarte, PhD, IMPPG, UFRJ (Revisor)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Apoio Biotecnológico do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Profa. Dra. Lúcia Martins Teixeira.

Agradecimentos

Ao final desta segunda etapa de formação profissional, olho para trás e vejo quanto cresci, amadureci não só nos conhecimentos científicos, mas também em minha vida pessoal. Durante esse período convivi com pessoas especiais, que me apoiaram e me ajudaram. Agora com poucas palavras venho expressar meus profundos e sinceros agradecimentos.

A Deus que me deu a vida e saúde me enchendo de conforto todas as vezes que estive a ponto de desistir e que graças a Ele tudo está se concluindo de maneira ideal.

À minha Vó Glória, que me apoiou em tudo que fiz em toda a minha vida e que nesse momento especial ela nunca foi diferente. A pesar de suas intolerâncias e preocupações eu a amo muito e agradeço de coração o seu apoio.

À minha Mãe por todo o apoio e amor que ela me deu, e sempre com uma pitada de bom humor típica dela. Beijos Mãe você é show!

Ao meu Tio Jorge que nos deu um susto nesse ano que passou, mas que graças Deus está de volta não como antes, mas se tudo correr bem, melhor do que nunca! Te amo!

Meu querido namorado que veio de tão longe, mas me conquistou por inteiro. Obrigada pelo apoio, amor e carinho em todos os momentos! “Seni çok seviyorum!”

À minha Tia, minhas Primas, meu Irmão e meu Padrinho por todo apoio, carinho e amor que só eles poderiam me oferecer! Obrigada família linda!

A todas as pessoas que me amam (familiares e amigos) que torcem por mim e ficam felizes com cada conquista em minha vida.

À prof^a Lucia Matins Teixeira, orientadora de todo trabalho, pelo investimento, compreensão e disponibilidade em vários momentos, por toda ajuda em diversas etapas que passei desde a

iniciação científica até agora, por ter me oferecido essa oportunidade e pelos valiosos ensinamentos.

À profª Vânia Merquior, não só pelo apoio profissional em vários instantes desta caminhada e, mas por sua imensa amizade e ótimo bom humor dos “geminianos do laboratório”!

À Drª Fabíola Kegele, por tudo o que aprendi esses anos, sua imensa paciência, humor único e muita competência. Foi muito bom ter sido co-orientada por ela. Boa sorte na sua nova etapa de vida!

Ao Prof. Felipe P. G. Neves, com quem também aprendi muito, seu companheirismo, presteza, paciência. Espero que tudo continue dando certo em sua vida e muita sorte para você. Você é um bom amigo filhote!

À Filomena Soares (Filózinha), sempre preocupada com o bom funcionamento do laboratório e organização do laboratório. Sem você não teria sido a mesma coisa ... Obrigada pela ajuda, atenção, carinho e amizade.

Aos amigos que fiz nesse laboratório, Angélica Miranda, Felipe Cruz e Giseli Wienen, por todo tempo junto, preocupados com disciplinas, experimentos, seminários. Mas também pelos momentos de descontração que foram muito legais! Adoro todos vocês!!!

Às amigas de outros laboratórios, mas que também são especiais, Karla Miranda e Natacha Martins, por apoio e ajuda em todo tempo que estivemos juntas. Obrigada Karlota!

À Jaqueline Morais, sempre pronta para ajudar, e com a língua sempre afiada! Mas muito competente. Valeu Jaque!

À minha amiga Clarissa por todo apoio, carinho e bom humor. Te adoro muito amiga! E Adoro aquele menininho fofo! Beijos no Lucas!

Aos alunos de graduação que passaram pelo laboratório e aos presentes, em especial a Adriana Faria, Beatriz Monteiro, Ludmilla Dellatorre, Sandrine Cruz pelos inúmeros momentos de auxílio profissional e aos incontáveis instantes de boa convivência.

Aos amigos do laboratório de Anaeróbios com quem passei momentos divertidos na sala de almoço e também nos intervalos de disciplinas.

Aos professores que compareceram a banca examinadora, pela presteza e disponibilidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/Pronex), pelo suporte financeiro para a execução do projeto.

Resumo

Camille Alves Brito de Moura

Avaliação da diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a análise do polimorfismo do gene *pspA* (tipagem *pspA*)

Orientação: Profa Dra. Lúcia Martins Teixeira

Resumo da dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno causador de infecções invasivas e não-invasivas em seres humanos. Esse microrganismo apresenta uma cápsula polissacarídica como principal fator de virulência, cuja diversidade antigênica permite a classificação em sorotipos. Os antígenos da cápsula polissacarídica são utilizados nas principais vacinas até hoje licenciadas, como as vacinas 23-valente (polissacarídica) e 7-valente (conjugada). Por outro lado, vacinas baseadas em componentes protéicos desse microrganismo, tal como a proteína A da superfície pneumocócica (PspA), são alvo de grande interesse. Contudo, para a determinação de novas estratégias vacinais é necessário conhecer as diversas propriedades biológicas das amostras prevalentes nas diferentes regiões geográficas. O presente estudo teve como objetivo determinar a diversidade genética entre amostras de *S. pneumoniae* pertencentes aos sorotipos 9N, 9V e 14, isoladas no Brasil, empregando a tipagem baseada na caracterização do gene *pspA*, e avaliar a distribuição dos alelos gênicos *pspA* entre os grupos clonais obtidos pela análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE). As amostras foram identificadas com base nos resultados dos testes de bile solubilidade e de susceptibilidade a optoquina. A caracterização fenotípica compreendeu a avaliação da susceptibilidade a eritromicina e penicilina e a caracterização sorológica. Para a caracterização genotípica, as amostras foram analisadas pela técnica de PFGE e, posteriormente, submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* / PCR) para determinação das famílias do gene *pspA* (*pspA*/PCR). Foram estudadas 30 amostras do sorotipo 9N, 59 amostras do sorotipo 9V e 201 amostras do sorotipo 14, isoladas de pacientes e portadores residentes em diferentes localidades do Brasil. Pela técnica de PFGE, a maioria das amostras do sorotipo 14 foi

agrupada em 3 complexos clonais (CC) principais [Pen-H (n=82), Pen-A (n=20) e Eri-A (n=19)], constituídos por amostras não susceptíveis a penicilina (PEN) ou eritromicina (ERI), enquanto as demais incluíram um conjunto de 7 amostras não susceptíveis a penicilina, porém não pertencentes aos outros CC, e um conjunto de 44 amostras sensíveis a ambos os antimicrobianos. Pela técnica de *pspA*/PCR, as amostras do sorotipo 14 foram caracterizadas como portadoras do gene *pspA* da família 1 (76/201; 37,8%) ou do gene *pspA* da família 2 (125/201; 62%). As amostras pertencentes aos sorotipos 9N e 9V, foram incluídas em dois CC, compostos por amostras susceptíveis ou não a penicilina [Pen-A (n=27) e Pen-H (n=45)], sendo a maioria portadora do gene *pspA2* (71/72; 98,6%) e apenas uma (1,4%) amostra foi caracterizada como portadora do gene *pspA1*. Os resultados globais indicam a predominância do gene *pspA2* entre as amostras incluídas no presente estudo, corroborando dados de estudos realizados com amostras isoladas em outras localidades do Brasil. No presente estudo, tal predominância parece ter sido devido à associação desses alelos com amostras incluídas no CC Pen-H, predominante entre amostras do sorotipo 14, e com amostras pertencentes ao sorotipo 9V, independente do CC em que foram incluídas. Por outro lado, o alelo *pspA1* predominou entre amostras incluídas no CC Eri-A, assim como entre as amostras susceptíveis a PEN e ERI.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, sorotipos 9N, 9V e 14, proteína A de superfície pneumocócica, tipagem *pspA*, *pspA* PCR, diversidade genética, eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Rio de Janeiro

Março de 2010

Abstract

Camille Alves Brito de Moura

Evaluation of the genetic diversity of *Streptococcus pneumoniae* belonging to serotypes 9N, 9V and 14, by pulsed-field gel electrophoresis and by analysis of the *pspA* gene polymorphism (*pspA* typing)

Advisors: Prof. Dr. Lúcia Martins Teixeira

Abstract of the Master Dissertation presented to the Graduation program in Science (Microbiology) of the Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, as part of the requirements to receive the degree of Master in Biological Sciences (Microbiology).

Streptococcus pneumoniae is an important pathogen causing invasive and non-invasive infections in humans. This microorganism has a polysaccharide capsule that constitutes a major virulence factor displaying a large antigenic diversity, and allowing the classification in serotypes. Polysaccharide capsule antigens compose the two major vaccines in use, to date, the 23-valent (polysaccharide) and the 7-valent (conjugated) vaccines. Moreover, vaccines based on protein components of this microorganism, including the pneumococcal surface protein A (PspA), are targets of interest in recent studies. However, for determination of new vaccine strategies is necessary to know the biological properties of the strains that are prevalent in different geographical regions. The aim of this study was to determine the genetic diversity among strains of *S. pneumoniae* belonging to serotypes 9N, 9V and 14 isolated in Brazil, using a typing system based on the characterization of the *pspA* genes (*pspA* typing), and to evaluate the distribution of the *pspA* genes among strains included in major clonal complexes (CC) identified by analysis of the chromosomal DNA fragmentation profiles after pulsed-field gel electrophoresis (PFGE profiles). The strains were identified on the basis of results of bile solubility and optochin susceptibility tests. Phenotypic characterization included the evaluation of susceptibility to both erythromycin and penicillin, and on serological typing. For genotyping, the strains were analyzed using PFGE and subsequently selected and subjected to the polymerase chain reaction technique (PCR) for determination of *pspA* families (*pspA*/PCR or *pspA* typing). We examined 30 strains of serotype 9N, 59 strains of serotype 9V and 201 strains of serotype 14, isolated from patients living in different regions in Brazil. According to PFGE, most strains of serotype 14 were grouped in 3 clonal complex (CC) [Pen-H (n = 82), Pen-A (n = 20) and Eri-A (n = 19)] consisting of strains not susceptible to penicillin (PEN) or erythromycin (ERI), while the other were included in a group of 7 strains not susceptible to penicillin

that did not belong to the major CCs and a group of 44 strains susceptible to both antibiotics. According to *pspA*/PCR, serotype 14 strains were characterized as belonging to *pspA* family 1 (76/201, 37.8%) or *pspA* family 2 (125/201, 62%). Strains belonging to serotypes 9N and 9V, were grouped in two different CCs that included strains susceptible or not to penicillin [Pen-A (n = 27) and Pen-H (n = 45)], mostly belonging to the *pspA* family 2 (71/72, 98.6%). Only one (1.4%) strain was characterized as *pspA* family 1. The results indicate the prevalence of *pspA* family 2 genes among strains included in this study, corroborating data previously obtained for strains isolated in other areas of Brazil. In the present study, the prevalence of *pspA2* genes seems to be due to the association of these alleles with strains in the Pen H CC, that is predominant among strains belonging to serotype 14, as well as serotypes 9N and 9V, regardless of the CC. Moreover, *pspA2* genes predominated among strains included in the CC Eri-A, as well as among strains susceptible to both PEN and ERI.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, serotypes 9N, 9V and 14, pneumococcal surface Protein A, *pspA* typing, *pspA* PCR, genetic diversity, pulsed-field gel electrophoresis

Rio de Janeiro

March 2010

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
INTRODUÇÃO	1
1. Aspectos Gerais.....	1
2. Fatores de Virulência.....	3
3. Variação de Fase.	9
4. Epidemiologia das Infecções Pneumocócicas.....	11
5. Resistência aos Antimicrobianos.....	13
6. Profilaxia das Infecções Pneumocócicas.....	18
7. Caracterização Molecular.....	22
OBJETIVOS	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
1. Amostras Bacterianas.....	27
2. Identificação das Amostras.....	27
2.1. Caracterização morfológica colonial e celular e determinação da atividade hemolítica	28
2.2. Caracterização fisiológica.....	28
2.2.1. Teste de bile solubilidade	28
2.2.2. Teste de susceptibilidade à optoquina.....	29
3. Caracterização Sorológica.....	29
4. Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	30
4.1. Teste de difusão em ágar	30
4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de penicilina	30
5. Caracterização Molecular	31
5.1. Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	31
5.2. Análise do polimorfismo do gene <i>pspA</i> (tipagem <i>pspA</i>)	33

5.2.1. Extração do DNA cromossômico	33
5.2.2. Detecção dos alelos do gene <i>pspA</i> através de PCR	33
5.2.3. Eletroforese dos produtos amplificados.....	35
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	82

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo, assim como o tamanho esperado dos produtos de amplificação e as respectivas referências 35
- Tabela 2:** Distribuição dos alelos do gene *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* susceptíveis e não-susceptíveis a penicilina, de acordo com os sorotipos e os principais complexos clonais identificados no presente estudo 44
- Figura 1:** Perfis de PFGE representativos de amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes aos sorotipos 9N e 9V susceptíveis e não susceptíveis à penicilina, isoladas no Brasil..... 45
- Figura 2:** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após PFGE, de amostras representativas de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9V e 9N, susceptíveis PEN-S e não susceptíveis à penicilina, isoladas no Brasil. 46
- Figura 3:** Distribuição dos alelos do gene *pspA* das famílias 1 e 2 entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 9V, de acordo com: **A.** As diferentes regiões geográficas; **B.** Os períodos de estudo.....47
- Figura 4:** Perfis de PFGE representativos de amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes ao sorotipo 14, não susceptíveis à penicilina, analisadas durante o período de estudo. **A-** Amostras pertencentes ao CC Pen-H; **B-** Amostras pertencentes ao CC Pen-A.....48
- Figura 5:** Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após PFGE, de amostras representativas de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 não susceptíveis à penicilina. A amostra referência do clone internacional Spain^{9V}-3 (CDC195), também está aqui representada. 49
- Figura 6:** Perfis de PFGE representativos de amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 resistentes à eritromicina, incluídas no presente estudo 50

Figura 7: Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após PFGE, de amostras representativas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> do sorotipo 14 resistentes eritromicina.....	51
Figura 8: Géis representativos dos resultados encontrados empregando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase para detecção do gene associados às diferentes famílias de PspA em amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> pertencentes aos sorotipos 9N, 9V e 14. A- Gel representativo das amostras que apresentaram resultado positivo portadoras do gene <i>pspA</i> da Fam 1; B- Gel representativo de amostras que apresentaram resultado positivo portadoras do gene <i>pspA</i> da Fam 2.	52
Figura 9: Distribuição dos alelos do gene <i>pspA</i> das diferentes famílias, entre as amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> pertencente ao sorotipo 14, incluídas no presente estudo, de acordo com o local de isolamento das amostras.	53
Figura 10: Distribuição dos alelos do gene <i>pspA</i> de diferentes famílias entre amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> pertencentes ao sorotipo 14, incluídas no presente estudo, de acordo com o período de isolamento.	54
Figura 11: Distribuição dos alelos do gene <i>pspA</i> de diferentes famílias, entre os principais complexos clonais identificados entre as amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> pertencentes ao sorotipo 14 e resistentes à penicilina, incluídas no presente estudo.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

μg = micrograma
 μL = microlitro
 μM = micromolar
 $^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius
cm = centímetros
g = grama
h = horas
kb = kilobases
kDa = kiloDalton
M = molaridade
mg = miligrama
min = minutos
mL = mililitro
mm = milímetro
mM = milimolar
pb = pares de base
pH = potencial Hidrogeniônico
s = segundos
U = unidade enzimática
V = volts
ASC = Ágar Sangue de Carneiro
ATCC = *American Type Culture Collection*
atp = adenosina trifosfato
cat = gene que codifica a cloranfenicol-acetiltransferase
CAT = *chloramphenicol acetyltransferase*
CbpA = Proteína ligadora de colina
CC = Complexo clonal
CDC = *Centers for Disease Control and Prevention*
CDR = *Clade-defining Region*; região definidora de *clades*
CIM = Concentração inibitória mínima
CLSI = *Clinical Laboratory Standards Institute*
cps = gene que codifica a capsula polissacarídica
CRM = *cross-reacting material*
DNA = *deoxiribonucleic acid*; ácido desoxirribonucléico
DPI = doença pneumocócica invasiva
EDTA = *Ethylenediaminetetracetic acid*; ácido etilendiaminatetracético
ELISA = *Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay*;
Fam = Família
FDA = *Food and Drug Administration*
gyr = gene que codifica a DNA girase
IgA = Imunoglobulina A
LCR = Líquido cefalorraquidiano

lytA = gene que codifica a autolisina
LytA = autolisina pneumocócica
MLEE = *Multilocus Enzyme Electrophoresis*
MLST = *Multilocus Sequence Typing*
MLVA = *Multiple-locus VNTR Analysis*
n = número
pbp = gene que codifica a proteína ligadora de penicilina
PBPs = *Penicillin binding proteins*; Proteínas ligantes de penicilina
PBS = *Phosphate-buffered saline*; salina fosfato tamponada
PCR = *Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase
PFGE = *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; eletroforese em gel em campo pulsado
ply = gene que codifica a pneumolisina
Ply = Pneumolisina
PMEN = *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*
psaA = gene que codifica o antígeno A de superfície pneumocócica
PsaA = Antígeno A de superfície pneumocócica
pspA = gene que codifica a proteína A de superfície pneumocócica
PspA = Proteína A de superfície pneumocócica
PspC = proteína C de superfície pneumocócica
PGM = fosfoglucomutase
RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism*; polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
rpm = rotação por minuto
rRNA = *Ribosomal Ribonucleic Acid*
SpsA = proteína A secretória de superfície pneumocócica
SS = *Standard Strain*; amostras padrão
ST = *Sequence typing*; seqüência tipo
TE = Tris – EDTA
Tn = *transposon*
VNTR = *Variable Number of Tandem Repeats*
WHO = *World Health Organization*; Organização Mundial da Saúde

1. Aspectos Gerais

A espécie *Streptococcus pneumoniae*, comumente denominada de pneumococo, encontra-se entre as principais causas de morbidade e mortalidade em seres humanos, sendo considerada um dos agentes mais comuns de pneumonias adquiridas na comunidade, e uma das causas mais importantes de meningite, bacteremias, otite média aguda e sinusite (CDC, 1997; BUTLER, DOWELL & BREIMAN, 1998). Por outro lado, essa espécie circula entre as várias populações humanas, através de um número bastante variável de portadores assintomáticos, que atuam como reservatórios desse importante patógeno. A colonização assintomática da nasofaringe é prevalente em crianças e geralmente precede o desenvolvimento da doença pneumocócica invasiva (LAVAL *et al.*, 2006). A incidência da doença pneumocócica é particularmente alta em crianças com idade inferior a 5 anos, idosos e pessoas imunocomprometidas (OGUNNIYI *et al.*, 2007).

Em laboratório, o *S. pneumoniae* pode ser identificado através do isolamento primário de colônias α -hemolíticas em meio de ágar sangue de carneiro, seguido por testes fenotípicos e sorológicos. Ao redor do crescimento bacteriano, evidenciam-se regiões de α -hemólise caracterizada pela coloração esverdeada. Os testes fenotípicos mais utilizados são os testes da bile solubilidade e de susceptibilidade à optoquina (FACKLAM & WASHINGTON II, 1991). Os sais biliares, especialmente o desoxicolato de sódio, têm a capacidade de induzir a lise de amostras de *S. pneumoniae*. Tais sais biliares atuam na ativação das autolisinas pneumocócicas, iniciando precocemente o processo de autólise do pneumococo. Embora bastante utilizado na identificação presuntiva, o teste de bile solubilidade tem apresentado resultados divergentes em algumas amostras. Obregón e colaboradores (2002) estudaram 12 amostras de pneumococos bile-insolúveis e evidenciaram deleções de 2 aminoácidos na

autolisina pneumocócica proteína (LytA), o que diminuiu sua atividade específica. O cloridrato de etil-hidrocupreína, conhecido comumente como optoquina, é um análogo de quinina que atua como antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do pneumococo, enquanto outros estreptococos α -hemolíticos são resistentes (PIKIS *et al.*, 2001). No entanto, cepas variantes, resistentes a esse antimicrobiano, já foram isoladas em diversas regiões do mundo (COGNÉ *et al.*, 2000; PIKIS *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2007a; CORTES *et al.*, 2008). Mutações pontuais nos genes *atpA* e/ou *atpC* que codificam duas sub-unidades do alvo molecular da optoquina, o complexo F_0F_1 ATPase transmembrânico, envolvido no transporte de prótons na cadeia respiratória, constituem os principais determinantes de resistência a esse antimicrobiano (PIKIS *et al.*, 2001). Para a identificação dos pneumococos, também podem ser usados reagentes constituídos por anticorpos direcionados contra os diversos antígenos polissacarídeos das cápsulas dos pneumococos. Empregando tais reagentes, pode ser confirmada a presença de pneumococos em culturas ou diretamente em espécimens clínicos (FACKLAM & WASHINGTON II, 1991).

Diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas para a identificação rápida e precisa dos pneumococos, uma vez que os testes fenotípicos, em geral, são mais demorados e/ou podem gerar interpretações errôneas, devido à ocorrência de amostras com características atípicas. Dentre essas técnicas, aquelas baseadas na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) vêm sendo empregadas para a detecção de diversos genes que codificam fatores de virulência típicos de pneumococos, incluindo a autolisina (McAVIN *et al.*, 2001), a pneumolisina (CORLESS *et al.*, 2001) e o antígeno A de superfície pneumocócica (MORRISON *et al.*, 2000). Além disso, kits comerciais também têm sido empregados para a identificação do microrganismo, tal como o “Accuprobe pneumococcus identification test”, onde é utilizada uma sonda que tem como alvo o rRNA (DENIS & CAREY, 1992), e o “NOW *Streptococcus pneumoniae* antigen test”, que consiste em um ensaio imunocromatográfico que visa a detecção de antígeno na urina de pacientes com pneumonia ou ainda no líquido de pacientes com meningite pneumocócica (GISSELSSON-SÓLEN *et al.*,

2007). Uma técnica mais recente, e que apresentou resultados bastante satisfatórios, é o PCR em tempo real, conhecido como *Real-Time PCR*. Essa técnica apresentou resultados com sensibilidade de até 100%, quando da sua aplicação para a análise de líquido e de secreção auricular (CARVALHO et al., 2007), enquanto que, em um estudo com espécimes de escarro, a sensibilidade foi de 97,2% e especificidade de 60,9% (BAYRAM et al., 2006).

2. Fatores de Virulência

A patogenicidade de *S. pneumoniae* é atribuída a diversos fatores de virulência, alguns constituídos por moléculas associadas à superfície bacteriana e outros por proteínas citoplasmáticas que podem ser liberadas para o meio extracelular. Entre os fatores de virulência dos pneumococos, destaca-se a cápsula polissacarídica, que, devido à variedade antigênica e estrutural, permite a classificação desses microrganismos em mais de 90 sorotipos distintos (Henrichsen, 1995; HANAGE et al., 2005). Desde o pioneiro trabalho de Griffith, onde ficou evidenciado que cepas variantes não encapsuladas não eram patogênicas (*apud* GARCÍA et al., 2000), a cápsula polissacarídica tem sido reconhecida como o fator de virulência mais importante. Os polissacarídeos que compõem o envoltório capsular de *S. pneumoniae* são componentes essenciais para a virulência, já que promovem a proteção da bactéria contra a fagocitose por células de defesa do sistema imune. Uma redução na quantidade dos polissacarídeos capsulares resulta no maior acesso de anticorpos e complemento à superfície do pneumococo, aumentando, assim, a eficiência da resposta imune do hospedeiro (BOGAERT et al., 2004a). Na presença de anticorpos anticapsulares, o complemento pode ser ativado, assim como a fagocitose, e é, portanto, dessa maneira que as vacinas polissacarídicas promovem proteção (HALL, 1998). Por outro lado, já foi evidenciada a associação entre amostras de pneumococos não encapsulados e infecções superficiais, como conjuntivites (CRUM et al., 2004).

Os genes envolvidos na biossíntese dos polissacarídeos capsulares estão agrupados em um único *locus*, constituindo, desta forma, o operon capsular (*cps*). Cada sorotipo está associado a um conjunto peculiar de genes relacionados à síntese dos polissacarídeos tipo-específicos (GARCÍA *et al.*, 2000; KADIOGLU *et al.*, 2008).

A determinação dos tipos capsulares constitui a base para a tipagem de *S. pneumoniae*, permitindo o rastreamento epidemiológico das infecções pneumocócicas. Por muito tempo, tal determinação era feita através de testes sorológicos, empregando painéis de anti-soros específicos para a identificação dos diversos sorotipos capsulares, e a reação de intumescimento capsular ou teste de Quellung (LUND & HENRICHSEN, 1978), considerada a técnica padrão-ouro para estudos epidemiológicos. Entretanto, a execução de tais testes era restrita à poucos laboratórios de referência, devido ao elevado custo, às dificuldades de interpretação levando a necessidade de treinamento técnico especializado, e à disponibilidade limitada dos anti-soros. Visando uma abordagem mais simples e que pudesse ser mais amplamente utilizada em estudos de vigilância das doenças pneumocócicas, Pai, Gertz & Beall (2006) desenvolveram uma metodologia baseada em PCR, em formato “multiplex”, constituída por etapas seqüenciais, para a detecção de seqüências gênicas específicas para os sorotipos capsulares. Posteriormente, Dias e colaboradores (2007b) adaptaram essa técnica visando à identificação dos tipos capsulares de pneumococos prevalentes na América Latina. Essa metodologia mostrou uma correlação direta com os resultados da sorotipagem convencional e vem sendo utilizada como uma alternativa segura para a determinação dos tipos capsulares de pneumococos.

Um segundo grupo de fatores de virulência envolve proteínas e enzimas que podem atuar direta ou indiretamente na patogênese da infecção pneumocócica. Entre essas, podemos destacar: pneumolisina (Ply), autolisina (LtyA), antígeno A de superfície pneumocócica (PsaA), proteína A de superfície pneumocócica (PspA), pululanase (SpuA), proteína ligadora de colina (CbpA) e

neuraminidases, dentre outros (BOULNOIS, 1991; BRILES *et al.*, 2001; JEDRZEJAS, 2007).

