



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

Sabrina Sgambatti

**Similaridade fenotípica entre cepa de meningite
pneumocócica de caso fatal de meningite e cepas de
portadores contactantes**

**Goiânia
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Sabrina Sgambatti

Similaridade fenotípica entre cepa de meningite pneumocócica de caso fatal de meningite e cepas de portadores contactantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Professora Ana Lucia S. Sgambatti de Andrade

**Goiânia
2010**

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Doutora Ana Lucia Andrade, exemplo de pesquisadora, pela motivação constante e busca interminável por conhecimentos.

A minha família, que sempre acreditou em mim, e me apoiou durante toda a minha caminhada.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação do IPTSP/UFG.

Ao Professor Renato Mauricio de Oliveira, pelos ensinamentos de logística do projeto.

A Professora Doutora Maria Aparecida Vieira, pela coordenação do trabalho nas creches e por compartilhar, com generosidade, toda a sua experiência na abordagem pediátrica.

A Licia Kamila Thörn, por ter compartilhado a idealização deste projeto, fruto de parceria com a Secretaria Municipal de Saúde, e pela colaboração no trabalho de campo.

A Professora Doutora Ruth Minamisava, pela valiosa contribuição durante o processo de análise de dados, e pelas sugestões durante o exame de qualificação.

A Professora Doutora Adriana Guilarde Oliveira, por sua contribuição durante o exame de qualificação, e também pelo aprendizado contínuo e convivência durante os três anos de residência.

A Professora Doutora Maria Claudia Dantas Andre, pelas excelentes sugestões durante o exame de qualificação.

A Professora Doutora Juliana Lamaro-Cardoso, pela realização do componente molecular do estudo, durante estágio no CDC, fundamental na construção deste projeto.

A equipe de pesquisadores do Centers for Diseases Control and Prevention (CDC-EUA), nas pessoas do Dr Bernard Beall, Maria da Glória de Carvalho e Fabiana Pimenta, pela transferência de tecnologia da PCR *real time* e PCR multiplex.

A Doutora Ana Paula Lemos, do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração na realização dos testes moleculares no CDC.

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

A Secretaria Municipal de Saúde do Município de Goiânia, pelo apoio logístico durante a fase de coletas nas creches.

As diretoras e coordenadoras das creches participantes do estudo.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| AGRADECIMENTOS..... | iii |
| SUMÁRIO..... | iv |
| LISTA DE FIGURAS..... | vi |
| LISTA DE TABELAS..... | vii |
| LISTA DE ANEXOS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| RESUMO..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 – Streptococcus pneumoniae e saúde pública..... | 1 |
| 1.2- Meningites por Streptococcus pneumoniae..... | 1 |
| 1.3- Colonização por Streptococcus pneumoniae na infância..... | 2 |
| 1.4- Sorotipos de Streptococcus pneumoniae | 3 |
| 1.5- Técnicas moleculares na identificação de Streptococcus pneumoniae | 7 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 9 |
| 3. OBJETIVOS..... | 11 |
| 3.1- Objetivo geral..... | 11 |
| 3.2- Objetivos específicos..... | 11 |
| 4. METODOLOGIA | 12 |
| 4.1- Desenho, local e população do estudo..... | 12 |
| 4.2- Coleta dos dados | 12 |
| 4.3- Coleta das amostras..... | 12 |
| 4.4- Procedimentos microbiológicos..... | 13 |
| 4.4.1- Enriquecimento | 13 |
| 4.4.2- Cultura convencional..... | 13 |
| 4.5- Sorotipagem por reação de Quellung..... | 13 |
| 4.6- Procedimentos moleculares..... | 14 |
| 4.6.1- Extração de DNA | 14 |
| 4.6.2- Real-time PCR (RT-PCR)..... | 14 |
| 4.6.3- PCR multiplex convencional..... | 15 |
| 4.6.4- Multilocus Sequence Typing (MLST)..... | 16 |
| 4.7- Análises dos dados..... | 17 |
| 6. DISCUSSÃO | 26 |
| 7. CONCLUSÕES | 31 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 32 |
| REFERÊNCIAS | 33 |
| ANEXOS | 48 |
| | 49 |
| | 50 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da detecção de portadores e co-colonização pela PCR e cultura convencional, para o total de 224 amostras coletadas.....21

Figura 2 - Frequência de sorotipos associados à co-colonização pela PCR multiplex....25