A pneumolisina é uma proteína de aproximadamente 53KDa que parece ser produzida por todas as amostras de *S. pneumoniae* (HIRST *et al.*, 2004). Diferentemente dos demais antígenos pneumocócicos, é uma enzima citoplasmática que é liberada após a ação da autolisina. Desta forma, as propriedades de virulência da pneumolisina são diretamente dependentes da ação da autolisina (JEDRZEJAS, 2007). A pneumolisina é codificada pelo gene constitutivo *ply*, sendo que bactérias *ply* mutantes são incapazes de transpor o endotélio microvascular, indicando que essa proteína é essencial para que o pneumococo tenha a capacidade de invadir a corrente sanguínea e a barreira hemato-encefálica (HIRST *et al.*, 2008).

A pneumolisina tem funções distintas, especialmente na fase inicial da patogênese da infecção pneumocócica. Essa proteína se oligomeriza nas membranas das células alvo, para formar um poro transmembrânico (KADIOGLU *et al.*, 2008). Os efeitos citotóxicos da pneumolisina podem inibir a fagocitose e a função das células imunes, o que leva à supressão da resposta imune inflamatória do hospedeiro (JEDRZEJAS, 2001). Além disso, a pneumolisina inibe o movimento ciliar das células do epitélio respiratório, e também pode induzir a síntese de citocinas, e ativação de células T CD4⁺ (KADIOGLU *et al.*, 2008).

Uma característica típica do pneumococo é a sua tendência a sofrer autólise após alcançar a fase estacionária, em consequência do uso de antimicrobianos, assim como de vários outros agentes químicos ou físicos. A enzima responsável por esse processo é a autolisina (LytA-N-acetilmuramil-L-alanina amidase), uma enzima codificada pelo gene *lytA*, que age na degradação da peptidoglicana, provocando uma desestabilização da parede celular que acarreta lise celular (JEDRZEJAS, 2001). A autolisina apresenta um peso molecular de aproximadamente 36kDa e possui uma organização modular, sendo constituída por dois domínios distintos. Um domínio é composto por 6 repetições

de 20 a 21 aminoácidos localizadas na porção C-terminal e é responsável pela ligação a resíduos de ácidos teicóicos ou lipoteicóicos presentes na superfície celular do microrganismo. Essa ligação da enzima a resíduos de colina dos ácidos teicóicos de parede celular é essencial para a atividade lítica da enzima. O segundo domínio, localizado na porção N-terminal, é provavelmente o responsável direto pela atividade lítica contra a peptidoglicana pneumocócica (GARCÍA *et al.*, 1988; JEDRZEJAS, 2001). Ela está direta e indiretamente ligada na patogênese da infecção pneumocócica. A implicação indireta da ação dessa enzima é a liberação de proteínas citoplasmáticas do pneumococo, incluindo fatores de virulência como a pneumolisina (TUOMANEN, 1999). A LytA é a enzima responsável pela solubilização de *S. pneumoniae* em uma solução contendo 1% de desoxicolato de sódio, constituindo assim um dos principais testes laboratoriais para identificação do pneumococo (LLULL, LÓPEZ & GARCIA, 2006). Em um estudo realizado para avaliar o possível papel da LytA na virulência do pneumococo, Berry & Paton (2000) observaram que amostras mutantes de *S. pneumoniae* (Δ lytA) apresentavam virulência reduzida em modelos experimentais em camundongos com pneumonia e bacteremia.

O PsaA foi inicialmente considerado como uma adesina, devido às seqüências homólogas com adesinas lipoprotéicas de *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus parasanguis* (SAMPSON *et al.*, 1994). Atualmente, após estudos de análise estrutural, sabe-se que é um componente do complexo transportador ABC que é responsável pelo transporte de manganês e zinco para o interior da célula do *S. pneumoniae* (JEDRZEJAS, 2001). Em cepas mutantes Δ psaA, ficou evidenciada a necessidade de manganês adicional para a manutenção celular (McALLISTER *et al.*, 2004). O manganês é essencial para o crescimento do pneumococo e, ao mesmo tempo, funciona como co-fator ou regulador da expressão de outros genes como, por exemplo, os codificantes de adesinas (PATON, 1998). Alguns estudos têm relatado que mutações no gene *psaA* acarretam em deficiência do crescimento bacteriano, da virulência e da

capacidade de adesão, além de alterar a resposta ao estresse oxidativo (MARRA *et al.*, 2002; TSENG *et al.*, 2002).

A PspA é um importante fator de virulência expresso por amostras de pneumococos (CRAIN *et al.*, 1990; JEDRZEJAS, 2007) e que pode apresentar tamanho variado, de amostra para amostra, geralmente entre 67 a 99kDa, sendo constituída por 5 domínios distintos: (i) um peptídio sinal; (ii) um domínio alfa-hélice de aproximadamente 288 aminoácidos; (iii) um domínio rico em prolina com aproximadamente 81 aminoácidos; (iv) um domínio de ligação à colina com aproximadamente 20 aminoácidos, que ancora a proteína na superfície celular; e (v) uma curta cauda C-terminal contendo aproximadamente 17-20 aminoácidos (SWIATLO *et al.*, 1997; HOLLINGSHEAD, BECKER & BRILES, 2000; JEDRZEJAS, LAMANI & BECKER, 2001; OCHS *et al.*, 2008). Essa porção C-terminal é composta por 10 repetições de 20 aminoácidos conservados que formam um domínio de ligação à colina, o qual é responsável por manter a proteína presa à superfície do pneumococo (JEDRZEJAS, LAMANI & BECKER, 2001). Essa proteína interfere na fixação do componente C3 do sistema complemento na superfície da bactéria, bloqueando potencialmente os eventos que levam à opsonização e fagocitose (BRILES *et al.*, 2003; PAYNE *et al.*, 2005; KADIOGLU *et al.*, 2008), além de ser capaz de se ligar à lactoferrina humana (HOLLINGSHEAD, BECKER & BRILES, 2000).

Em 2000, Hollingshead, Bricks & Briles investigaram a base da diversidade sorológica da PspA e, com base nas divergências das seqüências de nucleotídeos da região α -hélice N-terminal, os autores identificaram 3 famílias de PspA. A região principal responsável pela diversidade encontrada entre as PspAs compreende uma sequência de aproximadamente 100 aminoácidos, conhecida como região definidora de *clades* (*clade-defining region*; CDR). Análises dessas regiões permitiram subdividir as famílias em *clades*, que divergem entre si em mais de 20%, sendo evidenciado que PspAs pertencentes a uma mesma *clade* apresentam uma identidade superior a 90%. Assim, de acordo com a diversidade dos alelos que as codificam, as proteínas PspA foram classificadas em família 1

(Fam1, contendo os *clades* 1 e 2), família 2 (Fam2, contendo os *clades* 3, 4 e 5) e família 3 (Fam3, contendo o *clade* 6) (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000; BRANDILEONE *et al.*, 2004; PIMENTA *et al.*, 2006). As famílias de *pspA* podem ser reconhecidas por testes moleculares, como o PCR, ou por métodos sorológicos como o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay), enquanto que para a definição de *clades* é necessário o sequenciamento de DNA (MELIN *et al.*, 2008). Em geral, a expressão de PspAs das famílias 1 e 2 predomina entre as amostras de *S. pneumoniae* de origem clínica, correspondendo a cerca de 98% destas; enquanto que as amostras que expressam PspA da família 3 são raramente encontradas (OCHS *et al.*, 2008).

A PspC é uma proteína multifuncional de superfície celular, também conhecida por outros nomes que refletem suas diversificadas atividades (KADIOGLU *et al.*, 2008), tais como proteína ligadora de colina A (CpbA), devido a afinidade a colina, e também chamada de proteína A secretória de superfície pneumocócica (SpsA), devido sua capacidade de se ligar aos receptores de imunoglobulina polimérica que normalmente transportam IgA secretória (KADIOGLU *et al.*, 2008). Amostras mutantes do gene *pspC* apresentam dificuldades de inibir a via alternativa do complemento (LU, MA & ZHANG, 2006) e apresentam virulência reduzida (IANNELLI *et al.*, 2004).

A neuraminidase é outro fator de virulência que está presente em todas as amostras de *S. pneumoniae*. A enzima cliva o ácido siálico terminal das glicanas de superfície celular, tais como mucina, glicolipídeos e glicoproteínas, que provavelmente causam danos às glicanas das células do hospedeiro. Essa ação interfere nos padrões de glicosilação e expõe a superfície das células do hospedeiro, o que pode expor receptores de superfície para possíveis interações com a célula pneumocócica (BERRY, LOCK & PATON, 1996).

Bongaerts e colaboradores (2000) caracterizaram o gene que codifica proteína denominada pululanase A de *S. pneumoniae*, chamado *spuA*. Utilizando análises de imunocitometria e microscopia de imunofluorescência com soro anti-

SpuA, foi constatado que a SpuA é uma proteína localizada na superfície celular. Assim, acredita-se que essa proteína, devido à sua atividade α -1,6-glicano-hidrolase, possa ter um importante papel na colonização e ser capaz de solubilizar muco ou promover a exposição de glicoconjugados de células do hospedeiro para a aderência do pneumococo.

Vários estudos utilizando culturas de células epiteliais têm avaliado as interações de adesinas pneumocócicas com receptores de células humanas. A maioria das adesinas apresenta fosforilcolina (ChoP), que é um constituinte tanto de ácidos associados à parede celular quanto de ácidos lipoteicóicos (CUNDELL et al., 1995). Em *S. pneumoniae*, ChoP é responsável por mediar a aderência ao receptor do fator ativador de plaquetas (rPAF) e gerar uma sinalização na célula hospedeira através desse receptor (KADIOGLU et al., 2008).

3. Variação de Fase

Um processo crítico na patogênese das infecções causadas por *S. pneumoniae* é a capacidade deste patógeno de se adaptar a diversos microambientes no hospedeiro humano. O pneumococo coloniza a nasofaringe de humanos e pode disseminar-se localmente e causar infecções nos tratos respiratórios inferior e superior (OVERWEG et al., 2000). Porém, em algumas circunstâncias, esse microrganismo é capaz de ter acesso a corrente sanguínea, via vasos linfáticos cervicais, causando bacteremia e, ocasionalmente, infecções em outros órgãos. Além disso, é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e causar meningite (WEISER et al., 1994; OVERWEG et al., 2000).

Para patógenos do trato respiratório que freqüentemente causam infecções invasivas, a capacidade de sobreviver em diferentes microambientes no hospedeiro requer a regulação da síntese de importantes estruturas de superfície (OVERWEG et al., 2000). Em alguns desses microrganismos, entre os quais se

incluem os pneumococos, essa capacidade reversível de expressão ou variação de fase, permite que se notem diferenças em sua morfologia colonial (WEISER *et al.*, 1994). Essa mudança na morfologia colonial é altamente variável de cepa para cepa e parece ser independente das condições de crescimento *in vitro*, incluindo pH, temperatura e osmolaridade (OVERWEG *et al.*, 2000).

Em *S. pneumoniae*, dois fenótipos coloniais são efetivamente reconhecidos: transparente e opaco (WEISER & KAPOOR, 1999). A variação de fase tem sido analisada através da capacidade do pneumococo em colonizar a nasofaringe de camundongos, observando-se uma correlação entre a morfologia colonial *in vivo* e *in vitro*. Somente cepas transparentes são capazes de estabelecer uma densa e estável colonização na superfície mucosa nasofaríngea, quando comparada às cepas de fenótipo opaco. Isto pode ser explicado pela exacerbada ligação das cepas de fenótipo transparente aos receptores glicoconjugados presentes nas células epiteliais bucais, além de aderirem às células pulmonares do tipo II e às células endoteliais vasculares, bem como a diversos receptores que aparecem nas células após a liberação de certas citocinas (OVERWEG *et al.*, 2000).

Em contraste, a cepa variante opaco é mais virulenta em ensaios com animais, apresentando capacidade elevada de desencadear uma infecção sistêmica. Kim e colaboradores (1999) demonstraram que o alto poder de virulência da cepa variante opaco está provavelmente relacionado ao aumento da resistência à opsonofagocitose. Uma característica marcante de variantes apresentando fenótipo opaco é a grande produção de polissacarídeos capsulares, cuja expressão alcança níveis de duas a seis vezes maiores quando comparadas às variantes transparentes (WEISER & KAPOOR, 1999; ALEGRUCCI & SAUER, 2007). Na nasofaringe, podem ser encontradas duas sub-populações de cepas com fenótipos coloniais distintos: na parte externa da superfície mucosa, os variantes transparentes predominam, enquanto que no interior da mucosa nasal, a maioria das cepas apresenta fenótipo opaco (BRILES *et al.*, 2005; McELLISTREM, RANSFORD & KHAN, 2007). Em modelos animais (ratos) e em seres humanos, podem ser observados que variantes opacas expressando uma maior quantidade

de cápsula são mais resistentes à opsonofagocitose, e que essas cepas são selecionadas durante a transição da superfície mucosa para a circulação sanguínea (KADIOGLU *et al.*, 2008).

4. Epidemiologia das Infecções Pneumocócicas

As infecções causadas por *S. pneumoniae* continuam sendo associadas a índices significativos de morbidade e mortalidade em diversas regiões do mundo. Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization; WHO, 2007) estimou que 1,6 milhão de óbitos devido às infecções pneumocócicas, a cada ano, sendo 700.000 a 1 milhão em crianças com idade inferior a 5 anos em países em desenvolvimento. Em 1993, o pneumococo foi considerado o segundo principal patógeno causador de meningite em São Paulo (SP), com 1,5 casos por 100.000 indivíduos por ano (BRANDILEONE *et al.*, 1995). Na cidade de Salvador (BA), a incidência de meningite pneumocócica foi de 1,6 casos por 100.000 habitantes em faixas etárias variadas e 24,7% desses casos foram notificados em crianças menores de 5 anos por 100.000 habitantes, com o predomínio dos sorotipos 3 e 14, respectivamente (REIS *et al.*, 2002). Já em 2008, Reis e colaboradores realizaram um estudo sobre a transmissão de pneumococos em pessoas residentes em comunidades conhecidas popularmente como “favelas” em Salvador. Os autores observaram que cerca de 36% dos indivíduos eram colonizados por *S. pneumoniae*, sendo os sorotipos predominantes o 19F, 6A, NT (não tipável), 23F, 18C e 34. Estima-se que, entre 1983 e 2003, o Brasil teve 29.600 casos de meningite causada por pneumococos em crianças menores de 1 ano, com 8.554 mortes (BRICKS & BEREZIN, 2006). Além disso, em 2004, a frequência de crianças menores de 5 anos hospitalizadas devido à pneumonia causada por pneumococo foi de 2.500/100.000, e o índice de mortalidade devido a doenças respiratórias alcançou 25/100.000, nessa faixa etária (BRICKS & BEREZIN, 2006).

Com a introdução em 1999, da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b no programa de imunização brasileiro, o pneumococo passou a ser a segunda causa de meningite, sendo superado apenas pela *Neisseria meningitidis*, com índice anual de 10 casos por 100 crianças acima de 1 ano de idade, e com cerca de 27,5% de mortalidade (BRANDILEONE *et al.*, 2003).

A distribuição dos sorotipos entre amostras de origem clínica varia de acordo com o país, idade do paciente e manifestação clínica. Em estudo realizado por Bogaert e colaboradores (2004a), ficou evidente que a ordem de predominância dos diferentes sorotipos pode variar de acordo com as localidades. Exemplos disso são representados pelo que foi observado em estudos realizados na Grécia, onde os sorotipos prevalentes entre crianças menores de 2 anos foram 6B, 19F, 23F, 14 e 18C, enquanto que, em estudos realizados nos Estados Unidos (EUA), os sorotipos prevalentes foram 6B, 14, 19F e 23F. Em países da África, como Quênia, o sorotipo 13 foi o prevalente, seguido dos sorotipos 15, 14, 6B e 19F. Em um estudo realizado na cidade de São Paulo no período de 1997 a 2001, no qual foram analisadas amostras provenientes de crianças com idade inferior à 5 anos de idade e com doença pneumocócica invasiva (DPI), os sorotipos 14, 1, 5 e 23F constituíram 72,5% das amostras isoladas de casos de DPI (BEREZIN *et al.*, 2007). De uma maneira geral, no Brasil os sorotipos que são mais freqüentemente associados com colonização e infecção em crianças, além de serem os mais freqüentemente associados com a resistência aos antimicrobianos, são: 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F (KLUGMAN & KOORNHOF, 1988; DAGAN *et al.*, 2003). Em estudos realizados em nosso laboratório (DIAS, 2007c; KEGELE, 2008), foi observado o predomínio do sorotipo 14 entre amostras provenientes, sobretudo, dos Estados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo. Adicionalmente, amostras desses sorotipos apresentaram índices crescentes de susceptibilidade reduzida à penicilina.

5. Resistência aos Antimicrobianos

Até meados da década de 1960, o tratamento das infecções pneumocócicas era realizado com sucesso com base no uso de penicilina. A partir da década de 1970, surgiram os primeiros relatos de cepas resistentes à penicilina e, desde então, é cada vez mais freqüente o isolamento dessas cepas (CASTAÑEDA, PEÑUELA & VELA, 1998; APPELBAUM, 2002; CAMARGOS *et al.*, 2006).

O índice de pneumococos resistentes à penicilina pode variar expressivamente entre regiões geográficas distintas. Em países da América do Sul, como Uruguai, Argentina, Chile e Colômbia, as taxas de resistência são em torno de 20% (CAMARGOS *et al.*, 2006), enquanto que, em países da Europa, como Espanha e Hungria, os índices de amostras resistentes à penicilina giram em torno de 40 a 59%, respectivamente (CASTAÑEDA, PEÑUELA & VELA, 1998). Estudos realizados com amostras isoladas na década de 1990 na região sudeste do Brasil demonstraram um índice inferior a 1% na prevalência de pneumococos apresentando resistência plena à penicilina (SESSEGOLO *et al.*, 1994; BRANDILEONE *et al.*, 1998).

A maioria dos dados disponíveis sobre a resistência dos pneumococos a penicilina ainda são os baseados nos critérios de interpretação propostos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* até 2007 (CLSI, 2007). No entanto, em 2008, pontos de cortes diferenciados foram estabelecidos pelo CLSI. Foram propostas mudanças que poderão influenciar amplamente a interpretação de aspectos epidemiológicos da resistência à penicilina em *S. pneumoniae*. Os novos critérios sugeridos pelo CLSI diferenciam a interpretação dos resultados entre amostras provenientes de pacientes com meningite e amostras provenientes de outros quadros clínicos que não a meningite. Para amostras isoladas de casos de meningite, o critério sugere que amostras com concentração inibitória mínima (CIM) $\geq 0,12\mu\text{g/mL}$ sejam consideradas plenamente resistentes e exclui o critério de interpretação de resistência intermediária. Já para as amostras isoladas de

casos de “não meningite”, o novo critério sugere que amostras com CIMs $\leq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$ sejam consideradas susceptíveis, amostras com CIMs = $4,0$ $\mu\text{g/mL}$ sejam consideradas como apresentando resistência intermediária, e amostras com CIMs $\geq 8,0$ $\mu\text{g/mL}$ sejam consideradas plenamente resistentes. A título de ilustração das diferenças de interpretação, entre os novos critérios, pode ser citado o trabalho de Velásquez e colaboradores (2008) no qual foram estudadas amostras de pneumococos isoladas de crianças colonizadas. Os autores observaram que o percentual de amostras susceptíveis à penicilina seria de 42,4%, caso fossem utilizados os critérios propostos para amostras isoladas de líquido cefalorraquidiano (LCR), ou de 94,6%, caso fossem empregados os critérios recomendados pelo CLSI para amostras isoladas a partir de outros sítios.

A penicilina é um antibiótico pertencente à classe dos β -lactâmicos, que atuam inibindo a síntese da parede celular de bactérias. O *S. pneumoniae* apresenta um complexo mecanismo de resistência a estes antimicrobianos, caracterizado por mutações nos genes que codificam para as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). As PBPs são enzimas associadas à membrana que atuam na polimerização e transpeptidação das cadeias de peptidoglicano durante as etapas finais da biossíntese da parede celular (NICHOL, ZHANEL & HOBAN, 2002). Os β -lactâmicos são capazes de interagir com essas PBPs inativando-as e, conseqüentemente, impedindo o processo de síntese da parede celular.

Já foram identificadas seis PBPs diferentes em *S. pneumoniae*: PBP 1a, 1b, 2a, 2b, 2x e 3. As cepas resistentes a esses antimicrobianos apresentam alterações genéticas nas PBPs e, por conseguinte, perda de afinidade do antimicrobiano ao seu sítio de ligação (HAKENBECK *et al.*, 1999). Em geral, o padrão de resistência de uma determinada cepa em particular é resultante da interação de várias PBPs, apresentando diversos graus de modificação. Mutações apenas no gene que codifica a PBP2x são suficientes para tornar os pneumococos menos sensíveis às cefalosporinas (TRZCINSKI, THOMPSON & LIPSITCH, 2004). Barcus e colaboradores (1995) evidenciaram que alterações nas PBPs 2x, 2b e 1a acarretam a resistência níveis elevados de penicilina.

Em amostras clínicas de pneumococos resistentes, as PBPs alteradas são codificadas por genes variantes que diferem em até 25% da seqüência de nucleotídeos original, o que resulta em uma diferença de aproximadamente 10% na seqüência de aminoácidos da proteína (HAKENBECK, 1997). Em laboratório, podem ser selecionados mutantes resistentes à penicilina gerados a partir de mutações pontuais nos genes *pbps*. No entanto, mutações pontuais únicas não são encontradas em amostras clínicas resistentes. O motivo para este evento não acontecer ainda é desconhecido, mas uma provável explicação está no fato de que uma simples mutação confere um pequeno aumento na resistência, não sendo significativa para as condições encontradas pelo pneumococo *in vivo* (HAKENBECK *et al.*, 1999).

Devido à emergência de cepas resistentes à penicilina, a terapia recomendada para o tratamento desses casos consiste no uso de eritromicina. A eritromicina é um macrolídeo que possui ação bactericida, inibindo a síntese protéica, pois quando fixada à subunidade 50S, impede os movimentos de translocação. Os macrolídeos têm sido comumente recomendados para o tratamento de pneumonia e outras infecções respiratórias (GAY *et al.*, 2000), mas a crescente resistência a esta classe de antimicrobianos é também relatada desde o final da década de 1980.

Dois mecanismos de resistência aos macrolídeos são reconhecidos em *S. pneumoniae*: o efluxo ativo da droga, resultando no fenótipo M, e a metilação do sítio alvo do antimicrobiano, resultando no fenótipo MLS_B (SANTAGATI *et al.*, 2000; AMEZAGA *et al.*, 2002; MONTANARI *et al.*, 2003; DANEMAN *et al.*, 2006). O mecanismo de efluxo é resultante da expressão dos genes da classe *mef*, que é caracterizada pela resistência aos macrolídeos e sensibilidade às lincosaminas e à estreptogramina B (SANTAGATI *et al.* 2000). Em pneumococos, já foram identificados os genes *mef(A)* e *mef(E)* que são responsáveis por codificar proteínas transportadoras associadas à membrana, as quais atuam no bombeamento do antimicrobiano para fora da célula. Estes dois genes apresentam 90% de homologia e são carregados por elementos genéticos distintos

(DALY *et al.* 2004). O gene *mef(A)* é carregado por um elemento genético presente no cromossomo designado *Tn1207.1*, o qual é considerado um *transposon* não conjugativo (SANTAGATI *et al.* 2000). Por outro lado, o gene *mef(E)* é carregado por um elemento de inserção cromossômica designado *mega* (*macrolide efflux genetic assembly*) (DEL GROSSO *et al.*, 2002).

O produto do gene *erm* é capaz de metilar resíduos de adenina altamente conservados, presentes no centro peptidil transferase do rRNA 23S recém-sintetizado. Essa metilação bloqueia a ligação dos macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B (GAY & STEPHENS, 2001). Em pneumococos, o gene codificador de metilases predominantemente encontrado é o *erm(B)*, enquanto que o gene *erm(A)* [subclasse *erm(TR)*] é encontrado com menor frequência (RANTALA *et al.*, 2005). A resistência designada MLS_B em pneumococos é determinada principalmente pelo gene *erm(B)*, que é carregado usualmente por um *transposon* conjugativo *Tn1545*, responsável também por carrear mais dois genes determinantes de resistência: o *tet(M)*, que codifica a resistência à tetraciclina, e o *aphA3*, que codifica a resistência à canamicina (MARIMÓN *et al.*, 2006).

A co-resistência às três classes de antimicrobianos do grupo MLS pode ser constitutiva, quando a enzima metilase é produzida continuamente, ou então pode ser induzida, quando é requerida a presença de um antimicrobiano indutor para que a enzima seja sintetizada (SEPPALA *et al.*, 1998). Com isso, pode se identificar o fenótipo MLS_B indutivo e o fenótipo MLS_B constitutivo, este último caracterizado pela resistência em níveis elevados.

Outros possíveis mecanismos de resistência aos macrolídeos em pneumococos incluem mutações no domínio II ou V do rRNA 23S ou ainda nos genes que codificam as proteínas ribossomais L4 e L22 (RANTALA *et al.*, 2005). Entretanto, o número de amostras apresentando alterações ribossomais ainda é pequeno, quando comparado com os de outros mecanismos de resistência.

A tetraciclina é um antimicrobiano com amplo espectro de ação (PRADIER *et al.*, 1997), eventualmente ainda usado para tratamento de infecções

pneumocócicas. O mecanismo predominante que confere resistência à tetraciclina é decorrente de interações de proteínas citoplasmáticas com a subunidade 30S do ribossomo que fica protegido contra a ação do antimicrobiano (MONTANARI *et al.*, 2003). Tais proteínas denominadas TetM ou TetO são codificadas pelos genes *tet(M)* e *tet(O)*, respectivamente, sendo *tet(M)* aquele predominantemente encontrado entre amostras de pneumococos (DOHERTY *et al.*, 2000).

Um mecanismo de bomba de efluxo, que reduz a concentração intracelular de tetraciclina é menos comum em estreptococos, sendo mediado por proteínas de membrana codificadas pelos genes *tet(K)* ou *tet(L)* (MONTANARI *et al.*, 2003).

Devido ao evidente aumento de cepas resistentes aos antimicrobianos mais utilizados para o tratamento empírico de infecções pneumocócicas, novos antimicrobianos estão sendo empregados no tratamento de pacientes suspeitos de serem portadores de cepas multi-resistentes, entre eles a levofloxacina e a moxifloxacina. Esses antimicrobianos pertencem à classe das fluoroquinolonas, e possuem grande eficácia contra pneumococos (APPLEBAUM, 2002). A resistência do *S. pneumoniae* às quinolonas é conhecida por ocorrer devido a dois mecanismos, os quais podem estar presentes concomitantemente em uma única cepa. A resistência mediada por gene cromossômico pode ocorrer por alterações nos genes que codificam para ambas as sub-unidades da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) ou topoisomerase IV (*parC* e *parE*) (LaPLANTE *et al.*, 2007). Porém, em pneumococos, a mais comum é a resistência devido a mutações nos genes *gyrA*, *parC* ou em ambos (REINERT *et al.*, 2005). Um mecanismo de resistência às quinolonas por bomba de efluxo também é reconhecido, sendo codificado pelo gene *pmrA* em *S. pneumoniae* (LaPLANTE *et al.*, 2007).

A resistência ao cloranfenicol também é encontrada entre amostras de *S. pneumoniae* e foi relatada, pela primeira vez, em meados da década de 1970. A resistência está associada com a produção de uma enzima que promove a conversão desse antimicrobiano em um composto não funcional, incapaz de se ligar à subunidade 50S do ribossomo. Esta enzima, denominada cloranfenicol

acetiltransferase (CAT), é codificada pelo gene *cat* (MATTHEWS, BAKER & THORNSBERRY, 1988). Em amostras de *S. pneumoniae* resistentes ao cloranfenicol, o gene *cat* está presente no *transposon* conjugativo *Tn5253* (AYOUBI, KILLIC & VIJAYAKUMAR, 1991).

O sulfametoxazol e o trimetoprim são agentes antimicrobianos muito utilizados, geralmente em combinação (co-trimoxazole), para o tratamento de infecções do trato respiratório, em países em desenvolvimento, principalmente devido à sua eficácia e baixo custo. As sulfonamidas são análogos estruturais do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e apresentam ação bacteriostática. Seu mecanismo de ação constitui um bom exemplo de inibição competitiva, pois podem atuar na reação no lugar do PABA, competir pela enzima diidropteroato sintetase e formar análogos não funcionais do ácido fólico. A resistência a esses agentes se deve a alterações nos genes que codificam essa enzima, a qual perde a susceptibilidade à ação da droga (HUOVINEN *et al.*, 1995; KÄRPÄNOJA, *et al.*, 2008). Em contrapartida, o trimetoprim inibe a diidrofolato-redutase, uma enzima que atua na via metabólica do ácido dihidrofólico, componente essencial na síntese de ácidos nucléicos e aminoácidos. A resistência ao trimetoprim pode ter diversas explicações, entre elas a super produção da enzima bacteriana, aquisição do gene *dhfr*, o qual codifica a enzima, porém modificada, ou ainda uma combinação desses dois mecanismos (ADRIAN & KLUGMAN, 1997).

6. Profilaxia das Infecções Pneumocócicas

A importância das doenças pneumocócicas e o aumento da resistência bacteriana tiveram um papel crucial para o desenvolvimento de vacinas para prevenção dessas infecções (BRICKS & BEREZIN, 2006). A principal meta tem sido o desenvolvimento de vacinas efetivas para a utilização em indivíduos pertencentes aos diversos grupos de risco, incluindo idosos e imunocomprometidos. A colonização assintomática por pneumococos é bastante comum, especialmente em crianças, que, deste modo, atuam como importantes vias de transmissão horizontal do microrganismo (BOGAERT *et al.*, 2004b).

O papel essencial da cápsula como um fator de virulência do *S. pneumoniae* fez com que essa estrutura se tornasse alvo de grande interesse científico. Assim, as primeiras vacinas desenvolvidas se basearam na utilização de polissacarídeos capsulares, uma vez que possuem uma alta capacidade de estimular o sistema imune do hospedeiro. Anticorpos contra a cápsula mostram-se eficazes contra a infecção. No entanto, a proteção induzida pelas vacinas polissacarídicas é tipo específica, gerando limitações em função da ampla diversidade entre os sorotipos de *S. pneumoniae* (BOGAERT *et al.*, 2004b).

Atualmente, as formulações vacinais disponíveis no mercado são: a vacina polissacarídica 23-valente e a vacina 7-valente conjugada, que incluem 23 e 7 tipos sorológicos respectivamente (BOGAERT *et al.*, 2004b). A vacina 23-valente apresenta os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, apresentando uma cobertura de aproximadamente 85-90% das cepas circulantes, mas apresenta importantes limitações, uma vez que é fracamente imunogênica em idosos e imunocomprometidos e não induz uma resposta imune satisfatória em crianças menores de 2 anos (BOGAERT *et al.*, 2004a). Essa vacina induz uma resposta imune de curta duração e não é capaz de ativar a memória imunológica, por induzir resposta células T independente (PLETZ *et al.*, 2008). A vacina 7-valente conjugada à proteína diftérica *cross-reacting material* (CRM) 197 inclui os sorotipos capsulares 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F e foi baseada nos sorotipos mais comumente encontrados em casos de infecções invasivas nos EUA e em países da Europa (BRANDILEONE *et al.*, 2003). Em 2001, tal vacina foi licenciada no Brasil, e, até o final de 2009, esteve disponível na rede privada e pública, com limitações. Na rede pública de saúde, sua disponibilidade é restrita a crianças que tenham doenças consideradas de alto risco, como pacientes com doença cardio-respiratória grave, imunodeficiência congênita ou adquirida ou asplenia (BRICKS & BEREZIN, 2006). Estima-se que tal vacina tenha um impacto significativo na redução de 60% das doenças pneumocócicas graves em crianças com idade acima de 5 anos no Brasil (BRANDILEONE *et al.*, 2004).

Como referido anteriormente, a colonização por pneumococos precede as infecções invasivas e de maior gravidade, e evidências de mudanças na prevalência de sorotipos colonizando a nasofaringe de crianças têm sido destacadas na literatura, notando-se uma substituição de sorotipos vacinais por sorotipos ausentes na vacina conjugada. Um exemplo é fornecido pelos dados de um estudo realizado na Alemanha, em que se verificou o aumento da prevalência do sorotipo 19A colonizando e causando infecções invasivas em crianças (PLETZ *et al.*, 2008). Essa mudança pode estar associada a erradicação quase completa de sorotipos vacinais em países onde a vacina conjugada faz parte do programa de vacinação nacional (PLETZ *et al.*, 2008).

No Brasil, em 2010, entrará no calendário nacional de vacinação a nova vacina conjugada 10-valente (<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>). Com nome comercial de *Synflorix*, esta vacina possui 10 tipos capsulares, incluindo aqueles presentes na 7-valente e mais os sorotipos 1, 5 e 7F conjugados à proteína D proveniente de *H. influenzae* não tipável. Essa vacina já foi liberada em alguns países, como Austrália, Chile, Finlândia, França, República Tcheca, e Noruega, mas poucos estudos têm sido realizados comprovando a eficácia na prevenção de infecções invasivas e na produção de anticorpos protetores (VESIKARI *et al.*, 2009).

Uma vacina conjugada 13-valente foi aprovada em fevereiro de 2010 pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm201758.htm> conforme acesso em 07 de março de 2010), para uso nos EUA. Na formulação dessa vacina, os sorotipos já presentes na vacina 7-valente conjugada foram acrescidos de seis outros sorotipos (1, 3, 5, 6A, 7F e 19A). Tais sorotipos são encontrados frequentemente como causa de doença pneumocócica invasiva, principalmente nos EUA e em alguns países da África e Europa (CDC, 2005; YARO, *et al.*, 2006; PÉREZ-TRALLERO, *et al.*, 2009).

Mais recentemente, um grande interesse tem sido direcionado para o desenvolvimento de vacinas baseadas em proteínas pneumocócicas que contribuem para a patogênese e que são comuns a todos os sorotipos. Essas proteínas, sendo antígenos T-dependentes, demonstram ser altamente imunogênicas e são capazes de ativar memória imunológica em crianças (OGUNNIYI *et al.*, 2007). Dentre essas proteínas investigadas quanto ao seu potencial vacinal, destacam-se aquelas associadas à virulência do microrganismo, tais como: PspA, LytA, Ply, SpuA, CbpA e o PsaA. Cada uma dessas proteínas tem mostrado níveis de proteção significativos em modelos animais. Entretanto, ainda não há estudos comparativos sobre a caracterização e avaliação dessas proteínas, e os resultados dos diferentes estudos parecem ser dependentes da amostra bacteriana e/ou dos animais utilizados nos experimentos (OGUNNIYI *et al.*, 2007).

A PspA tem sido extensivamente estudada devido a sua ocorrência em todas as amostras de origem clínica e ainda pela evidência de proteção em estudos com modelos animais e humanos, nos quais anticorpos anti-PspA foram capazes de proteger camundongos contra infecção sistêmica (McDANIEL *et al.*, 1998). Além disso, a proteção parece ser extensiva às infecções por amostras de diferentes sorotipos capsulares (McDANIEL *et al.*, 1998). Nabors e colaboradores (2000) imunizaram adultos saudáveis com recombinantes de PspA e conseguiram níveis de anticorpos apresentando reações cruzadas duráveis e detectáveis 6 meses após a vacinação. Contudo, ainda se faz necessário provar a aplicabilidade dessa proteína como componente na vacina anti-pneumococo.

Em relação à prevalência das diferentes famílias de PspA, em um estudo realizado com 368 amostras isoladas no Brasil, foi possível detectar as Fam 1 e Fam 2 entre amostras de 31 sorotipos capsulares diferentes, incluindo sorotipos de alta prevalência e sorotipos raramente encontrados em circulação no Brasil (BRANDILEONE *et al.*, 2004). Houve também uma predominância marcante de PspA da Fam 2 entre amostras pertencentes ao sorotipo 14, e entre amostras não susceptíveis à penicilina (BRANDILEONE *et al.*, 2004). Coral e colaboradores

(2001) analisaram amostras isoladas de crianças com DPI na Colômbia e constataram que todas, exceto uma amostra, eram pertencentes às famílias 1 ou 2. Já em um estudo de Hollingshead e colaboradores (2006), foram estudadas 1.847 amostras oriundas de diversas regiões geográficas, sobretudo países da América do Norte, Europa e Oceania, sendo observado que 40,5% pertenciam à Fam 1, 58,8% à Fam 2 e 0,7% pertenciam às duas famílias. Esses resultados indicam que uma vacina contendo as proteínas PspA da Família 1 e Família 2 pode apresentar uma ampla cobertura das amostras circulantes em diversas regiões geográficas.

Considerando que PspAs de diferentes famílias apresentam reação cruzada restrita, é proposto que as vacinas constituídas por PspA devam incluir as principais famílias dessa proteína. Entretanto, para avaliar a adequação da PspA como possível antígeno vacinal será necessário primeiramente identificar as famílias de PspA prevalentes entre as amostras isoladas de diversas regiões geográficas no mundo (BRANDILEONE *et al.*, 2004).

7. Caracterização Molecular

Diversos métodos moleculares têm sido introduzidos para a caracterização de *S. pneumoniae*, contribuindo para um melhor entendimento da complexa diversidade desse microrganismo e, conseqüentemente, para esclarecimento de aspectos da epidemiologia, tratamento e prevenção das infecções pneumocócicas. Dentre os métodos, destacam-se a análise do perfil eletroforético de isoenzimas envolvidas em vias metabólicas essenciais (MLEE, “Multilocus Enzyme Electrophoresis”), a eletroforese em gel de agarose em campo pulsado (PFGE, “Pulsed-Field Gel Electrophoresis”), variantes da técnica de PCR (BOX-PCR, *pbp*PCR-RFLP), além do método de tipagem por sequenciamento de genes que codificam isoenzimas envolvidas em vias metabólicas essenciais (MLST, “Multilocus Sequence Typing”) (McDOUGAL *et al.*, 1992; VAN BELKUM *et al.*,

1996; MOISSENET *et al.*, 1997; ENRIGHT & SPRATT, 1998). Mais recentemente, a técnica de MLVA (“Multiple-locus VNTR Analysis; VNTR, “Variable Number of Tandem Repeats”) também é uma proposta alternativa na tipagem de pneumococo (KOECK *et al.*, 2005).

A aplicação de técnicas moleculares para a tipagem de pneumococos ganhou um impulso considerável após a criação, em 1997, do “Pneumococcal Molecular Epidemiology Network” (PMEN) (<http://www.sph.emory.edu/PMEN>), com o propósito de estabelecer a padronização de métodos para caracterização, nomenclatura e classificação de clones de pneumococos resistentes à antimicrobianos. Atualmente, são reconhecidos pelo PMEN 43 clones de disseminação internacional que contribuíram para o aumento da resistência (<http://www.sph.emory.edu/PMEN>), destacando-se aqueles que parecem ter surgido na Espanha durante os anos 80 (FENOLL *et al.*, 1991). Entre esses, estão incluídos os clones multi-resistentes pertencentes aos sorotipos 6B, 14 e 23F, e um clone do sorotipo 9V resistente à penicilina (COFFEY *et al.*, 1991; SOARES *et al.*, 1993; e TSOLIA *et al.*, 2002). O uso sistemático das técnicas moleculares preconizadas pelo PMEN tem auxiliado na investigação da relação clonal entre amostras com fenótipo de resistência a antimicrobianos, permitindo, dessa forma, rastrear a disseminação da resistência.

Amostras de pneumococo resistentes à penicilina, as quais são geneticamente relacionadas e possuem as mesmas formas alteradas de *pbp1a*, *pbp2X* e *pbp2B*, mas que diferem quanto ao sorotipo, já foram descritas (COFFEY *et al.*, 1991; SIBOLD *et al.*, 1992). Num estudo realizado por Coffey e colaboradores (1999), foi sugerido que amostras geneticamente relacionadas resistentes à penicilina, mas apresentando diferenças quanto ao sorotipo, surgiram devido a eventos de recombinação onde houve troca do *locus* de biossíntese capsular (*cps*).

Camou, Hortal & Tomasz (1998) analisaram 61 amostras de *S. pneumoniae* do sorotipo 14 resistentes à penicilina e oriundas de diferentes áreas geográficas

do Uruguai. Análises através de PFGE confirmaram uma relação genética entre essas amostras e permitiram estabelecer uma relação com a amostra de referência M13P, representante do clone Spain^{9V}-3. Tal clone é também freqüente entre amostras de pneumococos resistentes isolados na Argentina (ROSSI *et al.*, 1998). Amostras de pneumococos isoladas a partir de pacientes acometidos de doenças invasivas, de cinco regiões geográficas brasileiras, foram analisadas utilizando PFGE. Foi observada a disseminação de amostras resistentes distribuídas em quatro grupos clonais predominantes, distintos dos clones internacionais (BRANDILEONE *et al.*, 1998). É importante ressaltar que, neste estudo, duas amostras pertencentes ao sorotipo 14 foram identificadas como variantes do clone internacional Spain^{9V}-3. Recentemente, estudos realizados em nosso laboratório com amostras de *S. pneumoniae* do sorotipo 14 isoladas de diferentes estados brasileiros, no período entre 1988 e 2005, demonstraram que 50% das amostras analisadas eram geneticamente relacionada a uma amostra padrão, CDC Sp195, a qual era representante desse mesmo clone internacional (KEGELE, 2008). Em um estudo abrangendo cinco países da América Latina (Argentina, Brasil, Colômbia, México e Uruguai), foram investigadas 185 amostras de infecções invasivas pertencentes a diversos sorotipos, sendo o sorotipo 14 o segundo mais freqüente (ŽEMLIČKOVÁ, *et al.*, 2005). As técnicas moleculares foram de extrema importância para a caracterização dessas amostras, sendo que análise por MLST permitiu observar a ocorrência de amostras pertencentes a ST156, previamente reconhecidas como associadas ao sorotipo 9V, e que expressavam polissacarídeo capsular do sorotipo 14. Ainda nesse mesmo estudo, uma única amostra sensível à penicilina pertencente ao sorotipo 14 apresentou perfil alélico idêntico ao clone pandêmico Spain^{9V}-3, reconhecido como sendo resistente à penicilina (ŽEMLIČKOVÁ, *et al.*, 2005).

Fica evidente que a introdução de métodos de análise molecular trouxe importantes contribuições ao conhecimento de aspectos epidemiológicos desse microrganismo. A aplicação de diferentes métodos que permitam discriminar e caracterizar as variantes de *S. pneumoniae*, constitui hoje uma ferramenta essencial para o rastreamento de *S. pneumoniae* e para basear propostas de

controle das infecções pneumocócicas, sobretudo o desenvolvimento de novas vacinas.

OBJETIVOS

Dando continuidade aos estudos prévios realizados em nosso laboratório, o presente estudo teve como objetivo: determinar a diversidade genética entre amostras de *S. pneumoniae* pertencentes aos sorotipos 9N, 9V e 14, empregando a eletroforese em campo pulsado e a análise do polimorfismo dos alelos de *pspA*.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1- Implantar a técnica de análise do polimorfismo dos alelos de *pspA* (tipagem *pspA*), através da amplificação desses genes por PCR, como ferramenta molecular a ser adicionada ao conjunto de métodos moleculares para avaliação da diversidade genética de *S. pneumoniae*, já em uso em nosso laboratório;
- 2- Aplicar a metodologia acima referida para a avaliação da distribuição dos alelos de *pspA* entre amostras de *S. pneumoniae* pertencentes aos sorotipos 9N, 9V e 14, isoladas no Brasil, ao longo de um período de cerca de 15 anos;
- 3- Determinar os alelos de *pspA* predominantes entre os complexos clonais, identificados através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico empregando PFGE, e de ocorrência mais freqüente entre amostras de *S. pneumoniae* mencionadas no item anterior.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostras Bacterianas

Foram estudadas 290 amostras de *S. pneumoniae* pertencentes aos sorotipos 9N (n=30), 9V (n=59) e 14 (n=201), isoladas entre os anos de 1988 a 2005, e que fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As amostras são provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, incluindo os estados do Espírito Santo, Paraíba, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Várias amostras de referência foram incluídas como controle ou para fins comparativos e estão mencionadas nos diferentes itens desta seção. As amostras estavam conservadas sob a forma de suspensões densas preparadas em solução contendo leite desnatado a 10% (Skim-Milk, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e 20% de glicerol (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S/A, Rio de Janeiro, Brasil) sendo mantidas à -180°C em tanques contendo nitrogênio líquido.

Para a recuperação das amostras, uma alíquota de cada suspensão foi removida do respectivo tubo criogênico de estoque e inoculada em placas contendo meio de cultura, com a seguinte composição: mistura especial de peptonas 23 g/L, amido 1 g/L, cloreto de sódio 5 g/L e agar 10 g/L, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Plast Labor, Ltda, Rio de Janeiro, RJ). As amostras foram submetidas à incubação à 37°C por 18-24 h em atmosfera contendo CO_2 a 5%.

2. Identificação das Amostras

A identificação fenotípica das amostras de *S. pneumoniae* incluídas neste estudo foi realizada em estudos prévios do laboratório e baseou-se na análise das

características morfológicas coloniais e celulares, na avaliação do tipo de hemólise em meio de ágar sangue de carneiro (ASC) e na análise das características nos testes de bile-solubilidade e de susceptibilidade à optoquina.

2.1. Caracterização morfológica colonial e celular e determinação da atividade hemolítica

Para avaliação das características morfológicas e tintoriais e da atividade hemolítica, as amostras foram semeadas em ASC e incubadas à 37°C, por 18-24 h em atmosfera contendo CO₂ a 5%. A partir de culturas, assim obtidas, foram observadas as características coloniais e a atividade hemolítica. Colônias α -hemolíticas, arredondadas, achatadas à medida que envelheciam, e, freqüentemente, exibindo uma depressão central foram consideradas como sugestivas de *S. pneumoniae* (FACKLAM & WASHINGTON II, 1991). Para a observação das características morfológicas celulares e tintoriais, foram preparados esfregaços em lâminas de microscopia, os quais foram corados pelo método de Gram, e observados com o auxílio de microscópio ótico.

2.2. Caracterização fisiológica

2.2.1. Teste de bile solubilidade

As amostras bacterianas foram semeadas em meio ASC e incubadas à 37°C, por 18-24 h em atmosfera contendo CO₂ a 5%. Uma suspensão bacteriana densa foi preparada em 1 mL de salina a 0,85% esterilizada e distribuída em dois tubos, contendo 500 μ l cada. Posteriormente, igual volume de solução de desoxicolato de sódio a 10% foi adicionado a um dos tubos e o mesmo incubado à 37°C por até 3 h. Ao segundo tubo, usado como controle, foram adicionados 500 μ l de salina a 0,85% esterilizada, e esse foi mantido sob as mesmas condições de incubação do tubo teste. A ocorrência de clareamento da suspensão bacteriana no tubo contendo desoxicolato de sódio, acompanhada da manutenção da turvação no tubo controle foi indicativa de teste positivo (ROUFF, WHILEY & BEIGHTON,

2003). A amostra *S. pneumoniae* ATCC 49619 foi utilizada como controle positivo e amostra *Streptococcus mitis* SS 429 foi utilizada como controle negativo.

2.2.2. Teste de susceptibilidade à optoquina

As amostras bacterianas foram semeadas em meio ASC, de forma a obter crescimento confluyente. A seguir, discos de papel de filtro impregnados com 5µg de cloridrato de etil-hidrocupreína (Cecon, Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda, São Paulo, Brasil) foram aplicados sobre a superfície dos meios inoculados. Após incubação por 18-24 h, à 37°C em atmosfera contendo CO₂ a 5%, as zonas de inibição ao redor do disco foram medidas. Amostras apresentando zonas de inibição de crescimento com diâmetro ≥14 mm foram consideradas como susceptíveis a optoquina. Como controles, foram utilizadas as mesmas amostras citadas no item anterior.

3. Caracterização Sorológica

A tipagem sorológica foi realizada pela técnica de aglutinação em látex e pela reação de Quellung, utilizando-se anti-soros específicos fornecidos pelo “Centers for Disease Control and Prevention”, Atlanta, GA, EUA, conforme instruções de Facklam & Washington II (1991). O sistema de nomenclatura utilizado para os sorotipos foi o dinamarquês.

Para tal finalidade, as amostras foram semeadas em ASC e incubadas à 37°C, durante 18-24 h em atmosfera contendo CO₂ a 5%. Suspensões densas foram preparadas em 300 a 500 µl de tampão PBS 0,01M, pH 7,2. Em lâmina de vidro, foram colocados 10 µl da suspensão a ser testada e 10µl do reagente contendo anticorpos específicos adsorvidos a partículas de látex. Após homogeneização dos reagentes, a lâmina foi mantida em movimentos rotatórios manuais, observando-se a ocorrência ou não de aglutinação. Para as reações de Quellung, 10 µl da suspensão bacteriana foram depositados sobre uma lâmina, acrescidos de 5 µl de azul de metileno a 0,3% e 10 µl de anti-soro específico.

Após a homogeneização, a preparação foi coberta com uma lamínula e observada ao microscópio ótico em objetiva de imersão. As reações iniciais foram realizadas com anti-soros polivalentes e, posteriormente, com os respectivos anti-soros individuais de tipo e, quando aplicável, com anti-soros para os diferentes fatores.

4. Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

4.1. Teste de difusão em agar

Foram utilizados discos de papel de filtro (Cecon) impregnados com eritromicina (15 µg) e oxacilina (1µg). A amostra padrão *S. pneumoniae* ATCC 49619 foi empregada como controle. Os testes foram realizados conforme as recomendações do CLSI (2007).

Para realização dos testes, as amostras foram semeadas em placas contendo ASC e incubadas à 37°C, por 18-24 h, em atmosfera de 5% de CO₂. A partir do crescimento obtido, suspensões com turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland foram preparadas em solução salina a 0,85% esterilizada. Com auxílio de “swabs” esterilizados, as suspensões foram semeadas em placas contendo àgar Mueller-Hinton (Difco Labs, Sparks, MD, EUA) adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (MH-SC), de maneira a obter crescimento confluyente e uniforme. Sobre a superfície dos meios inoculados foram aplicados os discos contendo os antimicrobianos e as placas foram incubadas à 37°C, por 18-24 h em atmosfera contendo CO₂ a 5%. A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com as recomendações do CLSI (2007).

4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de penicilina

As amostras que, segundo os testes de difusão em ágar empregando discos contendo oxacilina, apresentaram-se como não susceptíveis à penicilina foram submetidas a testes para a determinação das concentrações inibitórias mínimas, empregando a técnica do teste epsilométrico (E-Test).

Para a realização dos testes de susceptibilidade pela técnica do E-Test, as amostras foram semeadas em placas contendo ASC e incubadas a 37°C por 18-24 h em atmosfera contendo CO₂ a 5%. A partir do crescimento obtido, suspensões com turvação equivalente a da escala 0,5 de McFarland foram preparadas em solução salina a 0,85% esterilizada. Com auxílio de “swabs” esterilizados, as suspensões foram semeadas em placas de MH-SC, de maneira a obter um crescimento confluyente e uniforme. Sobre a superfície dos meios inoculados foram aplicadas fitas de E-Test (AB Biodisk; Dalvågen, Solna, Suécia) impregnadas com diferentes concentrações de penicilina (variando de 0,002 a 32 µg/ml). As placas foram incubadas à 37°C por 18-24 h em atmosfera contendo CO₂ a 5% e a leitura dos testes foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (2007).

5. Caracterização Molecular

5.1. Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A metodologia utilizada foi baseada naquela descrita por Teixeira e colaboradores (1997), com modificações. Amostras pertencentes aos clones internacionais reconhecidos pelo PMEN [CDC 200 (England¹⁴-9), CDC 195 (Spain^{9V}-3)], foram incluídas para fins comparativos.

Inicialmente, cada amostra foi semeada em placas contendo ASC e incubada à 37°C por 8-10 horas em atmosfera contendo CO₂ a 5%. As células foram suspensas em 500 µl de tampão PIV [NaCl 1M, Tris HCl 10mM (pH 7,6)] até a obtenção de uma suspensão equivalente à escala 10 de McFarland. Cada suspensão bacteriana foi misturada à igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve GTG Agarose; FMC BioProducts, Rockland, ME, EUA) a 2,5% e distribuída em moldes para a obtenção de blocos, que foram resfriados a 4°C.