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados na reação em cadeia da polimerase..... | 16 |
| Tabela 2 - Características das crianças e prevalência de <i>S. pneumoniae</i> nas creches Chiquinho e Efrata..... | 22 |
| Tabela 3 - Prevalência de sorotipos capsulares em nasofaringe de 155 crianças e 69 contatos das creches pelo PCR multiplex e reação de Quellung..... | 23 |
| Tabela 4 - Variáveis associadas a múltiplos sorotipos de pneumococo em isolados de nasofaringe de crianças e contatos das creches..... | 24 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1 – Aprovação do protocolo do estudo no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Materno Infantil de Goiânia..... | 48 |
| Anexo 2 – Questionário da criança..... | 49 |
| Anexo 3 – Questionário do contactante..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC – *Centers of Diseases Control and Prevention*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa Clínica

CRIES – Centros de Referência em Imunobiológicos Especiais

Ct – *Cycle threshold*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desorribonucleotídeo trifosfatado

DPI – Doença Pneumocócica Invasiva

Hib – *Haemophilus influenzae* tipo b

IPTSP/UFG – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública Goiânia-GO

MLST – *Multilocus Sequence Type*

MS – Ministério da Saúde do Brasil

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RT-PCR – *Real-Time PCR*

SES/SP – Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo

SMS/GO – Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia

SpNT – *Streptococcus pneumoniae* não tipáveis

ST – *Sequence Type*

STGG – *Milk-Tryptone-Glucose-Glycerine*

SVE – Secretaria de Vigilância Epidemiológica

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Panamericana de Saúde

PCV7– Vacina anti-pneumocócica conjugada

PCV7– Vacina anti-pneumocócica conjugada 7-valente

HDT – Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia

SIREVA – Sistema Regional de Vacinas

WHO – *World Health Organization*

RESUMO

Introdução

A circulação de cepas de pneumococo em crianças que frequentam creches é maior quando comparada à população em geral. A morte de uma criança de 10 anos de idade por meningite pneumocócica (sorotipo 22F) que frequentava uma creche de Goiânia motivou uma investigação para avaliar a similaridade entre a cepa do caso índice e cepas de portadores, incluindo o irmão do paciente, os contactantes da creche do paciente e da creche do irmão.

Métodos

Foram investigadas duas creches de Goiânia, Goiás, durante o período de julho a novembro de 2008, uma delas frequentada pelo paciente (caso índice), e a outra frequentada pelo irmão da paciente. *Swabs* de nasofaringe e dados demográficos foram obtidos de 155 crianças e 69 contatos. A presença de portador de pneumococo foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) e cultura convencional. Sorotipagem foi realizada pela PCR multiplex e reação de Quellung (padrão-ouro). O sequenciamento genético da cepa do caso índice foi realizado pela técnica de *Multi Locus Sequence Type* (MLST) para determinação do *sequence type* (ST).

Resultados

A taxa de portador pela RT-PCR e pela cultura convencional foi 50,0% e 36,6%, respectivamente ($p < 0,05$). Vinte e quatro diferentes sorotipos foram detectados pela PCR multiplex e vinte pela reação de Quellung ($p = 0,06$). Co-colonização foi identificada em 7,5% pela PCR multiplex e 4,9% pela reação de Quellung. O sorotipo 22F, identificado apenas na creche do irmão da paciente, foi detectado em três crianças pela reação de Quellung e em oito pela PCR multiplex, incluindo o irmão do caso índice. O sorotipo 22F foi o segundo mais frequentemente associado a colonizações múltiplas (PCR multiplex). Um novo ST-22F foi identificado para a cepa de pneumococo isolada do líquido do paciente.

Conclusões

Há evidências de similaridade fenotípica e genotípica entre o sorotipo causal da meningite pneumocócica e a cepa colonizadora do irmão da paciente. A PCR multiplex é uma metodologia útil para avaliar o impacto da vacinação anti-pneumocócica na detecção da diversidade de sorotipos colonizadores não cobertos pela vacina e múltiplos sorotipos presentes em uma mesma amostra clínica.

ABSTRACT

Background

Day-care-centers typically optimize the circulation of pneumococcal strains among children. A death of a 10-year-old child due to pneumococcal meningitis serotype 22F in a day-care-center prompted an investigation that involved assessing nasopharyngeal carriage and serotypes among attendees. We determined the serotype of the meningitis case isolate, and serotypes from nasopharyngeal specimens of contacts, which included the case-patient's brother, the case-patient's day-care contacts, and the brother's day-care contacts.