Para a lise celular, os blocos foram colocados em 2mL de solução de EC [Tris-HCl 6 mM (pH 7,6), NaCl 1 M, EDTA 100 mM (pH 7,5), 0,5% (p/v) de Brij 58,

0,2% de desoxicolato de sódio, 0,5% de lauril sarcosinato de sódio acrescido de lisozima (1mg/mL; Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) e mutanolisina (5 U/mL; Sigma), e incubados por 18-24 h à 37⁰C sob leve agitação. Após esse período, a solução foi substituída por 2 mL de solução ESP [EDTA 0,5 M (pH8,0), 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio, proteinase K (0,2 mg/mL; Sigma)] e submetida à incubação por 24 h a 50⁰C. Esse procedimento foi repetido por mais 24 h em uma nova solução, totalizando um período de 48h de incubação em solução ESP. Antes do tratamento com a enzima de restrição, cada bloco foi lavado com tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH7,6), EDTA 0,1mM] por, pelo menos, 8 vezes, por um período de 1 h para cada lavagem, a 37⁰C sob agitação moderada. Posteriormente, cada bloco foi tratado com o tampão específico da enzima de restrição para que houvesse equilíbrio da reação por 2 h a 25⁰C. A seguir, o mesmo foi tratado com a enzima de restrição *Sma*I (New England BioLabs), durante 24 h a 25⁰C. Os blocos de agarose foram fundidos a 72⁰C e submetidos à eletroforese em campo pulsado em gel de agarose (GibcoBRL) a 1,2%, em tampão TBE 0,5x (Tris 0,89 M, EDTA 0,025 M e ácido bórico 0,89 M).

Para separação dos fragmentos cromossômicos, foi empregado um sistema de eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III; Bio Rad), seguindo os seguintes parâmetros: temperatura 11⁰C, gradiente de voltagem 6V/cm, tempo total de corrida de 20 h, com pulso inicial de 1s e pulso final de 30s. Padrões de tamanho de fragmento (Lambda Ladder PFG Marker, 50-1000Kb; New England BioLabs) foram utilizados.

Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre luz UV. Os perfis eletroforéticos obtidos foram inspecionados visualmente e posteriormente analisados com a ajuda de um sistema computadorizado de análise de imagens "Image Analysis System" através do programa "Molecular Analyst Fingerprinting Plus" versão 1.6 (Bio Rad).

5.2. Análise do polimorfismo do gene *pspA* (tipagem *pspA*)

5.2.1. Extração do DNA cromossômico

A obtenção do DNA foi baseada no protocolo descrito por Beall e colaboradores (1998), com modificações. A partir do crescimento obtido em placas de ágar sangue, foram preparadas suspensões bacterianas com turvação correspondente à escala 10 de McFarland em 300 µL de solução salina a 0,85% esterilizada. Em seguida, as suspensões foram submetidas à centrifugação por 5 min a 3.000 rpm. O sobrenadante foi então desprezado e o sedimento contendo as células foi ressuspenso em 90 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM), adicionado de 10 µL de uma solução de lisozima (10 mg/mL) e 5U de mutanolisina. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min e posteriormente submetidas a aquecimento por 3 min a 100°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 30 s e o sobrenadante foi usado como fonte de DNA molde para as reações de amplificação.

Algumas amostras que não apresentaram resultados satisfatórios em relação a sua amplificação foram submetidas à extração de DNA pelo kit comercial *illustra bacteria genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante.

5.2.2. Detecção dos alelos do gene *pspA* através de PCR

Para a detecção das três famílias de genes *pspA* foi utilizado o protocolo descrito por Pimenta e colaboradores (2006) com algumas modificações. As amostras de *S. pneumoniae* BG 9739 (Fam 1 – *clade* 1), DBL (Fam 1 – *clade* 1), EF 10197 (Fam 1 – *clade* 2), AC122 (Fam 2, *clade* 3), EF3296 (Fam 2 – *clade* 3), BG 11703 (Fam 2 – *clade* 4), BG 7561 (Fam 2 – *clade* 4), ATCC 6303 (Fam 2, *clade* 5), BG 6380 (Fam 3 – *clade* 6) foram usadas como referência, enquanto a amostra CH225 foi utilizada como controle negativo. Cada mistura de reação, no volume final de 25 µL, foi constituída de 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1U de “Platinum *Taq* DNA polimerase” (Invitrogen), 1x de tampão para PCR, 2,5 mM de

MgCl₂, 25 pmol de cada par de iniciadores e 1 µL de DNA molde. As amplificações foram realizadas em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA). Para os iniciadores LSM12 / SKH63, utilizados para a detecção do gene *pspA* da família 1, assim como para LSM12 / SKH52, utilizados para a detecção do gene da família 2, foi empregada a seguinte programação de reação: 1 ciclo de 3 min a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C para desnaturação, 1 min a 58°C para anelamento, 3 min a 72°C para extensão, seguidos de 1 ciclo de 10 min a 72°C para extensão final. Nos casos onde não houve reação positiva, a temperatura de anelamento foi modificada para 55°C. Uma terceira reação de PCR foi realizada com os iniciadores LSM12 / SKH2, para a detecção do gene das famílias 1, 2 e 3, com as mesmas condições de amplificação descritas acima, porém com modificação na temperatura de anelamento para 58°C. Amostras que apresentaram resultados negativos nas duas primeiras reações e positivos para esta última reação foram consideradas como pertencentes à família 3 de PspA. Os oligonucleotídeos iniciadores empregados estão listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo, assim como o tamanho esperado dos produtos de amplificação e as respectivas referências.

<i>Gene</i>	<i>Iniciadores</i>	<i>Sequências 5'-3'</i>	<i>Tamanho do Fragmento</i>	<i>Referência Bibliográfica</i>
<i>pspA</i> Fam 1	LSM12	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT	~1000pb	Swiatlo <i>et al.</i> , 1997 e Paine <i>et al.</i> , 2005
	SKH63	TTTCTGGCTCATY*AACTGCTTTC		
<i>pspA</i> Fam 2	LSM12	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT	~1200pb	Swiatlo <i>et al.</i> , 1997 e Paine <i>et al.</i> , 2005
	SKH52	TGGGGGTGGAGTTTCTTCTTCATCT		
<i>pspA</i> Fam1/2/3	LSM12	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT	~1400pb	Swiatlo <i>et al.</i> , 1997 e Hollinshead <i>et al.</i> , 2003
	SKH2	CCACATACCGTTTTCTTGTTCCAGCC		

Onde: *C ou T

5.2.3. Eletroforese dos produtos amplificados

Os produtos da PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (UltraPure Agarose, Gibco-BRL, Grand Island, New York, EUA), em tampão TBE (Tris, ácido bórico e EDTA) 0,5X em cuba horizontal (Minnie Gel Unit, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, EUA) sob uma corrente constante de 100V por 1h. O tamanho de cada fragmento foi estimado adicionando-se a cada gel o padrão de pares de bases 100 pb (Invitrogen). Após coloração com solução de brometo de etídio (Sigma) a 0,5µg/ml, por até 15 min, os géis foram fotografados sobre transiluminação com luz ultravioleta e observados visualmente.

RESULTADOS

Identificação e Caracterização Fenotípica das Amostras

Todas as 290 amostras incluídas nesse estudo apresentaram atividade α -hemolítica, com formação de halos esverdeados ao redor das colônias cultivadas em meio de ágar sangue; foram susceptíveis à optoquina, apresentando zonas de inibição do crescimento ≥ 14 mm, e solúveis na presença de desoxicolato de sódio a 10%.

Essas amostras pertencem à coleção de amostras de nosso laboratório, tendo sido isoladas em diferentes localidades brasileiras, ao longo de 15 anos, e foram selecionadas para inclusão no presente trabalho com base nas suas características sorológicas. Assim sendo, a amostragem estudada incluiu 201 (69,4%) amostras pertencentes ao sorotipo 14, 59 (20,3%) amostras pertencentes ao sorotipo 9V e 30 (10,3%) amostras pertencentes ao sorotipo 9N.

No sentido de facilitar a interpretação e comparação dos resultados, estes serão apresentados de acordo com o observado para o conjunto de amostras pertencentes a cada um dos três sorotipos incluídos no estudo.

Características das Amostras do Sorotipo 9N

Os dados referentes à localidade, ano e fonte de isolamento, assim como o perfil de susceptibilidade à penicilina, perfil de PFGE e resultado da tipagem *pspA*, para cada uma das amostras de *S. pneumoniae* pertencentes ao sorotipo 9N estão apresentados no **Anexo A**.

As 30 amostras pertencentes ao sorotipo 9N foram provenientes dos estados do Rio de Janeiro (RJ) (11 amostras; 36,6%), Rio Grande do Sul (RS) (10

amostras; 33,4%) e São Paulo (SP) (nove amostras; 30%). Foram isoladas entre os anos de 1988 a 2004, e as fontes de isolamento incluíram sangue (13 amostras), líquido (cinco amostras), escarro (cinco amostras), secreção de seio nasal e lavado brônquico (uma amostra, cada). A fonte clínica não foi especificada para cinco amostras.

Todas as amostras do sorotipo 9N incluídas neste estudo se apresentaram susceptíveis à eritromicina, e a maioria (27 amostras, 90%) também se apresentou susceptível à penicilina. Somente três (10%) amostras apresentaram resistência intermediária à penicilina (**Tabela 2**).

Os resultados da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das 30 amostras pertencentes ao sorotipo 9N, após PFGE, indicaram a predominância de um CC, denominado de Pen-A^{9N}, o qual englobou amostras apresentando três tipos de perfis de PFGE altamente relacionados. Nesse CC foram incluídas as três amostras não susceptíveis a penicilina (PEN-R), e a maioria (18 amostras, 66,7%) das 27 amostras susceptíveis a penicilina (PEN-S). As três amostras PEN-R apresentaram perfis de PFGE idênticos (perfil de PFGE Pen-A1), enquanto que as amostras PEN-S foram distribuídas entre os três tipos de perfis de PFGE que compunham o CC Pen-A^{9N}, com predominância do perfil de PFGE Pen-A1. Outras três amostras do sorotipo 9N e PEN-S foram incluídas num CC denominado de Pen-H^{9N} (contendo perfis de PFGE idênticos ou relacionados), enquanto que uma foi incluída no CC Pen-B^{9N} e outra no CC Pen-C^{9N}. As demais quatro amostras possuíam perfis de PFGE considerados de ocorrência esporádica por não apresentarem similaridade com os perfis predominantes encontrados entre as amostras incluídas neste estudo e que foram nomeados aleatoriamente (**Figuras 1 e 2**).

A avaliação da diversidade genética das amostras do sorotipo 9N, empregando a técnica de PCR para amplificação do gene *pspA* (tipagem *pspA*), revelou a ocorrência de produtos de amplificação com tamanhos que variaram entre 960 e 1000 pb para o gene da família 1 e entre 1200 e 1300 para aqueles da

família 2. Os genes *pspA* da família 2 foram os predominantes entre as amostras deste sorotipo, sendo encontrados em 28 (93,3%) amostras. As duas únicas amostras que carregavam gene *pspA* da família 1 foram isoladas em locais e períodos de tempo distintos: uma no Estado de SP, em 1991, e a outra no RS, em 2001. Aquela isolada no RS (Sp 1726) pertencia ao CC Pen-A^{9N}, predominante entre amostras desse sorotipo (**Tabela 2**), enquanto que a amostra isolada em SP (Sp 266) apresentou o perfil Pen-B1^{9N}.

Características das Amostras do Sorotipo 9V

As 59 amostras pertencentes ao sorotipo 9V foram isoladas nos estados do RJ (8; 13,5%), RS (27; 45,8%) e SP (21; 35,6%). O local de isolamento não foi especificado para três (5,1%) amostras. O período de isolamento compreendeu os anos de 1990 a 2004. As fontes de isolamento incluíram materiais clínicos indicativos de infecção (43 amostras; 72,9%), tais como sangue (21 amostras; 35,6%), líquido (oito amostras; 13,5%), escarro (cinco amostras; 8,5%), líquido pleural (quatro amostras; 6,8%), secreção traqueal (três amostra; 5,1%), e lavado brônquico (duas amostras; 3,4%), assim como secreção de orofaringe (11 amostras; 18,6%), que é um material indicativo de colonização. As fontes de isolamento não foram especificadas para cinco (8,5%) amostras.

Os dados referentes à localidade, ano e fonte de isolamento, assim como o perfil de susceptibilidade à penicilina, perfil de PFGE e resultado da tipagem *pspA*, para cada uma das amostras de *S. pneumoniae* pertencentes ao sorotipo 9V, incluídas neste estudo, estão apresentados no **Anexo B**.

Entre as 59 amostras do sorotipo 9V investigadas, 14 (23,7%) amostras foram não susceptíveis à penicilina, sendo sete amostras plenamente resistentes e sete amostras apresentando resistência intermediária (**Tabela 2**). Todas as amostras foram susceptíveis à eritromicina.

Os resultados obtidos pela análise molecular, empregando a técnica de PFGE indicaram que todas as 14 amostras não susceptíveis a penicilina (PEN-R) do sorotipo 9V apresentaram perfis que permitiam a sua alocação dentro de um único complexo clonal, denominado de CC Pen-H^{9V}, sendo que 10 amostras apresentaram perfis de PFGE idênticos (perfil Pen-H1^{9V}), três amostras apresentaram o perfil Pen-H2^{9V} e uma amostra o perfil Pen-H6^{9V}. Todas as 45 amostras sorotipo 9V susceptíveis à penicilina (PEN-S), também foram submetidas à análise por PFGE, verificando-se que 38 (80%) amostras pertenciam ao CC Pen-H^{9V}, sendo 28 (62,2%) com perfil Pen-H1^{9V} (**Figuras 1 e 2**). O perfil predominante (Pen-H^{9V}) entre as amostras do sorotipo 9V foi idêntico ao da amostra padrão CDC 195, representante do clone de disseminação internacional Spain^{9V}-3 (**Figura 2**).

Os testes de PCR para a determinação da família do gene *pspA* permitiram constatar o predomínio da Fam 2 entre as amostras do sorotipo 9V (54; 91,5% amostras). Considerando a distribuição do gene *pspA* entre os CCs observados para as amostras desse sorotipo, foi verificado que todas as amostras incluídas no CC Pen-H^{9V} foram caracterizadas como pertencentes à Fam 2 de *pspA* (**Tabela 2**). As cinco (8,5%) amostras que carregavam o gene *pspA* da Fam 1 apresentaram perfis distintos, não relacionados aos CC predominantes. As amostras classificadas como tendo genes *pspA* da Fam 1 foram isoladas em três estados diferentes, sendo três no estado do RJ, uma no estado do RS e outra em SP (**Figura 3A**). Tais amostras, oriundas do RJ e do RS, foram isoladas na década de 1990, enquanto a amostra oriunda de SP foi isolada no ano 2000 (**Figura 3B & Anexo B**).

Características das Amostras do Sorotipo 14

As 201 amostras pertencentes a este sorotipo foram isoladas de 6 diferentes estados brasileiros. O RS foi o estado que contribuiu com o maior número de amostras (95; 47,3%), seguido do RJ com 50 amostras (24,9%), SP contribuiu

com 46 (22,9%) amostras e os demais estados contribuíram com baixo número de amostras; Santa Catarina (SC; duas; 1%), Espírito Santo (ES; três; 1,5%) e Paraíba (PB; cinco; 2,5%). As amostras pertencentes ao sorotipo 14 foram isoladas durante todo o período considerado neste estudo (entre 1989 a 2005). A maioria delas (148 amostras; 73,7%) foi proveniente de fontes clínicas sugestivas de infecção invasiva, incluindo sangue (76 amostras; 37,8%), líquido (35 amostras; 17,4%), líquido pleural (14 amostras; 7%), líquido ascítico (três amostras; 1,5%), líquido pericárdico (uma amostra; 0,5%), entre outras (**Anexo C**). Um total de 16 (8,1%) amostras foi isolado de sítios anatômicos sugestivos de colonização, como secreção de orofaringe (nove amostras; 4,5%) ou de nasofaringe (sete amostras; 3,5%). Cinco (2,6%) amostras foram isoladas de espécimes clínicos não sugestivos de infecção invasiva, incluindo secreção ocular (três amostras; 1,5%) e secreção auricular (duas amostras; 1%). As fontes de isolamento de 31 (15,6%) amostras não foram especificadas.

Os dados referentes ao local, ano e fonte de isolamento, assim como o perfil de susceptibilidade aos dois antimicrobianos testados (eritromicina e penicilina), perfil de PFGE e resultado da tipagem *pspA*, para as amostras de *S. pneumoniae* pertencentes ao sorotipo 14, estão apresentados no **Anexo C**.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos revelaram que 112 (55,7%) das 201 amostras do sorotipo 14 eram não susceptíveis à penicilina, incluindo 72 (35,8%) amostras com resistência intermediária e 40 (19,9%) amostras com resistência plena (**Tabela 2**). Por outro lado, a resistência à eritromicina (ERI-R) foi detectada em 22 (10,9%) amostras. Somente três amostras se apresentaram simultaneamente não susceptíveis à penicilina e à eritromicina (**Anexo C**).

A análise da diversidade, empregando PFGE permitiu observar que, dentre as 112 amostras do sorotipo 14 não susceptíveis à penicilina, 82 (73,2%) foram incluídas no CC predominante, denominado de Pen-H¹⁴. O CC Pen-H¹⁴ comportou 10 perfis de PFGE, relacionados entre si, com a predominância do perfil Pen-H1¹⁴,

observado em 61 amostras (**Figura 4A**). Os demais perfis de PFGE foram representados por um número bem inferior de amostras e foram distribuídos nos seguintes perfis: Pen-H2¹⁴ (cinco amostras), Pen-H6¹⁴, Pen-H8¹⁴ e Pen-H11¹⁴ (três amostras cada), Pen-H9¹⁴ e Pen-H12¹⁴ (duas amostras cada), e Pen-H3¹⁴, Pen-H10¹⁴ e Pen-H13¹⁴ (uma amostra cada). As amostras do complexo Pen-H¹⁴ apresentaram-se geneticamente relacionadas com a amostra-padrão representante do clone de disseminação internacional Spain^{9V}-3.

Um segundo CC predominante entre amostras do sorotipo 14 foi o Pen-A¹⁴, que comportou 20 amostras, incluindo amostras não susceptíveis e algumas susceptíveis à penicilina. As amostras incluídas neste CC apresentaram cinco perfis de PFGE relacionados, sendo o perfil Pen-A1¹⁴ o prevalente com 13 amostras (**Figura 4B**). O perfil Pen-A4 foi observado em quatro amostras, enquanto que os perfis Pen-A5¹⁴, Pen-A6¹⁴ e Pen-A7¹⁴ foram representados por apenas uma amostra cada.

A **Figura 5** contém o dendrograma resultante da análise dos perfis de PFGE das amostras do sorotipo 14, não susceptíveis à penicilina, podendo ser observada a predominância destacada do CC Pen-H, seguida do CC Pen-A.

A análise das amostras do sorotipo 14 que apresentaram ERI-R, revelou o predomínio de um CC, denominado de Eri-A. Este CC compreendeu 19 das 22 amostras ERI-R, distribuídas em cinco perfis de PFGE, incluiu: o perfil Eri-A1, observado em 13 (54,5%) amostras; o perfil Eri-A2, observado em três (13,6%) amostras; e os perfis Eri-A3, Eri-A4 e Eri-A5, observados em apenas uma (4,5%) amostra cada (**Figura 6**). As três amostras restantes, que apresentaram resistência simultânea à penicilina, foram agrupadas dentro do CC Pen-H¹⁴, sendo duas com perfil Pen-H1¹⁴ e uma com perfil Pen-H10¹⁴ (**Figura 7**). Uma similaridade genética elevada foi constatada entre as amostras ERI-R pertencentes ao CC Eri-A e a amostra padrão (CDC 200) representativa do clone de disseminação internacional England¹⁴-9.

Sete amostras que apresentaram susceptibilidade reduzida à penicilina, mas não foram incluídas nos complexos predominantes citados anteriormente, foram distribuídas em sete perfis distintos, denominados de Pen-E, Pen-F, Pen-I, Pen-J, Pen-K, Pen-M e Pen-V, cada um representado por apenas uma amostra **(Anexo C)**.

Amostras representativas daquelas susceptíveis à penicilina e à eritromicina também foram submetidas à análise da diversidade pelo PFGE. Foram encontradas 19 perfis de PFGE, distribuídos entre 36 amostras susceptíveis a ambos os antimicrobianos em questão. Os perfis predominantes entre essas amostras foram: o perfil L com 11 (30,5%) amostras, o perfil C com oito (22,2%) amostras e o perfil S com quatro (11,1%) amostras. Não foi possível determinar o perfil de PFGE de 13 dessas amostras.

Como para as amostras dos demais sorotipos, os tamanhos dos produtos amplificados pela PCR para a detecção do gene *pspA* entre as amostras dos sorotipo 14 variaram, em geral, entre 960 e 1000 pb para o alelo *pspA* da Fam 1 (**Figura 8A**) e entre 1200 e 1300 para a Fam 2 (**Figura 8B**). Foi evidenciado que 125 (62,1%) das 201 amostras possuíam gene *pspA* da Fam 2, enquanto que 76 (37,8%) amostras possuíam alelos *pspA* da Fam 1. Considerando-se o local de isolamento dessas amostras, foi constatado que 31 das 50 amostras isoladas no estado do Rio de Janeiro apresentaram gene *pspA* da Fam 1, enquanto que as demais 19 amostras apresentaram gene *pspA* da Fam 2. Em contrapartida, o gene de Fam 2 predominou entre as amostras isoladas no estado do Rio Grande do Sul (75 amostras), enquanto os de Fam 1 foram encontrados em 20 amostras. As amostras isoladas nos estados da Paraíba (PB) e Espírito Santo (ES) foram classificadas como pertencentes à Fam 1 de *pspA*. As duas amostras do estado de Santa Catarina foram caracterizadas como pertencentes à Fam 2 de *pspA* (**Figura 9**). Foi também observado que as amostras carreadoras de alelos da *pspA* de Fam 1 foram detectadas a partir de 1989, enquanto as amostras caracterizadas como *pspA* de Fam 2 somente foram encontradas a partir de 1991.

A **Figura 10** ilustra a distribuição do gene *pspA* entre as amostras do sorotipo 14, isoladas ao longo do período considerado neste estudo (1989 a 2005).

Considerando os resultados derivados da análise por PFGE e a tipagem de *pspA*, foi constatado que os alelos da *pspA* da Fam 2 predominaram entre as amostras incluídas no CC Pen-H¹⁴, sendo encontrados em 77 (93,9%) amostras. Somente cinco (6,1%) amostras apresentaram gene *pspA* da Fam 1 (**Figura 11 & Tabela 2**). A amostra pertencente ao clone de disseminação global Spain^{9V}-3 também apresentou o gene *pspA* da Fam 2. Entre as amostras pertencentes ao CC Pen-A¹⁴, também predominaram o gene *pspA* da Fam 2, sendo encontrados em 17 (85%) amostras, enquanto somente três (15%) amostras apresentaram *pspA* da Fam 1 (**Figura 11 & Tabela 2**).

Quanto as 19 amostras pertencentes ao CC Eri-A, todas possuíam gene *pspA* da Fam 1 (**Tabela 2**). Entre as sete amostras não susceptíveis à penicilina, e que não foram incluídas nos CCs predominantes, quatro (57,1%) amostras apresentaram gene *pspA* da Fam 1, enquanto que três (42,9%) carregavam *pspA* da Fam 2.

Entre as 36 amostras que eram susceptíveis a ambos os antimicrobianos, eritromicina e penicilina, foi também verificada a predominância do gene da Fam 1, observados em 20 (55,6%) amostras, enquanto que os alelos de Fam 2 foram detectados em 16 (44,4%) amostras.

TABELAS

Tabela 2. Distribuição dos alelos do gene *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* susceptíveis e não-susceptíveis a penicilina, de acordo com os sorotipos e os principais complexos clonais identificados no presente estudo.

Variáveis	Numero (%) de amostras portadoras do alelo do gene <i>pspA</i>			
	Familia 1 (n = 84)		Familia 2 (n = 206)	
	NS Pen ^a	S Pen ^b	NS Pen	S Pen
Sorotipo				
9N (n = 30)	-	2 (6,6)	3 (10,0)	25 (83,4)
9V (n = 59)	-	5 (8,4)	14 (23,8)	40 (67,8)
14 (n = 201)	12 (6,1)	65 (32,3)	100 (49,7)	24 (11,9)
Perfil PFGE				
Eri-A ^c (n = 19)	-	19 (100,0)	-	-
Pen-A ^{9N} (n = 21)	-	1 (4,8)	3 (14,3)	17 (80,9)
Pen-A ¹⁴ (n = 20)	3 (15,0)	-	17 (85,0)	-
Pen-H ^{9N} (n = 50)	-	-	14 (28,0)	36 (72,0)
Pen-H ¹⁴ (n = 82)	5 (6,1)	-	77 (93,9)	-

^a Não susceptível a penicilina

^b Susceptível a penicilina

^c Somente amostras do sorotipo 14

FIGURAS

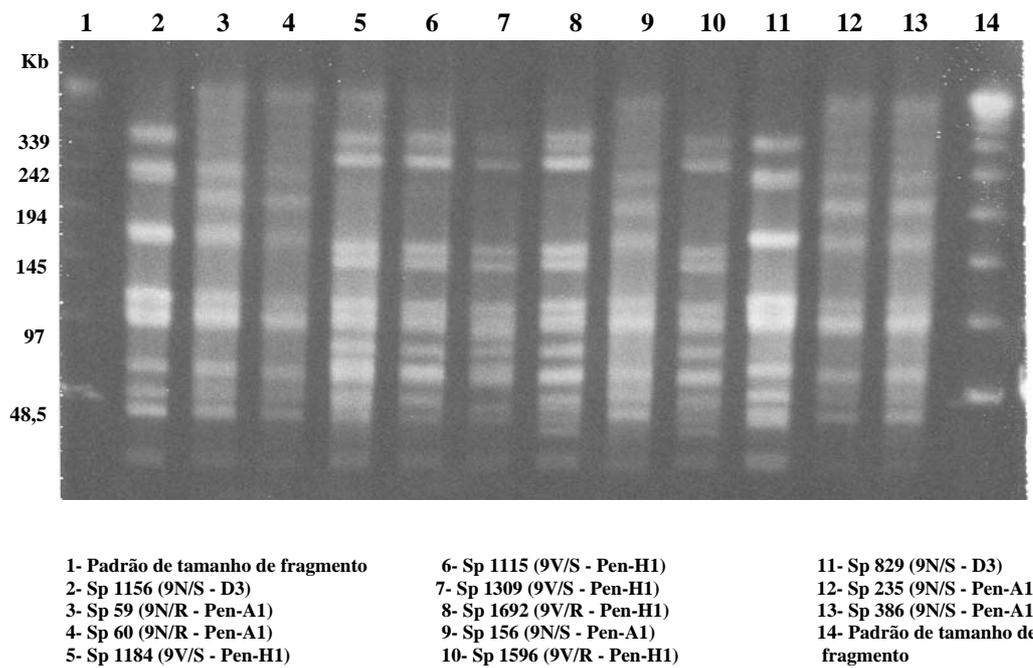


Figura 1. Perfis de PFGE representativos de amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes aos sorotipos 9N e 9V susceptíveis e não susceptíveis à penicilina, isoladas no Brasil.

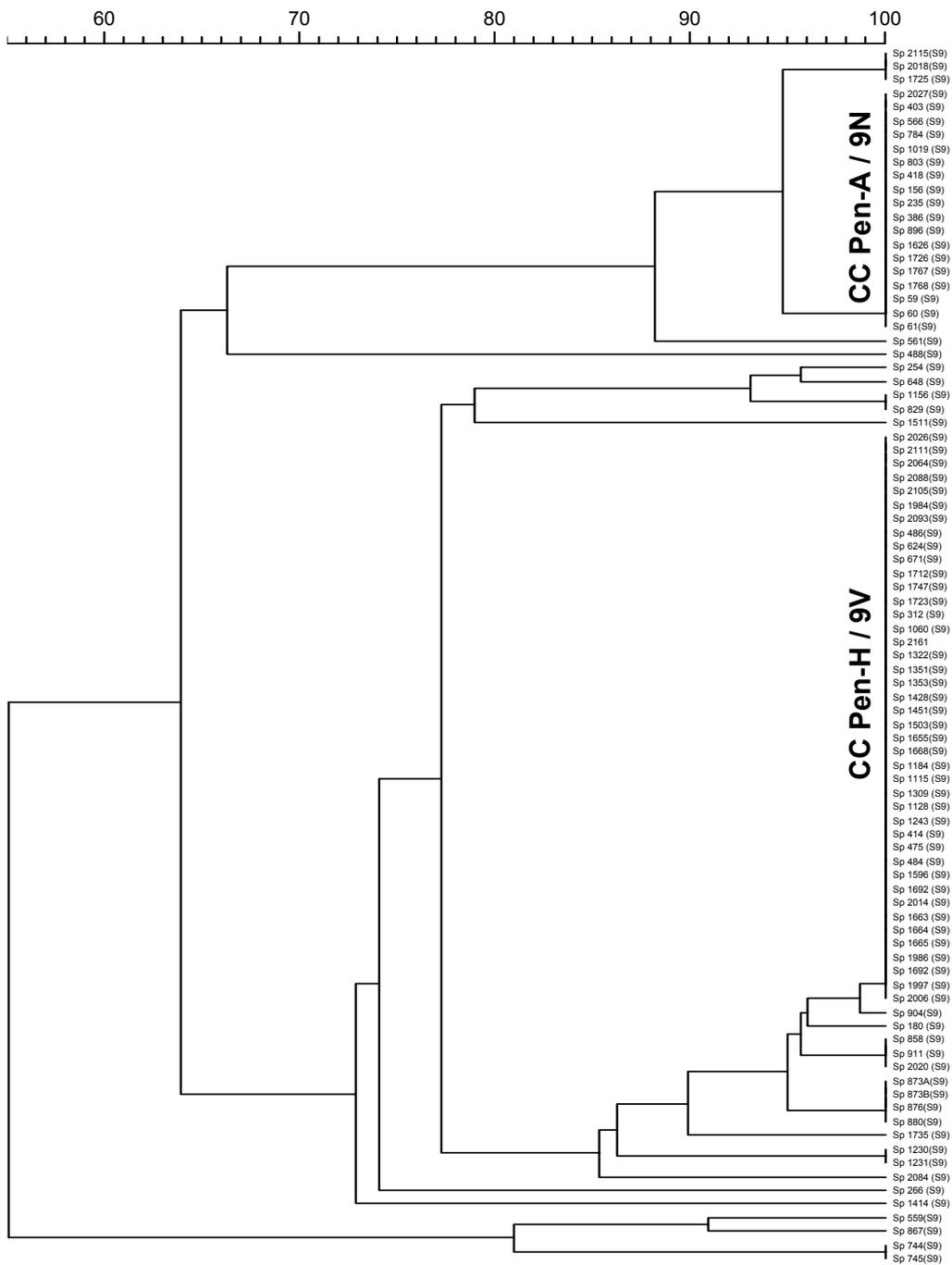
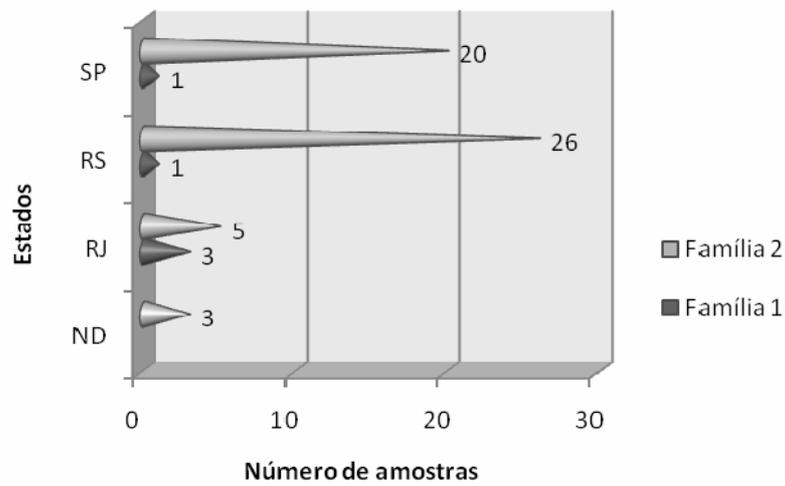


Figura 2. Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após PFGE, de amostras representativas de *Streptococcus pneumoniae* dos sorotipos 9V e 9N, susceptíveis PEN-S e não susceptíveis à penicilina, isoladas no Brasil.

A.



B.

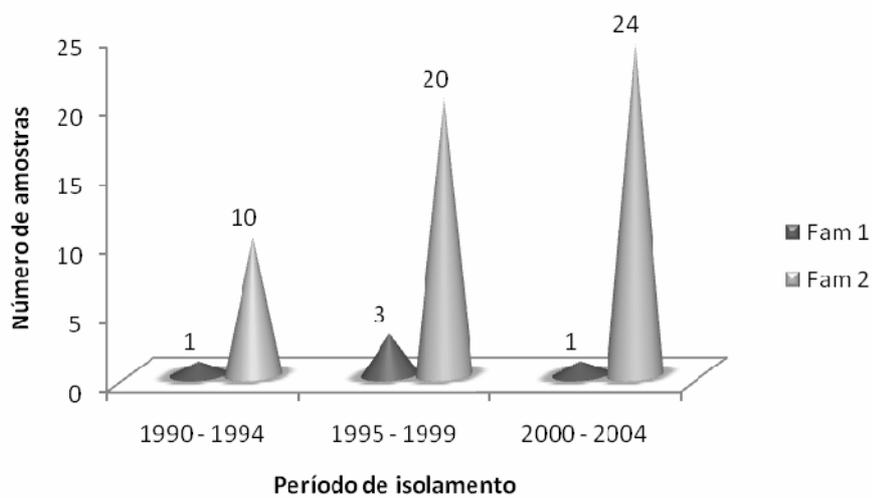
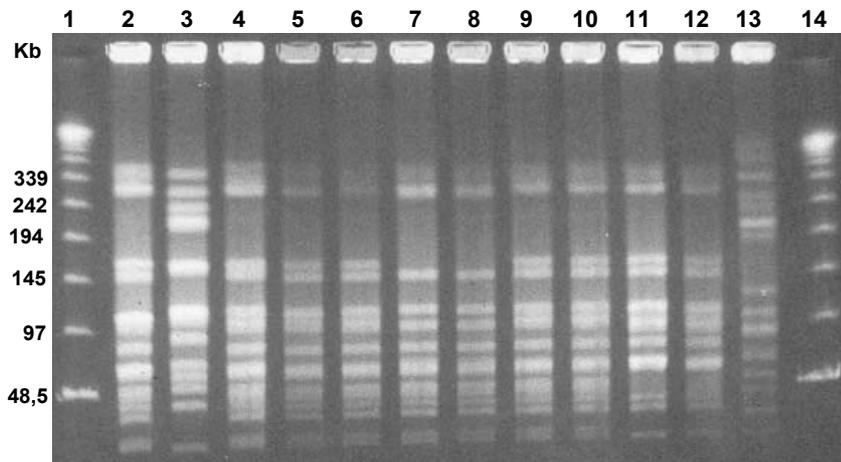


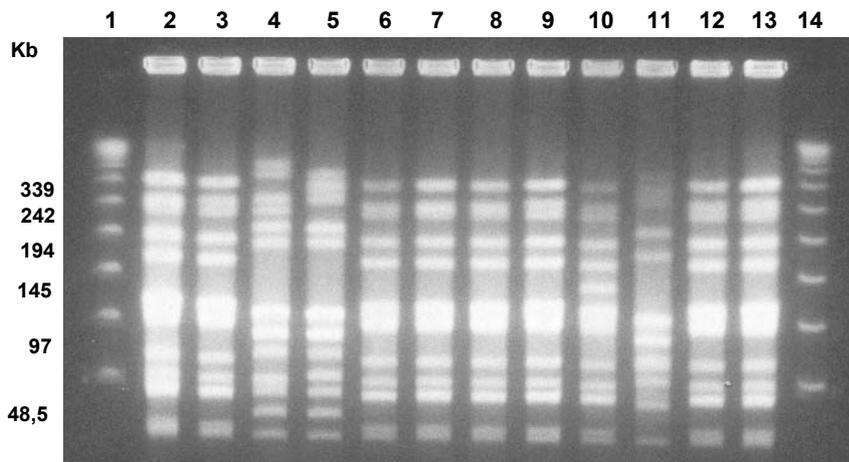
Figura 3. Distribuição dos alelos do gene *pspA* das famílias 1 e 2 entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 9V, de acordo com: **A.** As diferentes regiões geográficas; **B.** Os períodos de estudo.

A.



1- Padrão de tamanho de fragmento	6- Sp 1988 (Pen-H1)	11- Sp 2014 (Pen-H1)
2- Sp 1981 (Pen-H1)	7- Sp 2008 (Pen-H9)	12- Sp 2015 (Pen-H1)
3- Sp 1990 (Sensível)	8- Sp 2009 (Pen-H9)	13- Sp 2019 (Sensível)
4- Sp 1992 (Pen-H1)	9- Sp 2011 (Pen-H1)	14- Padrão de tamanho de fragmento
5- Sp 1993 (Pen-H1)	10- Sp 2013 (Pen-H1)	

B.



1- Padrão de tamanho de fragmento	6- Sp 387 (Pen-A1)	11- Sp 630 (Pen-A1)
2- Sp 416 (Pen-A1)	7- Sp 296 (Pen-A1)	12- Sp 515 (Pen-A1)
3- Sp 685 (Pen-A1)	8- Sp 296 (Pen-A1)	13- Sp 514 (Pen-A1)
4- Sp 274 (Pen-J1)	9- Sp 513 (Pen-A1)	14- Padrão de tamanho de fragmento
5- Sp 291 (Pen-K1)	10- Sp 436 (Pen-A7)	

Figura 4. Perfis de PFGE representativos de amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes ao sorotipo 14, não susceptíveis à penicilina, analisadas durante o período de estudo. **A-** Amostras pertencentes ao complexo clonal Pen-H; **B-** Amostras pertencentes ao complexo clonal Pen-A.

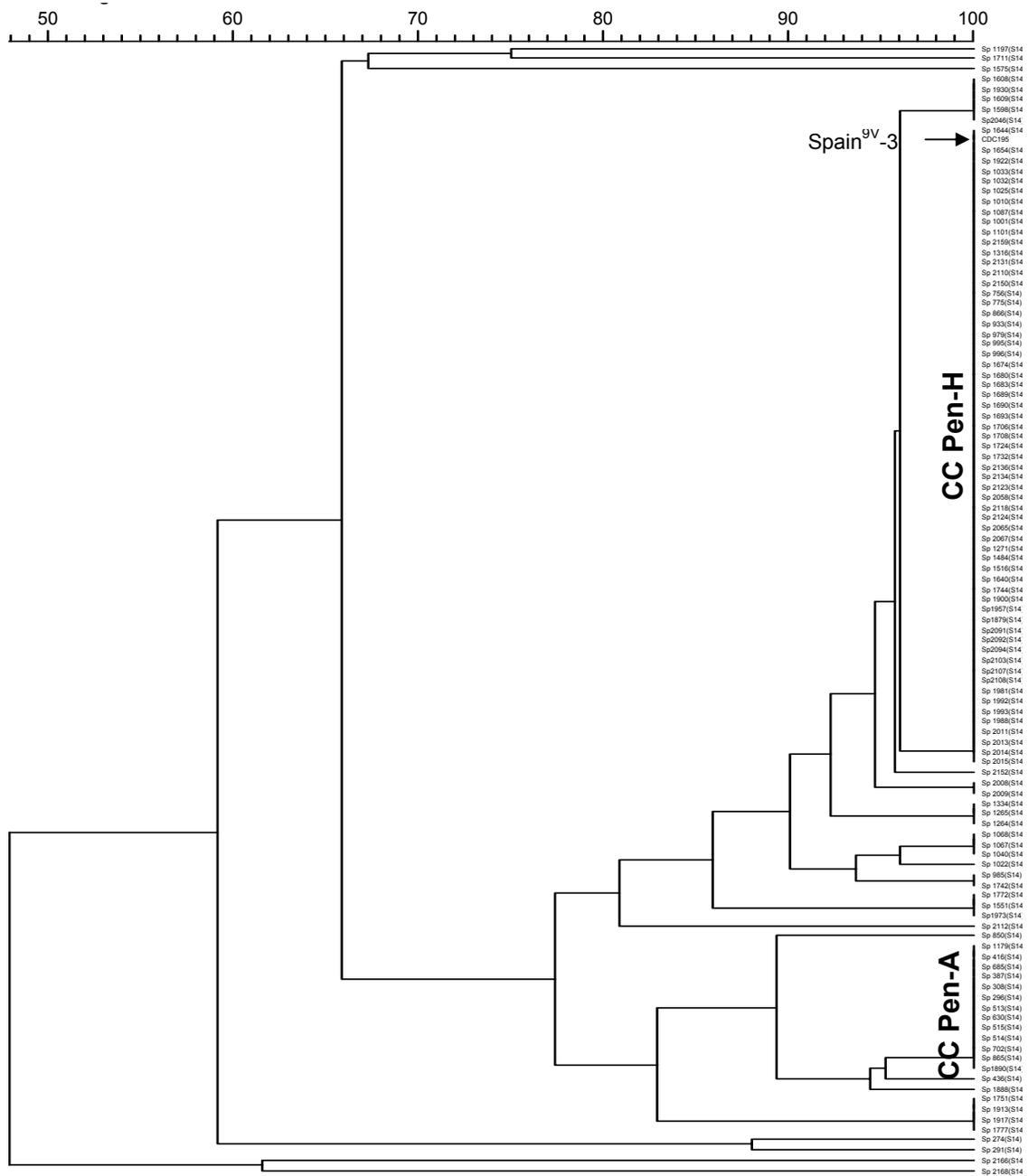


Figura 5. Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após PFGE, de amostras representativas de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 não susceptíveis à penicilina. A amostra referência do clone internacional Spain^{9V}-3 (CDC195), também está aqui representada.

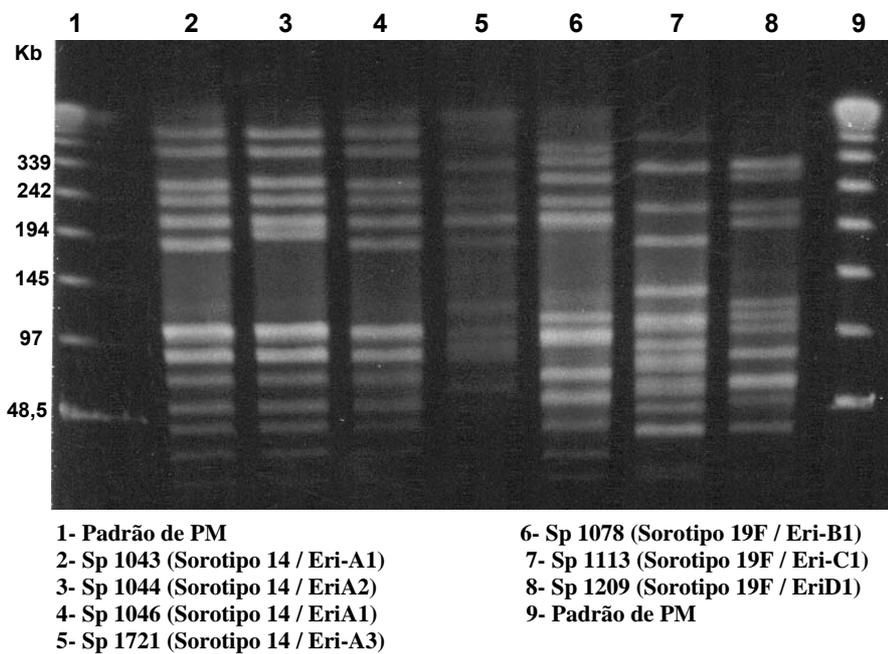


Figura 6: Perfis de PFGE representativos de amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 resistentes à eritromicina, incluídas no presente estudo.

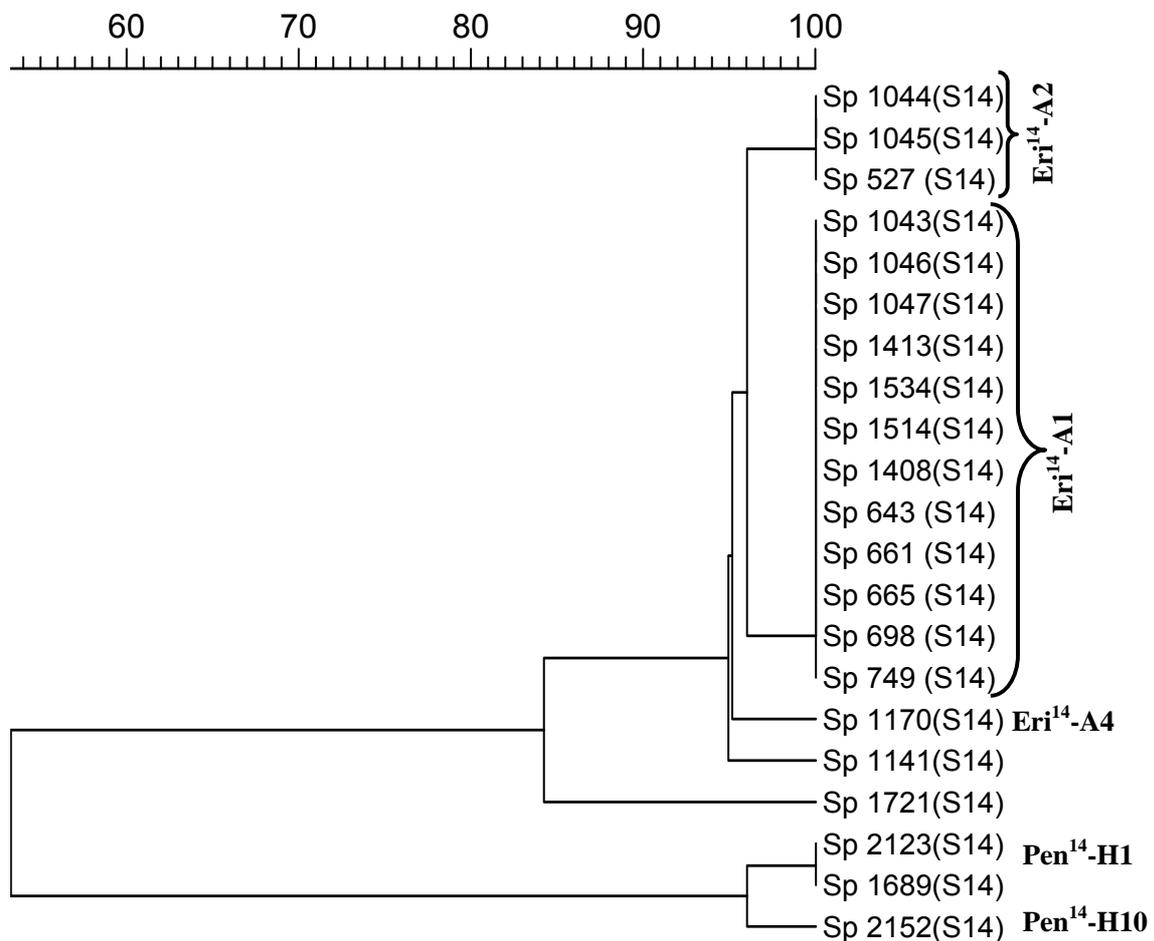
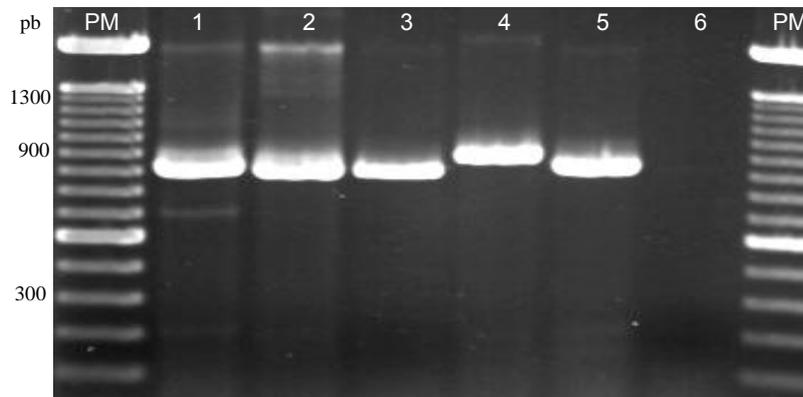


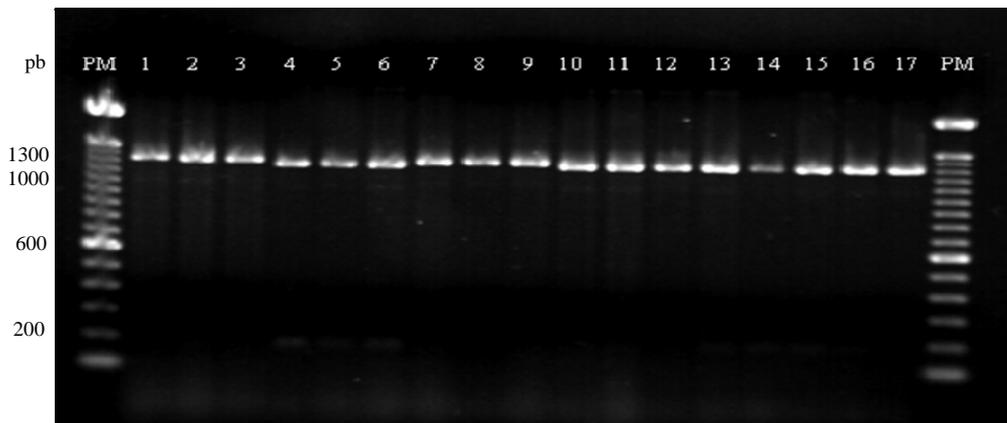
Figura 7: Dendrograma resultante da análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após PFGE, de amostras representativas de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 resistentes à eritromicina.

A.



PM: Padrão de tamanho de fragmento 3: Sp 1368 (Sorotipo 14) 6: Branco
1: Sp 1170 (Sorotipo 14) 4: Sp 2090 (Sorotipo 14)
2: Sp 1329 (Sorotipo 14) 5: EF 10197 (Controle +)

B.



PM: Padrão de tamanho de fragmento 6: Sp 1674 (Sorotipo 14) 12: Sp 1665 (Sorotipo 9V)
1: Sp 513 (Sorotipo 14) 7: Sp 59 (Sorotipo 9N) 13: Sp 1680 (Sorotipo 14)
2: Sp 514 (Sorotipo 14) 8: Sp 60 (Sorotipo 9N) 14: Sp 1683 (Sorotipo 14)
3: Sp 515 (Sorotipo 14) 9: Sp 61 (Sorotipo 9N) 15: Sp 1689 (Sorotipo 14)
4: Sp 1644 (Sorotipo 14) 10: Sp 1663 (Sorotipo 9V) 16: Sp 1668 (Sorotipo 9V)
5: Sp 1654 (Sorotipo 14) 11: Sp 1664 (Sorotipo 9V) 17: Sp 1692 (Sorotipo 9V)

Figura 8. Géis representativos dos resultados encontrados empregando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase para detecção do gene associados às diferentes famílias de PspA em amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes aos sorotipos 9N, 9V e 14. **A-** Gel representativo das amostras portadoras do gene *pspA* da Fam 1; **B-** Gel representativo das amostras portadoras do gene *pspA* da Fam 2.

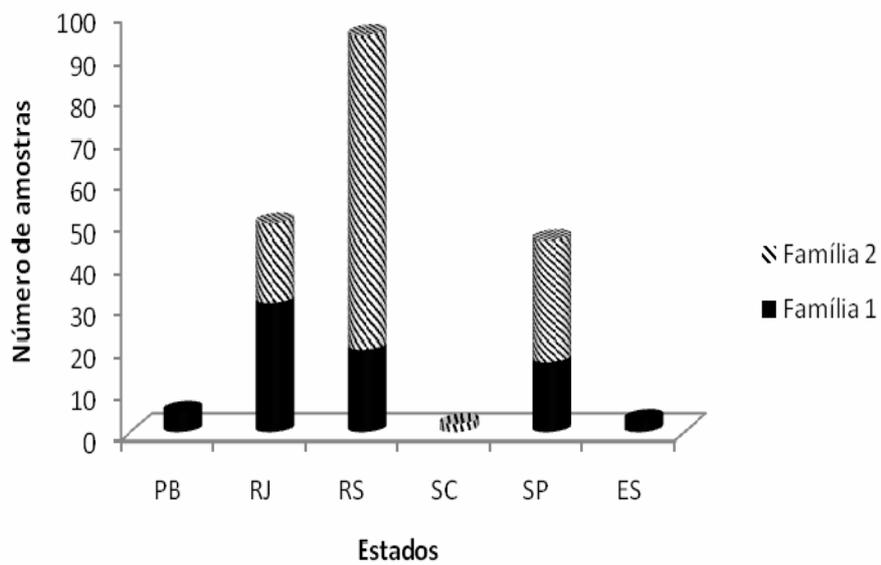


Figura 9. Distribuição dos alelos do gene *pspA* entre as amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencente ao sorotipo 14, incluídas no presente estudo, de acordo com o local de isolamento das amostras.