Methods

We investigated two day-care centers of Goiânia, Brazil, attended by the index-case and by her brother during July-November 2008. Nasopharyngeal swabs and demographic data from 155 children and 69 contacts were obtained. Following broth-enrichment of nasopharyngeal specimens, *lytA*-targeted real time PCR and conventional multiplex PCR assays were used to detect pneumococcal carriage and determine serotypes. Conventional culture and serotyping (Quellung reaction) were also performed. Multi Locus Sequence Type (MLST) was carried out for sequence type (ST) ascertainment.

Results

Overall, pneumococcal carriage by RT-PCR and conventional culture was 50.0% and 36%, respectively ($p < 0.05$). Twenty-four types were detected using multiplex PCR, and twenty by Quellung reaction ($p > 0.06$). Colonization with multiple pneumococcal serotypes was determined in 7.5% of the carriers by multiplex PCR and 4.9% by Quellung. Serotype 22F was mostly associated to co-colonization by multiplex PCR. All the eight serotype 22F specimens obtained by multiplex PCR were from children attending the brother's day-care-center (including the patient's brother). A new ST-22F was identified for the pneumococcal meningitis strain.

Conclusions

The study demonstrated the utility of multiplex PCR for determining carriage serotype distribution in a setting of high-risk pneumococcal transmission. Using this approach the causal serotype could be potentially linked to the brother of the case-patient and attendees of his day-care. This methodology is useful for uncovering pneumococcal carriage serotype diversity and for detecting multiple serotypes within the same specimen.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – *Streptococcus pneumoniae* e saúde pública

As doenças causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) constituem um dos principais problemas de saúde pública na infância, devido à sua alta morbi-mortalidade. Em todas as regiões do Mundo, a doença pneumocócica é a principal causa de óbitos por doenças imunopreveníveis na infância (O'Brien et al 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no ano 2006 cerca de 1 milhão de crianças morreram em decorrência de infecções por *S. pneumoniae*, dentre elas meningites, pneumonias, bacteremias e sepses (WHO 2007). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doença pneumocócica invasiva (DPI) incluem idade menor de 2 anos, baixo nível sócio-econômico e presença de comorbidades (CDC 2006, Pilishvili et al 2010, Pilishvili et al 2010a).

1.2- Meningites por *Streptococcus pneumoniae*

Após a introdução da vacina contra o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) nos programas nacionais de imunização de vários países na década de 90, o *S. pneumoniae* tornou-se o principal agente etiológico das meningites bacterianas agudas em alguns países do mundo (CDC 2009a, Hsu et al 2009). A incidência da meningite pneumocócica varia geograficamente. Em metanálise publicada recentemente, a incidência global em crianças foi de 17 por 100 mil habitantes para o ano 2000, sendo as maiores taxas no continente africano (38 por 100 mil) e as menores no continente americano (12 por 100 mil) (O'Brien et al 2009).

A meningite pneumocócica pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais frequente em crianças menores de 5 anos. Apesar da baixa carga da doença e da terapia antimicrobiana comprovadamente eficaz, o pneumococo é responsável por altas taxas de letalidade e graves sequelas decorrentes de meningites na infância, como

hidrocefalia, déficit cognitivo e motor, perda auditiva, problemas comportamentais e dificuldades de aprendizagem ([Edmond et al 2010](#)).

No Brasil, as taxas de incidência de meningite por pneumococo na população geral variam de 0,5 a 1,0 por 100.000 habitantes, sendo maior em lactentes. Em 2009, a incidência da doença em crianças menores de 12 meses de vida foi estimada em 5 casos por 100 mil habitantes (MS 2010). No mesmo ano, somente no Estado de São Paulo, o coeficiente de incidência de meningite pneumocócica em crianças menores de 2 anos alcançou 8 por 100.000 habitantes (SES/SP 2010). No município de Goiânia, um estudo populacional realizado entre 2007 ([Andrade et al 2008](#)) e 2009 ([Andrade et al 2010](#)) em crianças de 28 dias a 36 meses de idade, revelou uma incidência de meningite pneumocócica de 7 por 100 mil habitantes/ano.

Em 2000, a letalidade por meningite pneumocócica foi estimada em 38% na Europa, 48% nas Américas e 79% em países do continente africano ([O'Brien et al 2009](#)). Contrastando com a baixa incidência, as taxas de letalidade da meningite pneumocócica são extremamente elevadas, quando comparadas à letalidade da *Neisseria meningitidis* e Hib, principalmente em menores de 1 ano. No Brasil, entre os anos 2001 e 2006, o coeficiente médio de letalidade de meningite pneumocócica foi de 30% para crianças menores de 5 anos, enquanto que para *N. meningitidis* e Hib os coeficientes foram 19,8% e 17,6%, respectivamente ([Valenzuela et al 2009](#), [Castañeda et al 2009](#), MS 2010).