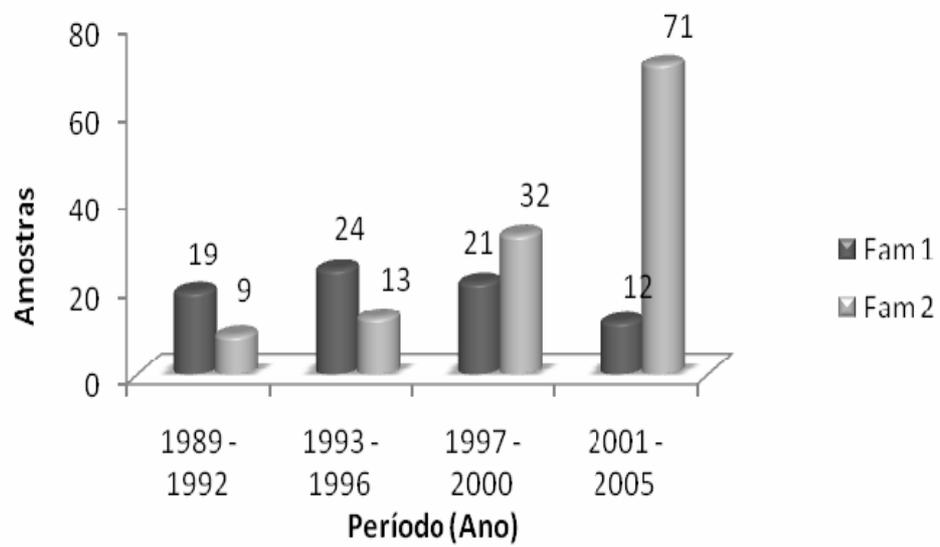


Figura 10. Distribuição dos alelos do gene *pspA* entre amostras de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes ao sorotipo 14, incluídas no presente estudo, de acordo com o período de isolamento.

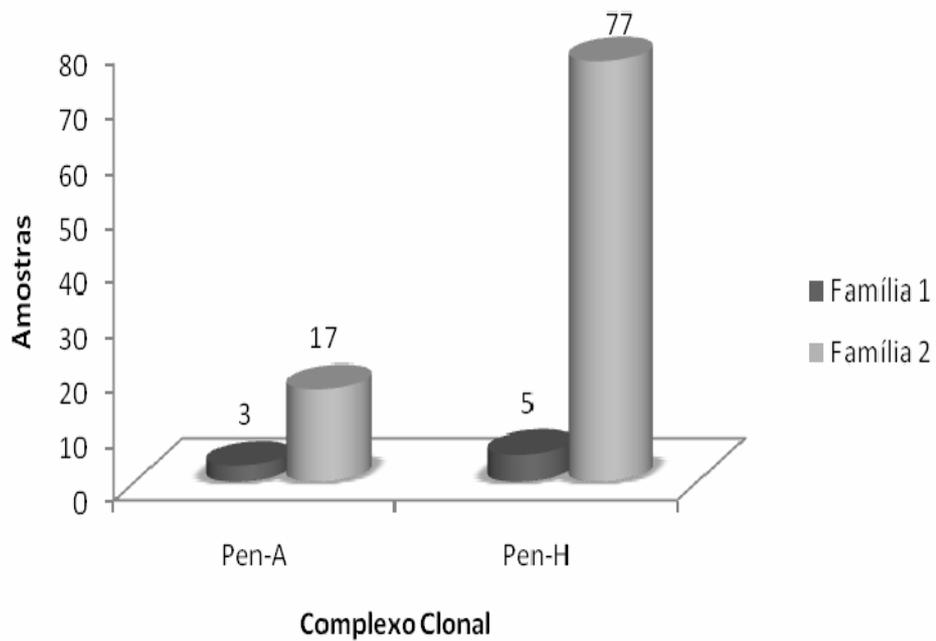


Figura 11. Distribuição dos alelos do gene *pspA* entre os principais complexos clonais identificados entre as amostras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina pertencentes ao sorotipo 14, e incluídas no presente estudo.

DISCUSSÃO

O *Streptococcus pneumoniae* é reconhecido como um importante patógeno causador de infecções graves e frequência elevada (CDC, 1997; BUTLER, DOWELL & BREIMAN, 1998). O esclarecimento de aspectos relacionados as suas características biológicas e a sua interação com o hospedeiro humano tornam-se, portanto, de extrema importância. O aumento significativo de amostras resistentes aos antimicrobianos mais utilizados para o tratamento dessas infecções reforça a necessidade de estudos epidemiológicos que incluem a determinação das características fenotípicas e genotípicas desse microrganismo.

Devido a complexidade peculiar das diferentes variantes de pneumococos, os estudos empregando metodologias moleculares são direcionados, frequentemente, à cada um dos sorotipos de prevalência significativa. O sorotipo 14, alvo principal do presente estudo, é reconhecido como o de maior prevalência em infecções invasivas, e também na colonização da nasofaringe de crianças, em várias localidades, incluindo o Brasil (LAVAL *et al.*, 2006; CAMARGOS *et al.*, 2006). Além disso, amostras do sorotipo 14 estão entre aquelas mais frequentemente associadas à resistência aos antimicrobianos, sobretudo à penicilina, o que reforça a importância de seu estudo detalhado. Os sorotipos 9N e 9V merecem destaque pelo seu relacionamento genético com amostras do sorotipo 14, assim como por sua significativa associação com doenças invasivas e crescente índice de resistência a um ou múltiplos antimicrobianos (BRANDILEONE *et al.*, 1998; KEGELE, 2008).

Atualmente, existem 4 formulações de vacinas anti-pneumocócicas disponíveis no mercado, porém nenhuma delas possui 100% de eficácia. A primeira vacina disponibilizada no mercado, a vacina polissacarídica 23-valente, abrange 23 polissacarídeos capsulares. Para contornar os problemas das vacinas compostas por polissacarídeos (DAGAN *et al.*, 2005), foram desenvolvidas formulações de vacinas contendo polissacarídeos conjugados a uma proteína

carreadora. Tais vacinas têm a limitação de possuírem até 13 polissacarídeos capsulares agregados a sua fórmula. A grande vantagem das vacinas conjugadas, em relação à vacina polissacarídica, é a presença de um antígeno timo-dependente, conferindo-lhe uma capacidade de estimular memória imunológica (BRICKS & BEREZIN, 2007; KNUF *et al.*, 2009). Entretanto, há a perspectiva de desenvolvimento de vacinas contendo componentes protéicos das próprias células de pneumococos e relacionados à sua virulência.

A investigação de fatores de virulência é de extrema importância para se conhecer o papel de cada um na patogênese, principalmente o das proteínas associadas à virulência (OGUNNIYI *et al.*, 2007). Estudos recentes demonstram que a pneumolisina é eficiente na indução de resposta imune protetora, principalmente, quando associada a proteínas de superfície, como a PsaA e PspA (BRILES *et al.*, 2003, BOGAERT *et al.*, 2004b). Em relação à autolisina, existem diversos dados controversos à respeito de suas propriedades imunoprotetoras (BOGAERT *et al.*, 2004b). Por serem citoplasmáticas, a autolisina e a pneumolisina não são expostas na superfície do pneumococo. Sendo assim, essas proteínas não podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro. No entanto, tais proteínas são altamente imunogênicas e, quando presentes na composição de uma vacina, podem ampliar a resposta imunológica.

A proteína PspA tornou-se uma importante candidata à inclusão em vacinas anti-pneumocócicas, uma vez que foi detectada na maioria das amostras estudadas (CORAL *et al.*, 2001; BRANDILEONE *et al.*, 2004; HOLLINGSHEAD *et al.*, 2006.; PIMENTA *et al.*, 2006; ROLO *et al.*, 2009). Em geral, quando se emprega metodologias de detecção do gene que codifica essa proteína, o número de amostras não típicas é muito baixo (MOLLERACH *et al.*, 2004; PAYNE *et al.*, 2005).

Nos experimentos preliminares realizados no presente estudo, um pequeno número de amostras foi negativo nos testes para a amplificação do gene *pspA*, em até 3 tentativas de amplificação. Porém, com algumas mudanças na metodologia

de extração e na temperatura de anelamento, todas as amostras tiveram seu gene *pspA* amplificado e classificado nas famílias 1 ou 2. Não foram encontradas amostras apresentando genes relacionados à *pspA* de família 3, o que poderia ser esperado, pois a detecção da *pspA* de Fam 3 é raramente descrita na literatura (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000).

A PspA tem sido destaque de diversos estudos, devido ao seu potencial como um promissor antígeno vacinal. Contudo sua variabilidade genética tem sido um empecilho, principalmente por haver variação na prevalência de determinadas famílias, em diferentes regiões geográficas (MELIN *et al.*, 2008). Portanto, é de grande importância destacar características em comum ou não entre as amostras, como por exemplo, sítio de isolamento e sorotipo da amostra. Um dado interessante e que merece ser destacado é que a prevalência de algumas famílias, até agora, se mostrou independente de fatores como sorotipo, sítio de isolamento, idade e sexo do paciente (CORAL *et al.*, 2001; BRANDILEONE *et al.*, 2004; HOLLINGSHEAD *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a maioria das amostras foi isolada de sítios sugestivos de infecção invasiva. Os genes *pspA* da família 2 foram os predominantes entre as amostras dos tres sorotipos estudados, independentemente do sitio de isolamento.

Diferenças na prevalência de algumas famílias, dependendo da região geográfica, já foram detectadas. No Brasil, os estudos descrevem o gene da Fam 2 como o mais encontrado (BRANDILEONE *et al.*, 2004; PIMENTA *et al.*, 2006). Isso também foi observado em alguns países como Espanha, EUA, França, Polônia e Suécia (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2006; SADOWY *et al.*, 2006). Por outro lado, o gene de Fam1 foi encontrado como prevalente na Argentina, Austrália, Japão e Reino Unido (MOLLERACH *et al.*, 2004; HOLLINGSHEAD *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2007).

Apesar da alta prevalência do gene *pspA* da Fam 2, observada no presente estudo, alguns aspectos relacionados às amostras pertencentes ao sorotipo 14 merecem destaque. Entre as amostras desse sorotipo, foram observados os

percentuais mais elevados de amostras não susceptíveis à penicilina e pertencentes a um único complexo clonal (Pen-H¹⁴), o qual apresentou estreita relação genética com o clone Spain^{9V}-3. Um percentual de 93,9% das amostras desse complexo carregava o gene *pspA* de Fam 2. Essas observações são concordantes com aquelas relatadas por Brandileone e colaboradores (2004), em que mais de 90% das amostras do sorotipo 14 relacionadas ao clone Spain^{9V}-3 também apresentaram o gene *pspA* de Fam 2. Em um estudo realizado na Argentina, foi possível incluir as amostras do sorotipo 14 não susceptíveis à penicilina em um único complexo clonal, o qual era composto por amostras que carregavam gene *pspA* da Fam 2 (MOLLERACH *et al.*, 2004). Nossos resultados corroboram, portanto, as observações descritas na literatura e suportam as evidências de que amostras relacionadas ao clone de disseminação global Spain^{9V}-3 tendem a expressar *pspA* de Fam 2.

Há poucos estudos realizados retratando a diversidade de *pspA* entre os clones designados pelo PMEN. No Brasil, até o momento, apenas no estudo de Brandileone e colaboradores (2004) foi abordada a questão da diversidade desse gene entre amostras de pneumococos não susceptíveis aos antimicrobianos e pertencentes a complexos clonais prevalentes. Um estudo realizado na Espanha, sugeriu que a *pspA* em amostras pertencentes a esses clones são altamente conservadas, principalmente após a observação de que amostras com ST diferentes e pertencentes aos sorotipos 14 e 9V carregavam genes da família 2 e *clade* 3 (ROLO *et al.*, 2009).

As amostras pertencentes ao CC Eri-A, observadas no presente estudo, apresentaram um resultado interessante. Somente *pspA* da família 1 foi observado entre as amostras pertencentes a este CC, incluindo a amostra representante do clone internacional England¹⁴-9, com o qual as amostras do CC Eri-A apresentaram relação genética. Esse dado, que seja do nosso conhecimento, ainda não foi relatado na literatura, e deve ser investigado posteriormente. Apenas em um estudo realizado no Japão (ITO *et al.*, 2007) foi relatada a ocorrência de amostras resistentes à eritromicina com CIMs \geq 128, e associadas,

predominantemente, a PspA de Fam 1. Contudo, o percentual de amostras foi de 77%, diferentemente dos nossos resultados, em que todas as amostras com tais características possuíam o gene de *pspA* da Fam 1. Outro resultado que merece destaque e investigações futuras refere-se as amostras não susceptíveis à penicilina e à eritromicina, concomitantemente. Essas amostras foram classificadas como pertencentes ao CC Pen-H¹⁴ e *pspA* de Fam 2. Estudos sobre a análise por MLST e seqüenciamento desse gene para definição de *clades* serão realizados com amostras deste CC, incluindo também amostras susceptíveis à eritromicina, para se obter informações mais detalhadas sobre a diversidade dessas amostras.

Dentre as amostras não susceptíveis à penicilina, porém não pertencentes aos CC Pen-H e Pen-A, foi possível detectar uma discreta predominância dos gene *pspA* da Fam 1. Além disso, as amostras susceptíveis a penicilina e eritromicina concomitantemente apresentaram predominância da Fam 1. Mollerach e colaboradores (2004) relataram uma forte associação entre PspA de Fam 1 e amostras susceptíveis à penicilina do sorotipo 14.

No presente estudo, aproximadamente 90% das amostras pertencentes ao sorotipo 9V apresentaram gene *pspA* da Fam 2. Esse resultado corrobora com aquele obtido em um estudo realizado na Argentina por Mollerach e colaboradores (2004). Além disso, todas as amostras pertencentes ao CC Pen-H^{9V} apresentaram o gene *pspA* de Fam 2. Apesar de pertencerem a este CC, apenas 23% apresentaram susceptibilidade reduzida à penicilina, levando-nos à conclusão de que o gene *pspA* parece ser bastante conservado entre amostras pertencentes a este CC, independente da susceptibilidade à penicilina, como alguns autores sugerem (ROLO *et al.*, 2009).

Em relatos da literatura, o sorotipo 9V tem sido sempre associado unicamente ao gene *pspA* da Fam 2 (CORAL *et al.*, 2001; PIMENTA *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2007; MELIN *et al.*, 2008). Em contraste, o sorotipo 9N é discretamente variável quanto à predominância de famílias. Enquanto 94% das amostras

apresentaram gene *pspA* da Fam 2, outros estudos apresentam resultados divergentes, relatando apenas *pspA* da Fam 1 entre amostras do sorotipo 9N (MELIN *et al.*, 2008) ou apenas *PspA* da Fam 2 (CORAL *et al.*, 2001; MOLLERACH *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2007), mas nunca ambos simultaneamente.

Quando foi considerada a distribuição do gene *pspA* de diferentes famílias entre amostras isoladas em diferentes estados, algumas observações foram singulares. Entre as amostras de pneumococos dos sorotipos 9N e 9V, 90% daquelas isoladas nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, pertencem à Fam 2 de gene *pspA*. Entre as amostras isoladas no Rio de Janeiro, 63% de amostras pertencentes ao sorotipo 9V foi classificada como Fam 2 de *pspA*, enquanto todas as amostras do sorotipo 9N isoladas nesse estado foram designadas como pertencentes a esta família. Em contrapartida, 64% das amostras do sorotipo 14 apresentaram gene *pspA* da Fam 1. O gene *pspA* da Fam 2 foi predominante entre amostras do sorotipo 14 isoladas nos estados do Rio Grande do Sul (79%) e de São Paulo (60%), além daquelas obtidas no estado de Santa Catarina, que foram constituídas exclusivamente por amostras carregando gene dessa família. Todas as amostras derivadas dos estados da Paraíba e Espírito Santo, foram classificadas como *pspA* de Fam 1.

Alguns estudos relatam infecções graves causadas por amostras de sorotipos relacionados aos presentes na vacina, tais como 19A e 6C, ou ainda por sorotipos não vacinais, como 15 e 22F. Uma vez que os indivíduos vacinados estarão protegidos contra os sorotipos da vacina, há uma provável substituição dos sorotipos presentes na vacina 7-valente conjugada por estes não vacinais (CDC, 2007; SINGLETON *et al.*, 2007; HSIEH *et al.*, 2009; JACOBS *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2009). A partir de 2009-2010, duas novas formulações vacinais estão disponíveis em diversos países (VESIKARI *et al.* 2009). Contudo, o aumento de indivíduos protegidos contra os novos sorotipos incluídos nestas vacinas pode favorecer o surgimento de novos sorotipos colonizando e/ou causando infecções graves. Esse fenômeno expressa bem a necessidade do desenvolvimento de

novas vacinas com a inclusão de novos antígenos associados ou não a polissacarídeos capsulares (MENG *et al.*, 2009) .

O uso da PspA como antígeno protéico vacinal, seja como componente único, ou como carreador, juntamente com polissacarídeos provenientes da cápsula dos pneumococos, pode oferecer uma abrangência maior de proteção contra diferentes amostras de diferentes sorotipos (BRANDILEONE *et al.*, 2004). Como as vacinas disponíveis no mercado não possuem 100% de cobertura dos sorotipos circulantes, uma vacina com componente protéico próprio do pneumococo pode ser de extrema importância na prevenção das infecções pneumocócicas. Atualmente diversos estudos têm sido realizados para a expansão do conhecimento das propriedades imunológicas da PspA. Considerando-se a grande diversidade na prevalência das famílias de proteínas PspA associadas a amostras multi-resistentes e geneticamente relacionadas a pneumococos de disseminação global, o monitoramento das famílias PspA seria oportuno para destacar qualquer alteração significativa na sua prevalência ao longo do tempo e assim antecipar o impacto da aplicação de estratégias de vacinação utilizando essa proteína como antígeno.

CONCLUSÕES

No presente estudo, uma metodologia de PCR foi adaptada e empregada para detectar os alelos do gene *pspA* entre amostras de pneumococos isoladas no Brasil. Sua utilização permitiu detectar a presença do gene *pspA* em todas as amostras estudadas;

O gene *pspA* da Fam 2 foi o predominante entre amostras pertencentes aos três sorotipos de pneumococos estudados, seguido pelo gene *pspA* da Fam 1. Nenhuma amostra portadora do gene *pspA* da Fam 3 foi detectada;

O gene *pspA* da Fam 2 prevaleceu entre amostras incluídas nos CC que predominaram entre as amostras do sorotipo 14, e em todas as amostras do sorotipo 9V, incluindo amostras com estreita relação genética com o clone de disseminação internacional Spain^{9V}-3, reconhecido pela sua ampla circulação em várias áreas geográficas;

As amostras do sorotipo 14 resistentes à eritromicina foram agrupadas em um único CC, que apresentou elevada relação genética com a amostra representante do clone internacional England¹⁴-9. Todas as amostras deste complexo foram caracterizadas como portadoras de gene *pspA* da Fam 1;

O gene *pspA* da Fam 1 foi predominante entre amostras do sorotipo 14 isoladas nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Paraíba, enquanto o gene *pspA* da Fam 2 predominou entre amostras isoladas nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina. Por outro lado, entre as amostras dos sorotipos 9N e 9V, houve o predomínio do gene *pspA* da Fam 2 em todos os 3 estados em que foram isoladas;

Não foram observadas restrições na distribuição dos alelos do gene *pspA* das diferentes famílias, em relação aos sorotipos;

Foram caracterizadas amostras pertencentes a CC predominantes e persistentes, em diferentes localidades brasileiras, entre as quais predominam os alelos do gene *pspA* de duas famílias (1 e 2). As informações obtidas podem basear estudos relacionados à seleção e à caracterização adicional de amostras de pneumococos a serem consideradas como possíveis candidatas para inclusão em uma vacina que utilize a PspA como antígeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAN, P.V. & KLUGMAN, K.P. **Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae***. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41: 2406–2413, 1997.
- ALLEGRUCCI, M. & SAUER, K. **Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms**. *J. Bacteriol.*, 189: 2030–2038, 2007.
- APPELBAUM, P.C. **Resistance among *Streptococcus pneumoniae* implications for drug selection**. *Clin. Infect. Dis.* 34: 1613–1620, 2002.
- AYOUBI, P.; KILLIC, A.O. & VIJAYAKUMAR, M.N. **Tn5253, the pneumococcal omega (cat tet) BM 60101 element, is a composite structure of the conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252**. *J. Bacteriol.*, 173: 1617–1620, 1991.
- BAYRAM, A.; KOCOGLU, E., BALCI, I.; FILIZ, A. & EKSI, F. **Real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples from patients with community-acquired pneumonia**. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 39: 452–457, 2006.
- BEALL, B.; FACKLAM, R.R.; JACKSON, D.L. & STARLING, H.H. **Rapid screening for penicillin susceptibility of systemic pneumococcal isolates by restriction enzyme profiling of the *pbp2B* gene**. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2359–2362, 1998.
- BEREZIN, E.N.; CARDENUTO, M.D.; FERREIRA, L.L.; OTSUKA, M.; GUERRA, M.L. & BRANDILEONE, M.C.C. **Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in São Paulo, Brazil**. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26: 643-645, 2007.
- BERRY, A.M.; LOCK, R.A. & PATON, J.C. **Cloning and characterization of *nanB*, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli***. *J. Bacteriol.* 178: 4854–4860, 1996.
- BERRY, A.M. & PATON, J.C. **Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins**. *Infect. Immun.* 68: 133-140, 2000.

- BOGAERT, D.; de GROOT, R. & HERMANS, P.W.M. ***Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease.** Lancet. Infect. Dis. 4: 144–154, 2004.
- BOGAERT, D.; HERMANS, P.W.M.; ADRIAN, P.V.; RUMKE, H.C. & de GROOT, R. **Pneumococcal vaccines: an update on current strategies.** Vaccine. 22: 2209–2220, 2004.
- BONGAERTS, R.J.M.; HEINZ, H.; HADDING, U. & ZYSK, G. **Antigenicity, expression, and molecular characterization of surface-located pullulanase of *Streptococcus pneumoniae*.** Infect. Immun. 68: 7141–7143, 2000.
- BOULNOIS, G.J.; PATON, J.C.; MITCHELL, T.J. & ANDREW, P.W. **Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*.** Mol. Microbiol., 5: 2611-2616, 1991.
- BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D.; ZANELLA, R.C.; LANDGRAF, I.M.; MELLES, C.E.A.; TAUNAY, A.E.; MORAES, J.C. & AUSTRIAN, R. **Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections over 16-year period in the greater Sao Paulo area, Brazil.** J. Clin. Microbiol. 33: 2789–2791, 1995.
- BRANDILEONE, M.C.C.; di FABIO, J.L.; VIEIRA, V.S.D.; ZANELLA, R.C.; CASAGRANDE, S.T.; PIGNATARI, A.C. & TOMASZ, A. **Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness.** Microbial Drug Resist. 4: 209–217, 1998.
- BRANDILEONE, M.C.C.; ANDRADE, A.L.S.S.; di FABIO, J.L.; GUERRA, M.L.L.S. & AUSTRIAN, R. **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, 2003.
- BRANDILEONE, M.C.C.; ANDRADE, A.L.S.S.; TELES, E.M.; ZANELLA, R.C.; YARA, T.I.; di FABIO, J.L.; & HOLLINGSHEAD, S.K. **Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines.** Vaccine. 22: 3890-3896, 2004.
- BRICKS, L.F. & BEREZIN, E. **Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases.** J. Pediatr. 82: 67-74, 2006.
- BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K.; NABORS, G.S.; PATON, J.C. & BROOKS-WLATER, A. **The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*.** Vaccine, 19: S87-S95, 2001.

- BRILES, D.E.; HOLINGSHEAD, S.K.; PATON, J.C.; ADES, E.W.; NOVAK, L.; van GINKEL, F.W. & BENJAMIN, W.H. Jr. **Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*.** J. Infect. Dis. 188: 339–348, 2003.
- BRILES, D.E.; NOVAK, L.; HOTOMI, M.; VAN GINKEL, F.W.; & KING, J. **Nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci.** Infect. Immun. 73: 6945 – 6951, 2005
- BUTLER, J.C.; DOWELL, S.F. & BREIMAN, R.F. **Epidemiology of emerging pneumococcal drug resistance: implications for treatment and prevention.** Vaccine. 16: 1693-1697. 1998.
- CAMARGOS, P.; FISHER, G.B.; MOCELIN, H.; DIAS, C. & RUVINSKY, R. **Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America.** Paed. Resp. Rev. 7: 209–214, 2006.
- CAMOU, T.; HORTAL, M. & TOMASZ, A. **The apparent importation of penicillin-resistant capsular type 14 Spanish/French clone of *Streptococcus pneumoniae* into Uruguay in the early 1990s.** Microbial Drug Resist. 4: 219 – 224, 1998.
- CARVALHO, M.G.; TONDELLA, M.L.; MCCAUSTLAND, K.; WEIDLICH, L.; MCGEE, L.; MAYER, L.W.; STEIGERWALT, A.; WHALEY, M.; FACKLAM, R.R.; FIELDS, B.; CARLONE, G.; ADES, E.W.; DAGAN, R. & SAMPSON, J.S. **Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA.** J Clin Microbiol., 45: 2460–2466, 2007.
- CASTAÑEDA, E.; PEÑUELA, I. & VELA, M.C. **Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Colombia: Presence of international epidemic clone.** Microbial Drug Resist. 4: 233–239, 1998.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Prevention of pneumococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).** MMWR MMWR Morb. Mort. Wkly. Rep. 46: 1-19, 1997.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease-United States, 1998–2003.** MMWR Morb. Mort. Wkly. Rep. 54: 893–897, 2005.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Emergence of antimicrobial-resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*-Massachusetts, 2001-2006.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Oct 19; 56(41):1077-1080, 2007.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeen informational supplement.** CLSI Publication M100-S17, M2-A10 and M7-A8. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement.** CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- COFFEY, T.J.; DOWSON, C.G.; DANIELS, M.; ZHOU, J.; MARTIN, C.; SPRATT, B.G. & MUSSER, J.M. **Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*.** Mol. Microbiol. 5: 2255–2260, 1991.
- COFFEY, T.J.; DANIELS, M.; ENRIGHT, M.C. & BRIAN, G.S. **Serotype 14 variants of the Spanish penicillin-resistant serotypes 9V clone of *Streptococcus pneumoniae* arose by large recombinational replacements of the *cpsA-pbp1a* region.** Microbiology 145: 2023–2031, 1999.
- COGNÉ, N.; CLAVERY, J.P.; DENIS, F. & MARTIN C. **A novel mutation in the α -helix 1 of the C subunit of the F1/F0 ATPase responsible for optochin resistance of a *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 38: 119–121, 2000.
- CORAL, M.C.V.; FONSECA, N.; CASTAÑEDA, E.; Di FABIO, J.L.; HOLLINGSHEAD, S.K. & BRILES, D.E. **Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children.** Emerg. Infect. Dis. 7: 832–836, 2001.
- CORLESS, C.E.; GUIVER, M.; BORROW, R.; EDWARDS-JONES, V.; FOX, A.J. & KACZMARSKI, E.B. **Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR.** J. Clin. Microbiol. 39: 1553–1558, 2001.
- CORTES, P.R.; ORIO, A.G.A.; REGUEIRA, M.; PIÑAS, G.E.; & ECHENIQUE, J. **Characterization of in vitro-generated and clinical optochin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentina.** J. Clin. Microbiol. 45: 1930-1934, 2008.
- CRAIN, M.J.; WALTMAN, W.D., 2ND; TURNER, JS.; YOTHER, J.; TALKINGTON, D.F.; MCDANIEL, L.S.; GRAY, B.M. & BRILES, D.E. **Pneumococcal surface protein A (Pspa) is**

serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 58:3293–3299, 1990.

- CRUM, N.F.; BARROZO, C.P.; CHAPMAN, F.A.; RYAN, M.A.; & RUSSELL, K.L. **An outbreak of conjunctivitis due to a novel unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* among military trainees.** Clin. Infect. Dis. 39: 1148–1154, 2004.

- CUNDELL, D.R.; WEISER, J.N.; SHEN, J.; YOUNG, A. & TUOMANEN I. **Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*.** Infect. Immun. 63: 757–761, 1995.

- DAGAN, R.; GIVON-LAVI, N.; ZAMIR, O. & FRASER, D. **Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers.** J. Pediatr. Infect. Dis. 22: 532–539, 2003.

- DAGAN, R.; GIVON-LAVI, N.; FRASER, D.; LIPSTICH, M.; SIBER, G.R. & KOHBERGER, R. **Serum serotype – specific pneumococcal anticapsular immunoglobulin G concentrations after immunization with a 9-valent conjugate vaccine correlate with nasopharyngeal acquisition of pneumococcus.** J. Infect. Dis. 192: 367–376, 2005.

- DALY, M.; DOKTOR, S.; FLAMM, R. & SHORTRIDGE D. **Characterization and prevalence of *mef(A)*, *mef(E)* and the associated *msr(D)* in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates.** J. Clin. Microbiol. 42: 3570–3574, 2004.

- DANEMAN N, MCGEER A, GREEN K, LOW DE; TORONTO INVASIVE BACTERIAL DISEASES NETWORK. **Macrolide resistance in bacteremic pneumococcal disease: implications for patient management.** Clin. Infect. Dis, 43: 432 – 438, 2006.

- DEL GROSSO, M.; IANELLI, F.; MESSINA, C.; SANTAGATI, M.; PETROSILLO, N.; STEFANI, S.; POZZI, G. & PANTOSTI, A. **Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*.** J. Clin. Microbiol. 40: 774–778, 2002.

- DENIS, G.A. & CAREY, R. **Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA probe.** J. Clin. Microbiol. 30: 2725–2727, 1992.

- DIAS, C.A.; AGNES, G.; FRAZZON, A.P.G.; KRUGER, F.D.; d'AZEVEDO, P.A.; CARVALHO, M.G.S.; FACKLAM, R.R.; & TEIXEIRA, L.M. **Diversity of mutations in the *atpC* gene coding for the c subunit of F₀F₁ ATPase in clinical isolates of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Brazil.** J. Clin. Microbiol. 45: 3065–3067, 2007.

- DIAS, C.A.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. & BEALL, B. **Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from brazilian children.** J. Med. Microbiol. 56: 1185–1188, 2007.
- DIAS, C.A. **Evolução da resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Streptococcus pneumoniae* isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.** Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- DOHERTY, N.; TRZCINSKI, K.; PICKERILL, P.; ZAWADZKI, P. & DOWSON, C.G. **Genetic diversity of *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*.** Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2979–2984, 2000.
- ENRIGHT, M.C. & SPRATT, B.G. **A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease.** Microbiology 144: 3049–3060, 1998.
- FACKLAM, R.R. & WASHINGTON II, J.A. ***Streptococcus* and related catalase negative Gram-positive cocci.** In: Ballows, A.; Hausler, Sr., W.S.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D. e Sadowy, H.J. (eds), Manual of Clinical Microbiology, 5th ed., American Society for Microbiology. Washington. D.C. p. 238-257, 1991.
- FADEN, H., DUFFY, L., WASIELEWSKI, R., WOLF, J., KRSTOFIK, D. & TUNG, Y. **Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children.** J. Infect Dis. 175: 1440-1445, 1997.
- FENOLL, A.; BOURGON, M.; MUÑOZ, R.; VICIOSO, D. & CASAL, J. **Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989.** Rev. Infect. Dis. 13: 56–60, 1991.
- GARCÍA, E.; GARCIA, J.L.; ARRARÁS, A.; SÂNCHEZ-PUELLES, J.M. & LÓPEZ, R. **Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914–918, 1988.
- GARCÍA, E.; LLULL, D.; MUÑOZ, R.; MOLLERACH, M. & LÓPEZ, R. **Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*.** Res. Microbiol. 151: 429 – 435, 2000.
- GARNIER, F.; JANAPATLA, R.P.; CHARPENTIER, E.; MASSON, G.; GRÉLAUD, C. ; STACH, J.F.; DENIS, F. & PLOY, M.C. **Insertion sequence 1515 in the *ply* gene of a type 1 clinical**

isolate of *Streptococcus pneumoniae* abolishes pneumolysin expression. J. Clin. Microbiol. 45: 2296–2297, 2007.

- GAY, K.; BAUGHMAN, W.; MILLER, Y.; JACKSON, D.; WHITNEY, C.G.; SCHUCHAT, A.; FARLEY, M.M.; TENOVER, F. & STEPHENS D.S. **The emergence of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide antimicrobial agents: a 6-year population-based assessment.** J. Infect. Dis. 182: 1417-1424, 2000.

- GAY, K. & STEPHENS, D.S. **Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*.** J. Infect. Dis. 184: 56–65, 2001.

- GISSELSSON-SOLÉN, M.; BYLANDER, A.; WILHELMSSON, A.H. & MELHUS, A. **The Binax NOW test as a tool for diagnosis of severe acute otitis media and associated complications.** J. Clin. Microbiol. 45: 3003–3007, 2007.

- HAKENBECK, R. **Mosaic genes and their role in penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*.** Electrophoresis 19: 597–601, 1997.

- HAKENBECK, R.; GREBE, T.; ZAHNER, D. & STOCK, J.B. **β - lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins.** Mol. Microbiol. 33: 673–678, 1999.

- HALL, L.M.C. **Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*.** J. Clin. Pathol. 51: 270–274, 1998.

- HANAGE, W.P.; KAIJALAINEN, T.H.; SYRJANEN, R.K.; AURANEN, K.; LEINONEN, M.; MAKELA, P.H. & SPRATT, B.G. **Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland.** Infect. Immun. 73: 431-435, 2005.

- HIRST, R.A.; KADIOGLU, A.; O'CALLAGHAN, C & ANDREW, P. W. **The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis.** Clin. Exp. Immunol. 138: 195–201, 2004.

-HIRST, R.A.; GOSAI, B; RUTMAN, A.; GUERIN, C.J.; NICOTERA, P.; ANDREW, P.W. & O'CALLAGHAN, C. ***Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis.** J. Infect. Dis. 197: 744 –751, 2008.

- HOLLINGSHEAD, S.K.; BECKER, R. & BRILES, D.E. **Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*.** Infect. Immun. 68: 5889-5900, 2000.

- HOLLINGSHEAD, S.K.; BARIL, L.; FERRO, S.; KING, J.; COAN, P.; BRILES, D.E. PNEUMOCOCCAL PROTEINS EPI STUDY GROUP. **Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries.** J. Med. Microbiol. 55: 215–221, 2006.

- HSIEH, Y.C.; LIN, P.Y.; CHIU, C.H.; HUANG, Y.C.; CHANG, K.Y.; LIAO, C.H.; CHIU, N.C.; CHUANG, Y.C.; CHEN, P.Y.; CHANG, S.C.; LIU, J.W.; YEN, M.Y.; WANG, J.H.; LIU, C.Y. & LIN, T.Y. **National survey of invasive pneumococcal diseases in Taiwan under partial PCV7 vaccination in 2007: emergence of serotype 19A with high invasive potential.** Vaccine, 27: 5513-5518, 2009.

- HUOVINEN, P.; SUNDSTROM, L.; SWEDBERG, G. & SKOLD, O. **Trimethoprim and sulfonamide resistance.** Antimicrob. Agents Chemother. 39: 279–289, 1995.

- IANNELLI, F.; CHIAVOLINI, D.; RICCI, S.; OGGIONI, M.R. & POZZI, G. **Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice.** Infect. Immun. 72: 3077–3080, 2004.

- ITO, Y.; OSAWA, M.; ISOZUMI, R.; IMAI, S.; ITO, I.; HIRAI, T.; ISHIDA, T.; ICHIYAMA, S.; MISHIMA, M. & KANSAI COMMUNITY ACQUIRED PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA STUDY GROUP. **Pneumococcal surface protein A family types of *Streptococcus pneumoniae* from community-acquired pneumonia patients in Japan.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 26: 739–742, 2007.

- JACOBS, M.R.; GOOD, C.E.; BAJAKSOUZIAN, S. & WINDAU, A.R. **Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A, 6C, and 22F and serogroup 15 in Cleveland, Ohio, in relation to introduction of the protein-conjugated pneumococcal vaccine.** Clin. Infect. Dis., 47: 1388-1395, 2008.

- JEDRZEJAS, M.J. **Pneumococcal virulence factors: structure and function.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 187 – 207, 2001.

- JEDRZEJAS, M.J.; LAMANI, E. & BECKER, R.S. **Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A.** J. Biol. Chem. 276: 33121–33128, 2001.

- JEDRZEJAS, M.J. **Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies.** Cell. Mol. Life Sci. 64: 2799-2822, 2007.

- KADIOGLU, A.; WEISER, J.N.; PATON, J.C. & ANDREW, P.W. **The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease.** Nature Reviews 6: 288-301, 2008.
- KÄRPÄNOJA, P.; NYBERG, S.T.; BERGMAN, M.; VOIPIO, T.; PAAKKARI, P.; HUOVINEN, P.; SARKKINEN, H. & FINNISH STUDY GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE (FIRE NETWORK). **Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*.** Antimicrob. Agents Chemother., 52: 2480-2485, 2008.
- KEGELE, F.C.O. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a antimicrobianos e pertencentes aos sorotipos 9N, 9V, 14, 19F, 23B e 23F isolados no Brasil.** Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- KIM, J.O.; ROMERO-STEINER, S.; SORENSEN, U.B.S.; BOL, J.; CARVALHO, M.; BARNARD, S.; CARLONE, G. & WEISER, J.N. **Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*.** Infect. Immun. 67: 2327–2333, 1999.
- KLUGMAN, K.P. & KOORNHOF, H.J. **Bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci.** N. Eng. J. Medicine 318: 123-124, 1988.
- KNUF, M.; SZENBORN, L.; MORO, M.; PETIT, C.; BERMAL, N.; BERNARD, L.; DIEUSSAERT, I. & SCHUERMAN, L. **Immunogenicity of routinely used childhood vaccines when coadministered with the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV).** Pediatr Infect Dis J. 28: S97-S108, 2009.
- KO, A.I.; REIS, J.N.; COPOLLA, S.J.; GOUVEIA, E.L.; CORDEIRO, S.M.; LOBO, T.S.; PINHEIRO, R.M.; SALGADO, K.; DOURADO, C.M.R.; TAVARES-NETO, J.; ROCHA, H.; REIS, M.G.; JOHNSON, W.D. Jr., & RILEY, L.W. **Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil.** Clin. Infect. Dis. 30: 78-86, 2000.
- KOECK, J.L.; NJANPOP-LAFOURCADE, B.M.; CADE, S.; VARON, E.; SANGARE, L.; VALJEVAC, S.; VERGNAUD, G. & POURCEL, C. **Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing.** BMC Microbiol. 5: 66, 2005.
- LAPLANTE, K.L.; RYBAK, M.J.; TSUJI, B.; LODISE, T.P.; & KAATZ, G.W. **Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*: area under the concentration-time curve/MIC ratio**

and resistance development with gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 1315–1320, 2007.

- LAVAL, C.B.; ANDRADE, A.L.S.S.; PIMENTA, F.C.; DE ANDRADE, J.G.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, A.S.; DE LIMA, E.C.; di FABIO, J.L.; CASAGRANDE, S.T. & BRANDILEONE, M.C.C. **Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the area of pneumococcal vaccines.** Clin. Microbiol. Infect. 12: 50–55, 2006.

- LU, L.; MA, Y. & ZHANG, J.R. ***Streptococcus pneumoniae* recruits complement factor H through the amino terminus of CbpA.** J. Biol. Chem. 281:15464–5474, 2006.

- LLULL, D.; LÓPEZ, R. & GARCÍA, E. **Characteristic Signatures of the *lytA* Gene Provide a Basis for Rapid and Reliable Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*.** Infect. J. Clin. Microbiol. 44: 1250–1256, 2006.

- LUND, E. & HENRICHSEN, J. **Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*.** Methods Microbiol., 12: 241–262, 1978.

- MARRA, A.; LAWSON, S.; ASUNDI, J.S.; BRIGHAM, D. & HROMOCKYJ, A.E. ***In vivo* characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection.** Microbiology 148:1483–1491, 2002.

- MARIMÓN, J.M.; PÉREZ-TRALLERO, E.; ERCIBENGOA, M.; GONZALEZ, A. & FENOLL, A. ON BEHALF OF THE SPANISH PNEUMOCOCCAL INFECTION STUDY NETWORK (G03/103). **Molecular epidemiology and variants of the multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain¹⁴⁻⁵ international clone among Spanish clinical isolates.** J. Antimicrob. Chemother. 57: 654–660, 2006.

- MATTHEWS, H.W.; BAKER, C.N. & THORNSBERRY, C. **Relationship between *in vitro* susceptibility test result for chloramphenicol and production of chloramphenicol acetyltransferase by *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Aerococcus* species.** J. Clin. Microbiol. 26: 2387-2390. 1988.

- McALLISTER, L.J.; TSENG, H.-J.; OGUNNIYI, A.D.; JENNINGS, M.P.; MCEWAN, A.G. & PATON, J.C. **Molecular analysis of the *psa* permease complex of *Streptococcus pneumoniae*.** Mol. Microbiol. 53: 889–901, 2004.

- McAVIN, J.C.; REILLY, P.A.; ROUDABUSH, R.M.; BARNES W.J.; SALMEN, A.; JACKSON, G.W.; BENINGA, K.K.; ASTORGA, A.; MCCLESKEY, F.K.; HUFF, W.B.; NIEMEYER, D. & LOHMAN, K.L.

Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. J. Clin. Microbiol. 39: 3446–3451, 2001.

- McDANIEL, L.S.; McDANIEL, D.O.; HOLLINGSHEAD, S.K. & BRILES, D.E. **Comparison of the PspA sequence from *Streptococcus pneumoniae* EF5668 to the previously identified PspA sequence from strain Rx1 and ability of PspA from EF5668 to elicit protection against pneumococci of different capsular types.** Infect. Immun. 66: 4748–4754, 1998.

- MCDUGAL, L.H.; FACKLAM, R.R.; REEVES, M.; HUNTER, S.; SWENSON, J.M.; HILL, B.C. & TENOVER, F.C. **Analysis of multiply antimicrobial-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States.** Antimicrob. Agents Chemother. 36: 2176–2184, 1992.

- McELLISTREM, M.C.; RANSFORD, J.V.; KHAN, S.A. **Characterization of *in vitro* biofilm-associated pneumococcal phase variants of a clinically relevant serotype 3 clone.** J. Clin. Microbiol. 45: 97–101, 2007.

- MELIN, M.M.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E.; HANAGE, W.P.; LAHDENKARI, M.; KAIJALAINEN, T.; KILPI, T.M. & KÄYHTY H.M. **Distribution of pneumococcal surface protein A families 1 and 2 among *Streptococcus pneumoniae* isolates from children in Finland who had acute otitis media or were nasopharyngeal carriers.** Clin. Vaccine Immunol., 15:1555-1563, 2008.

- MESSMER, T.O.; SAMPSON, J.S.; STINSON, A.; WONG, B.; CARLONE, G.M. & FACKLAM, R.R. **Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 49: 249–254, 2004.

- MOISSENET, D.; VALCIN, M.; MACHAND, V.; GARABÉDIAN, E.N.; GESLIN, P.; GARBARGCHENON, A. & VU-THIEN, H. **Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibility to penicillin in a Paris children's hospital.** J. Clin. Microbiol. 35: 298–301, 1997.

-MOLLERACH, M.; REGUEIRA, M.; BONOFILIO, L.; CALLEJO, R.; PACE, J.; DI FABIO, J.L.; HOLLINGSHEAD, S.; BRILES, D. & STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE WORKING GROUP. **Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity.** Epidemiol Infect., 132:177-184, 2004.

- MONTANARI, M.P.; COCHETTI, I.; MINGOIA, M. & VARALDO, P.E. **Phenotypic and molecular characterization of tetracycline and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*.** Antimicrob. Agents Chemother., 47: 2236–2241, 2003.

- MOORE, M.R.; GERTZ, R.E. JR.; WOODBURY, R.L.; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; SCHAFFNER, W.; LEXAU, C.; GERSHMAN, K.; REINGOLD, A.; FARLEY, M.; HARRISON, L.H.; HADLER, J.L.; BENNETT, N.M.; THOMAS, A.R.; MCGEE, L.; PILISHVILI, T.; BRUEGGEMANN, A.B.; WHITNEY, C.G.; JORGENSEN, J.H. & BEALL, B. **Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005.** J. Infect. Dis., 197: 1016–1027, 2008.
- MORRISON, K.E.; LAKE, D.; CROOK, J.; CARLONE, G.M.; ADES, E.; FACKLAM, R. & SAMPSON, J.S. **Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis.** J. Clin. Microbiol. 38: 434–437, 2000.
- NABORS GS, BRAUN PA, HERRMANN DJ, HEISE ML, PYLE DJ, GRAVENSTEIN S, SCHILLING M, FERGUSON LM, HOLLINGSHEAD SK, BRILES DE, BECKER RS. **Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules.** Vaccine,18: 1743-1754, 2000.
- NICHOL, K.A.; ZHANEL, G.G. & HOBAN, D.J. **Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*.** Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3261–3264, 2002.
- OCHS, M.M.; BARTLETT, W.; BRILES, D.E.; HICKS, B.; JURKUVENAS, A.; LAU, P.; REN, B. & MILLAR, A. **Vaccine-induced human antibodies to PspA augment complement C3 deposition on *Streptococcus pneumoniae*.** Microbial Pathogens. 44: 204–214, 2008.
- OGUNNIYI, A.D.; GIAMMARINARO, P. & PATON, J.C. **The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo*.** Microbiology. 148: 2045–2053, 2002.
- OGUNNIYI, A.D.; GRABOWICZ, M.; BRILES, D.E.; COOK, J., & PATON, J.C. **Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*.** Infect. Immun. 75: 350–357, 2007.
- OVERWEG, K.; PERICONE, C.D.; VERHOEF, G.G.C.; WEISER, J.N.; MEIRING, H.D.; JONG, A.P.J.M.; DE GROOT, R. & HERMANS. P.W.M. **Differential protein expression in phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*.** Infect. Immun. 68: 4604–4610, 2000.

- PAI, R.; GERTZ, R.E.; & BEALL, B. **Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates.** J. Clin. Microbiol. 44: 124–131, 2006.

- PATON, J.C. **Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential.** Trends Microbiol. 6: 85–87, 1998.

- PAYNE, D.B.; SUN, A.; BUTLER, J.C.; SINGH, S.P.; HOLLINGSHEAD, S.K. & BRILES, D. E. **PspA family typing and PCR-based DNA fingerprinting with BOX A1R primer of pneumococci from the blood of patients in the USA with and without sickle cell disease.** Epidemiol. Infect. 133: 173 -178, 2005.

- PÉREZ-TRALLERO, E.; MARIMON, J.M.; ERCIBENGOA, M.; VICENTE, D. & PÉREZ-YARZA, E.G. **Invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children and older adults in the north of Spain before and after the introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 28:731-738, 2009.

- PIKIS, A.; CAMPOS, J.M.; RODRIGUEZ, W.J. & KEITH J.M. **Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance and clinical implications.** J. Infect. Dis. 184: 582 - 590. 2001.

- PIMENTA, F.C.; RIBEIRO-DIAS, F.; BRANDILEONE, M.C.C.; MIYAJI, E.N.; LEITE, L.C.C. & ANDRADE, A.L.S.S. **Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during ongoing surveillance study of children in Brazil.** J. Clin. Microbiol. 44: 2838 - 2843, 2006.

- PLETZ, M.W.; MAUS, U.; KRUG, N.; WELTE, T. & LODE, H. **Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species.** Int. J. Antimicrob. Agents. 32: 199-206, 2008.

- PRADIER, C.; DUNAIS, B.; CARSENTI-ETESSE, H. & DELLAMONICA, P. **Pneumococcal resistance patterns in Europe.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16: 644-647, 1997.

- RANTALA, M.; HUIKKO, S.; HUOVINEN, P.; JALAVA, J. & THE FINNISH STUDY GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **Prevalence and molecular genetics of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Finland in 2002.** Antimicrob. Agents Chemother. 49: 4180–4184, 2005.

- REINERT, R.R.; REINERT, S.; van der LINDEN, M.; CIL, M.Y.; AL-LAHHAM, A. & APPELBAUM, P. **Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight european countries from 2001 to 2003.** Antimicrob. Agents Chemother. 49: 2903–2913. 2005.
- REIS, J.N.; CORDEIRO, S.M.; COPPOLA, S.J.; SALGADO, K.; CARVALHO, M.G.S.; TEIXEIRA, L.M.; THOMPSON, T.A.; FACKLAM, R.R.; REIS, M.G. & KO, A.I. **Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil.** J. Clin. Microbiol. 40: 275 - 277. 2002.
- REIS, J.N.; PALMA, T.; RIBEIRO, G.S.; PINHEIRO, R.M.; RIBEIRO, C.T.; CORDEIRO, S.M.; DA SILVA FILHO, H.P.; MOSCHIONI, M.; THOMPSON, T.A.; SPRATT, B.; RILEY, L.W.; BAROCCHI, M.A.; REIS, M.G. & KO, A.I. **Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community.** J. Infect. 57: 204-213, 2008.
- ROLO, D.; ARDANUY, C.; FLEITES, A.; MARTÍN, R. & LIÑARES, J. **Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) among prevalent clones in Spain.** BMC Microbiol., 9:80, 2009.
- ROSSI, A.; CORSO, A.; PACE, J.; REGUEIRA, M. & TOMAZS, A. **Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Argentina: Frequent occurrence of an internationally spread serotype 14 clone.** Microbial. Drug Resist. 4: 225 - 231. 1998.
- ROUFF, K.; WHILEY, R.A. & BEIGHTON, D. ***Streptococcus***, p 405-421. *In*: Murray, P.R.; Barron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C. & Tenover, R.H. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, DC, 2003.
- SADOWY, E.; SKOCZYŃSKA, A.; FIETT, J.; GNIADKOWSKI, M. & HRYNIEWICZ, W. **Multilocus sequence types, serotypes, and variants of the surface antigen PspA in *Streptococcus pneumoniae* isolates from meningitis patients in Poland.** Clin. Vaccine Immunol. 13: 139-144, 2006.
- SAMPSON, J.S.; O'CONNOR, S.P.; STINSON, A.R.; THARPE, J.A. & RUSSELL, H. **Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene of encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus sp.* adhesins.** Infect. Immun. 62: 319–324, 1994.
- SANTAGATI, M.; LANNELLI, F.; OGGIONI, M.R.; STEFANI, S. & POZZI, G. **Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*.** Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2585-2587, 2000.

- SEPPALA, H.; SKURNIK, M.; SOINI, H.; ROBERTS, M.C. & HUOVINEM, P. **A novel erythromycin resistance methylase gene *erm*(TR) in *Streptococcus pyogenes*.** Antimicrob. Agents Chemother. 42: 257–262, 1998.
- SESSEGOLO, J.F.; LEVIN, A.S.; LEVY, C.E.; ASENSI, M.; FACKLAM, R.R. & TEIXEIRA, L.M. **Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992.** J. Clin. Microbiol. 32: 906–911, 1994.
- SIBOLD, C.; WANG, J.; HENRICHSEN, J. & HAKENBECK, R. **Genetic relationships of penicillin-susceptible and resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents.** Infect. Immun. 60: 4119–4126, 1992.
- SINGLETON, R.J.; HENNESSY, T.W.; BULKOW, L.R.; HAMMITT, L.L.; ZULZ, T.; HURLBURT, D.A.; BUTLER, J.C.; RUDOLPH, K. & PARKINSON, A. **Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage.** JAMA, 297: 1784-1792, 2007.
- SOARES, S.; KRISTINSSON, K.G.; MUSSER, J.M. & TOMASZ, A. **Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s.** J. Infect. Dis. 168: 158–163, 1993.
- SWIATLO, E.; BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D.E. & McDANIEL, L.S. **Oligonucleotides identify conserved and variable regions of *pspA* and *pspA*-like sequences of *Streptococcus pneumoniae*.** Gene. 188: 279 – 284, 1997.
- TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.C.; MERQUIOR, V.L.C.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J. & FACKLAM, R.R. **Phenotypic and Genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolates from human source.** J. Clin. Microbiol. 35: 2778–2781, 1997.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.; PERSING, D.H. & SWAMINATHAN, B. **Interpreting chomosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel eletrophoreses: criteria for bacterial strain typing.** J. Clin. Microbiol. 35: 2233–2239, 1995.
- TRZCINSKI, K.; THOMPSON, C.M. & LIPSITCH, M. **Single-step capsular transformation and acquisition of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*.** J. Bacteriol. 186: 3447–3452, 2004.