A grande perspectiva de controle da meningite por *S. pneumoniae* é a vacina anti-pneumocócica conjugada, recentemente introduzida no calendário de imunizações da infância do Ministério da Saúde do Brasil (MS 2010). Devido aos benefícios diretos e indiretos da vacinação ([O'Brien & Dagan 2003](#)), o uso em larga escala da vacina é uma estratégia que mostra uma relação altamente positiva de custo benefício (WHO 2007).

1.3- Colonização por *Streptococcus pneumoniae* na infância

A nasofaringe constitui a principal porta de entrada e o reservatório natural do pneumococo, de onde se dissemina para causar doenças invasivas ou infecções do trato

respiratório superior ([Bogaert et al 2004](#)). O epitélio da mucosa nasofaríngea pode albergar, simultaneamente, diferentes sorotipos e determinar o chamado “estado de portador” em indivíduos sem sintomatologia, caracterizando o “portador assintomático” (Fedson et al 1999, Ghaffar et al 1999).

A idade é o fator determinante para a colonização da nasofaringe, que se inicia no primeiro ano de vida, alcançando as maiores prevalências aos dois anos de idade (Aniansson et al 1992, Principi et al 1999, Syrjänen et al 2001, Hill et al 2006, Hill et al 2010). Locais de grandes aglomerados como creches e escolas podem facilitar a disseminação do *S. pneumoniae* na comunidade de forma direta, por meio de contatos inter-pessoais mais frequentes, e indiretamente, pelo aumento da prevalência do estado de portador de pneumococo (Dunais et al 2003, Bogaert et al 2004). Portanto, reconhece-se que crianças constituem o principal grupo de risco para a colonização por pneumococo, devido ao contato mais prolongado a que esta população está exposta.

Existem evidências de que a colonização das vias respiratórias pelo *S. pneumoniae* precede a ocorrência de infecções causadas por este patógeno. Assim, os isolados de pneumococo encontrados na nasofaringe de portadores são a fonte primária de infecção por sorotipos associados ao desenvolvimento de doença pneumocócica (Lloyd-Evans et al 1996, [Brueggemann et al 2003](#), de Andrade et al 2003, Laval et al 2006, Berezin et al 2007).

1.4- Sorotipos de *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae são microorganismos gram positivos que se apresentam aos pares (diplococos), ou mais raramente isolados, e possuem em sua superfície uma cápsula polissacarídica com ação anti-fagocítica “*in vivo*”, fator de virulência mais importante do pneumococo. Até o momento, foram identificados 93 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*, distinguidos pelas características de sua cápsula (Lipsitch 2010), mas apenas 23 sorotipos causam a maioria dos casos de doença pneumocócica (Hausdorff et al 2000). A cápsula expressada pelo pneumococo pode ser detectada por reação com anti-soro específico. No entanto, alguns isolados apresentam resultado negativo para todos os mais de 90 anti-soros tipo específicos sendo designados como *S. pneumoniae*

não tipáveis (SpNT), os quais são importantes causadores de doença não invasiva, como otite média e pneumonia não bacterêmica (Finland & Barnes 1977, Hathaway et al 2004). A capacidade reduzida de produzir anticorpos contra antígenos da cápsula do *S. pneumoniae* em crianças menores de dois anos e a alta frequência de colonização pode, em parte, explicar a maior suscetibilidade desta faixa etária à infecção pneumocócica.

O sorotipo 14 constitui o principal isolado de nasofaringe tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Em geral, os sorotipos 6A, 6B, 14, 18C, 19F e 23F são os que predominam na nasofaringe de crianças abaixo de 3 anos de idade em países industrializados, como mostram alguns estudos realizados entre 1999 e 2008 (Bogaert et al 2001, Coles et al 2001, Soewignjo et al 2001, Syrogiannopoulos et al 2002, Lo et al 2003, Malfroot et al 2004, Ochoa et al 2005, Russell et al 2006, Sogstad et al 2006, Wattal et al 2007, [Leino](#) et al 2008, Dunais et al 2008, Rodrigues et al 2009, Millar et al 2009). Cinco destes tipos capsulares estão contemplados na vacina anti-pneumocócica conjugada 7-valente (PCV7) (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F).