- TSENG, H.J.; McEWAN, A.G.; PATON, J.C. & JENNINGS, M.P. **Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *psaA* mutants are hypersensitive to oxidative stress.** Infect. Immun. 70:1635–1639, 2002.
- TSOLIA, M.N.; STAMOS, G.; IOANNIDOU, S.; TREFLER, R.; FOUSTOUKOU, M.; KAFETZIZ, D. & PORAT N. **Genetic relatedness of resistant and multiresistant *Streptococcus pneumoniae* strains, recovered in the Athens area, to international clones.** Microb. Drug. Resist. 8: 219–226, 2002.
- TUOMANEN, E. **Molecular and cellular biology of pneumococcal infection.** Curr. Opin. Microbiol. 2: 35–39, 1999.
- VAN BELKUM, A.; SLUIJTER, M.; DE GROOT, R.; VERBRUGH, H. & HERMANS, P.W.M. **Novel Box repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains.** J. Clin. Microbiol. 34: 1176–1179, 1996.
- VELASQUEZ PA, PARUSSOLO L, CARDOSO CL, TOGNIM MC, GARCIA LB. **High prevalence of children colonized with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in public day-care centers.** J. Pediatr. (Rio J), 85: 516–522, 2009.
- VESIKARI T, WYSOCKI J, CHEVALLIER B, KARVONEN A, CZAJKA H, ARSÈNE JP, LOMMEL P, DIEUSSAERT I, SCHUERMAN L. **Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine.** Pediatr Infect. Dis. J., 28: S66–76, 2009.
- VOGLER, A.J.; KEYS, C.; NEMOTO, Y.; COLMAN, R.E.; JAY, Z. & KEIM, P. **Effect of repeat copy number on variable number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157: H7.** J. Bacteriol. 188: 4253–4263, 2006.
- WEISER, J.N.; AUSTRIAN, R.; SREENIVASAN, P.K. & MASURE, H.R. **Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization.** Infect. Immun. 62: 2582–2589, 1994.
- WEISER. J.N. & KAPOOR, M. **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, 1999.
- WEISER, J.N. **The pneumococcus: why a commensal misbehaves.** J. Mol. Med. 2009.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - WHO position paper**. Wkly. Epidemiol. Rec., 82: 93 - 104, 2007.

- YARO, S.; LOURD, M.; TRAORÉ, Y.; NJANPOP-LAFOURCADE, B.M. ; SAWADOGO, A. ; SANGARE, L.; HIEN, A.; OUEDRAGO, M.S.; SANOU, O.; du CHÂTELET, I.; KOECK, J.L. & GESSNER, B. **Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso**. Clin. Infect. Dis. 43: 693–700, 2006.

- ŽEMLIČKOVÁ, H.; CRISÓSTOMO, M.I.; BRANDILEONE, M.C.; CAMOU, T.; CASTAÑEDA, E.; CORSO, A.; ECHÁNIZ-AVILES, G.; PÁSZTOR, M. & TOMASZ, A. **Serotypes and clonal types of penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in five Latin American countries**. Microbial Drug Resist. 11: 195–204, 2005.

ANEXOS

Anexo A. Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 9N incluídas no presente de estudo.

Amostra	Localidade de isolamento ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Família <i>pspA</i>	Susceptibilidade ^c PEN ^d	Perfil PFGE ^e
Sp 59	SP	1988	Sangue	fam 2	I	Pen-A1 ^{9N}
Sp 60	SP	1988	Sangue	fam 2	I	Pen-A1 ^{9N}
Sp 61	SP	1988	ND	fam 2	I	Pen-A1 ^{9N}
Sp 156	SP	1990	Sangue	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 235	SP	1990	escarro	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 254	RJ	1991	Sangue	fam 2	S	D1 ^{9N}
Sp 266	SP	1991	Sangue	fam 1	S	Pen-B1 ^{9N}
Sp 386	SP	1992	Sangue	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 418	SP	1992	Sangue	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 561	RJ	1994	LCR	fam 2	S	Pen-A3 ^{9N}
Sp 566	RJ	1994	LCR	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 648	RJ	1994	LCR	fam 2	S	D2 ^{9N}
Sp 784	RJ	1995	LCR	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 803	RJ	1995	Sangue	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 829	RJ	1995	Sec. Seio maxilar	fam 2	S	D3 ^{9N}
Sp 896	SP	1996	Sangue	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 1019	RS	1997	Escarro	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 1156	RJ	1998	Lav. Brônquico	fam 2	S	D3 ^{9N}
Sp 1414	RJ	1999	Escarro	fam 2	S	Pen-C1 ^{9N}
Sp 1626	RS	2001	ND	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 1725	RS	2001	ND	fam 2	S	Pen-A2 ^{9N}
Sp 1726	RS	2001	Sangue	fam 1	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 1735	RS	2001	Sangue	fam 2	S	Pen-H7 ^{9V}
Sp 1767	RJ	2000	ND	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 1768	RJ	2000	ND	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 2018	RS	2003	Sangue	fam 2	S	Pen-A2 ^{9N}
Sp 2026	RS	2003	LCR	fam 2	S	Pen-H1 ^{9N}
Sp 2027	RS	2003	Sangue	fam 2	S	Pen-A1 ^{9N}
Sp 2105	RS	2004	Escarro	fam 2	S	Pen-H1 ^{9N}
Sp 2115	RS	2004	Escarro	fam 2	S	Pen-A2 ^{9N}

^a Local de isolamento das amostras: RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo;

^b Sec., Secreção; Líq., Líquido; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano;

^c Todas as amostras foram susceptíveis a eritromicina;

^d PEN, Penicilina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

Anexo B. Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 9V incluídas no presente estudo.

Amostra	Localidade de isolamento ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Família de <i>pspA</i>	Susceptibilidade ^c PEN ^d	Perfil PFGE ^e
Sp 180	RJ	1990	Sangue	fam 2	S	Pen-H5 ^{9V}
Sp 312	SP	1991	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 403	SP	1992	Liq. Pleural	fam 2	S	Pen-A1 ^{9V}
Sp 414	SP	1992	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 475	SP	1992	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 484	SP	1992	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 486	SP	1992	Sec. Traqueal	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 488	SP	1992	Sangue	fam 2	S	C1 ^{9V}
Sp 559	RJ	1994	LCR	fam 1	S	A2 ^{9V}
Sp 624	RJ	1994	LCR	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 671	SP	1994	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 744	RJ	1995	LCR	fam 1	S	B1 ^{9V}
Sp 745	RJ	1995	LCR	fam 1	S	B1 ^{9V}
Sp 858	RS	1996	Escarro	fam 2	I	Pen-H2 ^{9V}
Sp 867	RS	1996	Sangue	fam 1	S	A1 ^{9V}
Sp 873A	RJ	1996	Sangue	fam 2	S	Pen-H3 ^{9V}
Sp 873B	RJ	1996	Sangue	fam 2	S	Pen-H3 ^{9V}
Sp 876	ND	1996	Lav. Brônquico	fam 2	S	Pen-H3 ^{9V}
Sp 880	ND	1996	Lav. Brônquico	fam 2	S	Pen-H3 ^{9V}
Sp 904	SP	1996	Sangue	fam 2	S	Pen-H4 ^{9V}
Sp 911	RS	1997	Escarro	fam 2	I	Pen-H2 ^{9V}
Sp 1060	RS	1998	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1115	RS	1998	LCR	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1128	RS	1998	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1184	SP	1998	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1230	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H8 ^{9V}
Sp 1231	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H8 ^{9V}
Sp 1243	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1309	RS	1999	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1322	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1351	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1353	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}

^a Local de isolamento: RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo;

^b Sec., Secreção; Líq., Líquido; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano;

^c Todas as amostras foram susceptíveis a eritromicina;

^d PEN, Penicilina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

Anexo B (Continuação). Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 9V incluídas no presente estudo.

Amostra	Localidade de isolamento ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Família <i>pspA</i>	Susceptibilidade ^c PEN ^d	Perfil PFGE ^e
Sp 1428	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1451	ND	1999	Liq. Pleural	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1503	SP	2000	Orofaringe	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1511	SP	2000	Sec.Orofaringe	fam 1	S	E1 ^{9V}
Sp 1596	RS	2001	ND	fam 2	I	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1655	RS	2001	Liq. Pleural	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1663	RS	2001	Escarro	fam 2	R	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1664	RS	2001	Sec. Traqueal	fam 2	R	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1665	RS	2001	Sec. Traqueal	fam 2	R	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1668	RS	2001	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1692	RS	2001	Escarro	fam 2	I	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1712	RS	2001	Liq. Pleural	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1723	RS	2001	ND	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1747	RS	2001	LCR	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1883	SP	2003	ND	fam 2	S	ND
Sp 1916	SP	2003	ND	fam 2	S	ND
Sp 1984	RS	2003	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1986	RS	2003	Sangue	fam 2	R	Pen-H1 ^{9V}
Sp 1997	RS	2003	Sangue	fam 2	R	Pen-H1 ^{9V}
Sp 2006	RS	2003	Sangue	fam 2	R	Pen-H1 ^{9V}
Sp 2020	RS	2003	Sangue	fam 2	R	Pen-H2 ^{9V}
Sp 2064	RS	2003	ND	fam 2	I	Pen-H1 ^{9V}
Sp 2084	RS	2004	Escarro	fam 2	I	Pen-H6 ^{9V}
Sp 2088	RS	2004	Sangue	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 2093	RS	2004	LCR	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}
Sp 2111	RS	2004	Sangue	fam 2	I	Pen-H1 ^{9V}
Sp 2161	RJ	2004	LCR	fam 2	S	Pen-H1 ^{9V}

^a Local de isolamento: RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo;

^b Sec., Secreção; Liq., Líquido; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano;

^c Todas as amostras foram susceptíveis a eritromicina;

^d PEN, Penicilina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

Anexo C. Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 incluídas no presente estudo.

Amostra	Localidade ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Família <i>pspA</i>	Susceptibilidade PEN / ERI	Perfil PFGE
Sp 107	SP	1989	Sangue	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 131	RJ	1989	ND	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 139	SP	1990	Sangue	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 168	RJ	1990	Líqu. Pleural	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 179	RJ	1990	Sangue	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 186	RJ	1990	Sangue	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 265	SP	1991	Líqu. Ascítico	fam 1	S / S	Eri-A2 ¹⁴
Sp 274	SP	1991	Sangue	fam 1	I / S	Pen-J1 ¹⁴
Sp 276	SP	1991	LCR	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 291	SP	1991	Líqu. Pleural	fam 1	I / S	Pen-K1 ¹⁴
Sp 293	RJ	1991	ND	fam 1	S / S	Eri-A2 ¹⁴
Sp 296	SP	1991	Sangue	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 306	SP	1991	Sangue	fam 1	S / S	Eri-A2 ¹⁴
Sp 308	SP	1991	LCR	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 321	ES	1991	ND	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 324	ES	1991	ND	fam 1	S / S	Eri-A2 ¹⁴
Sp 325	ES	1991	ND	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 349	SP	1991	Sangue	fam 2	S / S	(ñ A / ñ C)
Sp 366	SP	1991	Sangue	fam 1	S / S	(ñ A / ñ C)
Sp 387	SP	1992	Sec. Ocular	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 416	SP	1992	Sangue	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 436	SP	1992	Sangue	fam 2	I / S	Pen-A7 ¹⁴
Sp 450	SP	1992	Sangue	fam 1	S / S	B ¹⁴
Sp 465	SP	1992	Sangue	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 466	SP	1992	Sangue	fam 1	S / S	Eri-A1 ¹⁴
Sp 513	SP	1992	Escarro	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 514	SP	1992	Orofaringe	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 515	SP	1992	Sangue	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 526	RJ	1993	Lav.Brônq.	fam 2	S / S	Pen-A2 ¹⁴
Sp 527	RJ	1993	Líqu. Ascítico	fam 1	S / R	Eri-A2 ¹⁴
Sp 532	RJ	1994	Sangue	fam 1	S / S	ND
Sp 539	RJ	1994	LCR	fam 1	S / S	Eri-A2 ¹⁴
Sp 550	RJ	1994	LCR	fam 1	S / S	C4 ¹⁴
Sp 568	SP	1994	Líqu. Pleural	fam 2	S / S	D ¹⁴
Sp 587	RJ	1994	LCR	fam 1	S / S	C4 ¹⁴
Sp 590	RJ	1994	Sangue	fam 1	S / S	E ¹⁴
Sp 601	RJ	1994	LCR	fam 2	S / S	F ¹⁴
Sp 603a	RJ	1994	LCR	fam 2	S / S	N ¹⁴
Sp 607	RJ	1994	LCR	fam 2	S / S	ND
Sp 621	RJ	1994	LCR	fam 1	S / S	C5 ¹⁴
Sp 630	RJ	1994	LCR	fam 1	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 631	RJ	1994	LCR	fam 1	S / S	(ñ A / ñ C)
Sp 643	RJ	1994	LCR	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴
Sp 661	RJ	1994	LCR	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴

^a Local de isolamento: ES, Espírito Santo; PB, Paraíba; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo;

^b Asp., Aspirado; Brônq., Brônquico; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano; Líq., Líquido; Mat., Material; Resp., Respiratório; Sec., Secreção;

^c PEN, Penicilina;

^d ERI, Eritromicina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

Anexo C (Continuação). Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 incluídas no presente estudo.

Amostra	Localidade ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Família de <i>pspA</i>	Susceptibilidade PEN / ERI	Perfil PFGE
Sp 664	RJ	1994	LCR	fam 1	S / S	ND
Sp 665	RJ	1994	LCR	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴
Sp 667	RJ	1994	LCR	fam 1	S / S	C7 ¹⁴
Sp 685	SP	1994	Líqu. Ascítico	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 698	RJ	1994	LCR	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴
Sp 702	SP	1994	Sangue	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 749	RJ	1995	Sec. brônq.	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴
Sp 756	RJ	1995	LCR	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 770	SP	1995	ND	fam 1	S / S	ND
Sp 775	SP	1995	ND	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 782	RJ	1995	LCR	fam 1	S / S	C8 ¹⁴
Sp 798	RJ	1995	Asp. MO	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴
Sp 807	RJ	1995	Sangue	fam 1	S / S	ND
Sp 850	RS	1995	LCR	fam 1	I / S	Pen-A5 ¹⁴
Sp 865	SC	1996	LCR	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 866	SC	1996	Sec. Auricular	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 885	SP	1996	Sangue	fam 2	S / S	ND
Sp 886	SP	1996	LCR	fam 1	S / S	C8 ¹⁴
Sp 897	SP	1996	Sangue	fam 1	S / S	C8 ¹⁴
Sp 899	SP	1996	Sangue	fam 2	S / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 903	SP	1996	Sangue	fam 1	S / S	ND
Sp 933	RS	1997	Escarro	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 947	RS	1997	LCR	fam 1	S / S	L ¹⁴
Sp 948	RS	1997	Escarro	fam 1	S / S	L1 ¹⁴
Sp 967	RS	1997	Sangue	fam 1	S / S	M ¹⁴
Sp 979	RS	1997	Sec. Traqueal	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 985	RS	1997	LCR	fam 2	R / S	Pen-H12 ¹⁴
Sp 995	RS	1997	Escarro	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 996	RS	1997	Escarro	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 997	RS	1997	Sangue	fam 1	S / S	L2 ¹⁴
Sp 1001	RS	1997	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1003	RS	1997	Sangue	fam 1	S / S	O ¹⁴
Sp 1010	RS	1997	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1022	RS	1997	Líqu. Pleural	fam 2	R / S	Pen-H3 ¹⁴
Sp 1025	RS	1997	LCR	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1032	RJ	1997	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1033	RJ	1997	Líqu. Pericárd.	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1040	RS	1997	Escarro	fam 2	R / S	Pen-H8 ¹⁴
Sp 1043	PB	1997	ND	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴
Sp 1044	PB	1997	ND	fam 1	S / R	Eri-A2 ¹⁴
Sp 1045	PB	1997	ND	fam 1	S / R	Eri-A2 ¹⁴
Sp 1046	PB	1997	LCR	fam 1	S / R	Eri-A1 ¹⁴

^a Local de isolamento: ES, Espírito Santo; PB, Paraíba; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo;

^b Asp., Aspirado; Brônq., Brônquico; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano; Líq., Líquido; Mat., Material; Resp., Respiratório; Sec., Secreção;

^c PEN, Penicilina;

^d ERI, Eritromicina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

Anexo C (Continuação). Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 incluídas no presente estudo.

Amostra	Localidade ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Familia de <i>pspA</i>	Susceptibilidade		Perfil de PFGE
					PEN / ERI		
Sp 1047	PB	1997	LCR	fam 1	S / R		Eri-A1 ¹⁴
Sp 1067	RS	1998	Sangue	fam 1	I / S		Pen-H8 ¹⁴
Sp 1068	RS	1998	Lav.brônq.	fam 1	I / S		Pen-H8 ¹⁴
Sp 1087	RS	1998	Sangue	fam 2	I / S		Pen-H1 ¹⁴
Sp 1092	RS	1998	Sangue	fam 1	S / S		S ¹⁴
Sp 1101	RS	1998	Sec. Auricular	fam 2	R / S		Pen-H1 ¹⁴
Sp 1141	RJ	1998	Sec. brônq.	fam 1	S / R		Eri-A4 ¹⁴
Sp 1170	RJ	1998	ND	fam 1	S / R		Eri-A3 ¹⁴
Sp 1179	SP	1999	Orofaringe	fam 2	I / S		Pen-A1 ¹⁴
Sp 1197	SP	1999	Sangue	fam 2	I / S		Pen-E1 ¹⁴
Sp 1264	RS	1999	Sangue	fam 2	I / S		Pen-H11 ¹⁴
Sp 1265	RS	1999	Sangue	fam 2	I / S		Pen-H11 ¹⁴
Sp 1271	RS	1999	Líq. Pleural	fam 2	I / S		Pen-H1 ¹⁴
Sp 1292	RS	1999	Escarro	fam 2	I / S		L ¹⁴
Sp 1293	RS	1999	Sangue	fam 2	I / S		L ¹⁴
Sp 1302	RS	1999	Líq. Pleural	fam 2	S / S		S ¹⁴
Sp 1307	RS	1999	Sangue	fam 2	S / S		S ¹⁴
Sp 1308	RS	1999	Sec. Traqueal	fam 2	S / S		S ¹⁴
Sp 1316	RS	1999	Sangue	fam 2	I / S		Pen-H1 ¹⁴
Sp 1329	SP	1999	Orofaringe	fam 1	S / S		C7 ¹⁴
Sp 1334	SP	1999	Orofaringe	fam 2	I / S		Pen-H11 ¹⁴
Sp 1340	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S / S		F ¹⁴
Sp 1341	SP	1999	Orofaringe	fam 2	S / S		F ¹⁴
Sp 1368	RJ	1999	Sangue	fam 1	S / S		G ¹⁴
Sp 1408	RJ	1999	ND	fam 1	S / R		Eri-A1 ¹⁴
Sp 1413	RJ	1999	Sec. ocular	fam 1	S / R		Eri-A1 ¹⁴
Sp 1418	SP	1999	Orofaringe	fam 1	S / S		ND
Sp 1465	RJ	1999	Sec. ocular	fam 2	S / S		ND
Sp 1484	RJ	1999	Nasofaringe	fam 2	R / S		Pen-H1 ¹⁴
Sp 1514	RJ	2000	Sangue	fam 1	S / R		Eri-A1 ¹⁴
Sp 1516	RJ	2000	Mat. Respir.	fam 2	R / S		Pen-H1 ¹⁴
Sp 1534	RJ	2000	Orofaringe	fam 1	S / R		Eri-A1 ¹⁴
Sp 1551	SP	2001	Orofaringe	fam 2	I / S		Pen-H6 ¹⁴
Sp 1562	RS	2001	ND	fam 2	S / S		L ¹⁴
Sp 1564	RS	2001	ND	fam 2	S / S		L1 ¹⁴
Sp 1570	RS	2001	ND	fam 2	S / S		L ¹⁴
Sp 1575	RS	2001	ND	fam 1	I / S		Pen-I1 ¹⁴
Sp 1591	RS	2001	ND	fam 2	S / S		L ¹⁴
Sp 1598	RS	2001	ND	fam 2	I / S		Pen-H2 ¹⁴
Sp 1608	RS	2001	ND	fam 2	R / S		Pen-H2 ¹⁴
Sp 1609	RS	2001	ND	fam 2	I / S		Pen-H2 ¹⁴
Sp 1640	RS	2001	Líq. Pleural	fam 2	I / S		Pen-H1 ¹⁴

^a Local de isolamento: ES, Espírito Santo; PB, Paraíba; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo;

^b Asp., Aspirado; Brônq., Brônquico; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano; Líq., Líquido; Mat., Material; Resp., Respiratório; Sec., Secreção;

^c PEN, Penicilina;

^d ERI, Eritromicina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

Anexo C (Continuação). Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 incluídas no presente estudo.

Amostra	Localidade ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Família de <i>pspA</i>	Susceptibilidade PEN / ERI	Perfil de PFGE
Sp 1644	RS	2001	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1654	RS	2001	LCR	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1674	RS	2001	Escarro	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1680	RS	2001	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1683	RS	2001	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1689	RS	2001	Sangue	fam 2	I / R	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1690	RS	2001	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1693	RS	2001	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1694	RS	2001	Sangue	fam 2	S / S	L3 ¹⁴
Sp 1706	RS	2001	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1708	RS	2001	Escarro	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1711	RS	2001	LCR	fam 1	I / S	Pen-F1 ¹⁴
Sp 1721	RS	2001	Líqu. Pleural	fam 1	S / R	Eri-A5 ¹⁴
Sp 1724	RS	2001	ND	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1729	RS	2001	Líqu. Pleural	fam 2	S / S	L4 ¹⁴
Sp 1732	RS	2001	LCR	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1734	RS	2001	LCR	fam 2	S / S	L4 ¹⁴
Sp 1742	RS	2001	ND	fam 2	R / S	Pen-H12 ¹⁴
Sp 1744	RS	2001	LCR	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1751	RS	2001	LCR	fam 2	R / S	Pen-A4 ¹⁴
Sp 1772	RJ	2001	ND	fam 2	I / S	Pen-H6 ¹⁴
Sp 1777	RJ	2001	ND	fam 1	I / S	Pen-A4 ¹⁴
Sp 1888	SP	2003	Nasofaringe	fam 2	R / S	Pen-A6 ¹⁴
Sp 1879	RJ	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1890	SP	2003	Nasofaringe	fam 2	I / S	Pen-A1 ¹⁴
Sp 1900	SP	2003	Nasofaringe	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1913	SP	2003	Nasofaringe	fam 2	I / S	Pen-A4 ¹⁴
Sp 1917	SP	2003	Nasofaringe	fam 2	I / S	Pen-A4 ¹⁴
Sp 1922	SP	2003	Nasofaringe	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1930	RJ	2003	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H2 ¹⁴
Sp 1957	SP	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1973	SP	2003	ND	fam 2	R / S	Pen-H6 ¹⁴
Sp 1980	RJ	2003	Sangue	fam 2	S / S	ND
Sp 1981	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴

^a Local de isolamento: ES, Espírito Santo; PB, Paraíba; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo;

^b Asp., Aspirado; Brônq., Brônquico; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano; Líq., Líquido; Mat., Material; Resp., Respiratório; Sec., Secreção;

^c PEN, Penicilina;

^d ERI, Eritromicina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

Anexo C (Continuação). Características das amostras de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 incluídas no presente estudo.

Amostra	Localidade ^a	Ano de isolamento	Espécime clínico ^b	Família de <i>pspA</i>	Susceptibilidade PEN ^c / ERI ^d	Perfil de PFGE ^e
Sp 1988	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1990	RS	2003	Sangue	fam 1	S / S	ND
Sp 1992	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 1993	RS	2003	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2008	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H9 ¹⁴
Sp 2009	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H9 ¹⁴
Sp 2011	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2013	RS	2003	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2014	RS	2003	Líqu. Pleural	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2015	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2019	RS	2003	Sangue	fam 1	S / S	ND
Sp 2030	RS	2003	Líqu. Pleural	fam 1	S / S	ND
Sp 2046	RS	2003	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H2 ¹⁴
Sp 2047	RS	2003	ND	fam 2	S / S	Pen-H3 ¹⁴
Sp 2058	RS	2003	ND	fam 1	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2065	RS	2003	ND	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2067	RS	2003	ND	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2090	RS	2004	Sangue	fam 1	S / S	L ¹⁴
Sp 2091	RS	2004	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2092	RS	2004	Sangue	fam 2	I / S	ND
Sp 2094	RS	2004	LCR	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2103	RS	2004	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2107	RS	2004	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2108	RS	2004	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2110	RS	2004	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2112	RS	2004	Escarro	fam 2	I / S	Pen-H13 ¹⁴
Sp 2118	RS	2004	Escarro	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2123	RS	2004	Sangue	fam 2	I / R	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2124	RS	2004	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2131	RS	2004	ND	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2134	RS	2004	Líqu. Pleural	fam 1	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2136	RS	2004	LCR	fam 1	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2150	RS	2004	Sangue	fam 2	I / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2152	RS	2004	ND	fam 2	I / R	Pen-H10 ¹⁴
Sp 2158	RS	2004	Escarro	fam 1	S / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2159	RJ	2004	Sangue	fam 2	R / S	Pen-H1 ¹⁴
Sp 2166	RJ	2005	Sangue	fam 2	I / S	Pen-M1 ¹⁴
Sp 2167	RJ	2005	Líqu. Pleural	fam 2	S / S	ND
Sp 2168	RJ	2005	Líqu. Pleural	fam 2	R / S	Pen-V1 ¹⁴

^a Local de isolamento: ES, Espírito Santo; PB, Paraíba; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo;

^b Asp., Aspirado; Brônq., Brônquico; Lav., Lavado; LCR, Líquido Cefalorraquidiano; LÍq., Líquido; Mat., Material; Resp., Respiratório; Sec., Secreção;

^c PEN, Penicilina;

^d ERI, Eritromicina;

^e Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado;

ND, Não Determinado;

S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

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](#)