Sabe-se que a PCV7 reduz a colonização da nasofaringe por sorotipos vacinais, mas pode levar a um aumento de sorotipos não vacinais, e conseqüentemente de doença pneumocócica invasiva provocada pelos mesmos (Dagan et al 1996, Moore et al 2004, Hennessy et al 2005, Huang et al 2005, [Käyhty](#) et al 2006, van Gils et al 2009). Corroborando com estes dados, estudos mostram que desde o licenciamento da PCV7 no ano 2000, os sorotipos não-vacinais vêm ganhando importância como colonizadores de nasofaringe em crianças. Dentre eles, estão o 6C, 7F, 11A, 15, 16F, 19A e 23A (Frazão et al 2005, Huang et al 2009, Leach et al 2009, Rodrigues et al 2009, Espinosa-de Los Monteros et al 2010, Sá- Leão et al 2009).

No Brasil, estudos realizados entre 1998 e 2006 mostraram que a prevalência de portador de *S. pneumoniae* pode variar de 13,3 a 72%, conforme a idade e a presença de doenças associadas. Dentre os sorotipos mais isolados, estão o 6A, 6B, 14, 15, 19A, 19F e 23F, especialmente em crianças abaixo de 5 anos de idade que frequentam creches (Wolf et al 2000, Lucarevski et al 2003, Laval et al 2006, Cardoso et al 2006, Berezin et al 2007, Reis et al 2008, Franco et al 2010, Andrade et al 2010).

Apesar da maioria das investigações evidenciar associação entre a prevalência de sorotipos de pneumococo colonizadores e causadores de doença invasiva, alguns autores observam que nem sempre esta relação é verdadeira (Andrade et al 2004, Bogaert et al 2004, Weinberger et al 2010). Os sorotipos 1, 3, 5, 7F, 8, 33 e 38, por exemplo, são frequentemente isolados de crianças com doença pneumocócica, mas raramente da nasofaringe de portadores saudáveis (Hausdorff et al 2000, Di Fabio et al 2001).

Com relação à DPI, várias publicações evidenciam que o sorotipo 14 compõe o grupo de maior prevalência na infância, em todas as regiões do Mundo (Farrell et al 2004, Andrade et al 2010, Isaacman et et al 2010, Vickers et al 2010, Johnson et al 2010). Na América Latina, parece haver uma similaridade no que diz respeito aos sorotipos mais frequentemente implicados na DPI. Como a maioria dos países ainda não incorporou a PCV7 no calendário de imunizações, os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, incluídos na vacina, estão entre os mais prevalentes. Os sorotipos 1 e 5 também têm sido descritos nos últimos anos como um dos principais causadores de DPI na infância nos países do continente latinoamericano (Hortal et al 1997, Brandileone at al 2003, Camargos et al 2006, Laval et al 2006, Berezin et al 2007, Mayoral et al 2008, Valenzuela et al 2009). No entanto, a prevalência destes sorotipos flutua ao longo dos anos, sendo mais frequente em crianças maiores de 3 anos de idade. No Brasil, dados do projeto SIREVA (vigilância laboratorial) mostram uma tendência a queda dos sorotipos 1 e 5 nos últimos anos (OPAS 2008, Castañeda et al 2009). Já no continente africano, o sorotipo 1 vem ganhando importância devido a alta virulência e associação cada vez mais frequente com doença pneumocócica, inclusive em maiores de 5 anos (Yaro et al 2006, Adegbola et al 2006, Gessner et al 2010, Mothibeli et al 2010).

Na era pré-PCV7, estudos realizados na Europa e nos EUA mostraram que dos mais de 90 sorotipos de *S. pneumoniae*, os 7 incluídos na vacina foram responsáveis pela maioria dos casos de DPI em crianças menores de 5 anos (Hausdorff et al 2001, Hausdorff 2002, Jacobs et al 2008, Hsu et al 2010). No entanto, com a vacinação de rotina nos países desenvolvidos, houve uma diminuição significativa na incidência de DPI por sorotipos vacinais nos últimos anos (Hsu et al 2005, Musher 2006, Poehling et al 2006, Black 2008, CDC 2008, Isaacman et al 2010). Dados do CDC (Centers of Diseases Control and Prevention) revelam que entre 1998 e 2008 ocorreu uma redução

de 90% de DPI por sorotipos vacinais em crianças menores de 5 anos de idade (CDC 2005, CDC 2008). Em contrapartida, houve um aumento do número de casos de DPI na infância por sorotipos não-vacinais, o que sugere uma tendência à substituição dos sorotipos de *S. pneumoniae* causadores de doença pneumocócica, fenômeno conhecido como “substituição vacinal”. O crescente aumento do sorotipo 19A é um exemplo deste fenômeno.

Nos EUA, o sorotipo 19A foi o mais frequentemente isolado de crianças com DPI no ano 2008, alcançando quase 50% dos casos, seguido dos sorotipos 7F (10%) e 22F (5%). No mesmo ano, dentre os sorotipos contidos na PCV7, somente o 18C foi detectado (CDC 2008). Corroborando com estes achados, estudos realizados na era pós-PCV7 nos EUA e Europa mostram a “emergência” de sorotipos invasivos não-vacinais, como o 1, 3, 6A, 15 e 19A (Hsu et al 2005, Pelton et al 2007, Pichichero & Casey 2007, Jacobs et al 2008, Critchley et al 2008, Farrell et al 2008, Dagan 2009, Sá-Leão 2009, Aguiar et al 2010, Isaacman et al 2010, Reinert et al 2010, Zemlickova et al 2010).

Em relação à meningite pneumocócica, a maioria dos estudos foi realizada em países que já incorporaram rotineiramente a PCV7. Os resultados das principais investigações não mostram grandes diferenças quanto à prevalência de sorotipos causadores de doença invasiva e meningite por pneumococo. Na França, apesar da curva decrescente da doença, os sorotipos mais prevalentes em indivíduos de 1 a 18 anos de idade ainda são aqueles contidos na vacina (Bingen et al 2008). Outros estudos na Europa e EUA têm mostrado que os sorotipos não-vacinais como 6A, 7F, 19A, 15A e 22F têm aumentado como causa de meningites pneumocócicas, inclusive na faixa etária maior de 5 anos (Nigrovic et al 2008, Alexandre et al 2010). Dados de vigilância populacional realizada entre 1998 e 2005 nos EUA indicam um aumento de 60% na incidência de casos de meningite pneumocócica causada por sorotipos não-vacinais, especialmente o 19A e 22F. Por outro lado, houve uma redução de 73% no número de casos da doença por sorotipos incluídos na PCV7 (Hsu et al 2009).

Na África e em alguns países da Europa (Berg et al 2006, [Motlová 2005](#)), o sorotipo 1 tem sido relacionado a surtos e casos letais de meningites (Leimkugel et al 2005, Yaro et al 2006, Gessner et al 2010), sugerindo que este tipo capsular expressa cepas com grande potencial de invasão (Hausdorff et al 2005, [Zemlickova et al 2010](#)). Na América

Latina e Caribe, estudos conduzidos entre 1990 e 2006 mostraram que os sorotipos mais prevalentes de meningite na infância são o 1, 5 e aqueles contidos na PCV7, que ainda não foi introduzida na maioria dos países que compõem este grupo ([Valenzuela et al 2009](#)). No Brasil, os principais sorotipos causadores de meningites por *S. pneumoniae* são aqueles incluídos na PCV7 (Reis et al 2002, Berezin et al 2002, de Andrade et al 2003, Brandileone et al 2003, Laval et al 2006, Vieira et al 2007).

1.5- Técnicas moleculares na identificação de *Streptococcus pneumoniae*

A relação entre os sorotipos de pneumococo colonizadores e invasivos está bem estabelecida em vários estudos de epidemiologia molecular que verificaram similaridade genética entre isolados invasivos e colonizadores (Lloyd-Evans et al 1996, Robinson et al 2001, Andrade et al 2003, Brueggemann et al 2003). As informações geradas pelos estudos de epidemiologia molecular do pneumococo permitem conhecer os tipos e subtipos genéticos circulantes em uma determinada região, em um período de tempo. O conhecimento sobre as características moleculares das cepas circulantes, sua frequência, diversidade e a eventual substituição de tipos capsulares são fundamentais para o monitoramento das doenças pneumocócicas na era pré e pós-vacinação (Tomasz et al 1998, Sá-leão et al 2000, McGee et al 2001, Bruggemann et al 2003).

A detecção e a sorotipagem de *S. pneumoniae* em amostras clínicas são usualmente realizadas por métodos convencionais de cultura e pela reação de Quellung, respectivamente (Henrichsen 1995). No entanto, a utilização destas técnicas para identificar uma possível colonização ou infecção por pneumococo esbarra em alguns obstáculos como o custo elevado, subjetividade na interpretação, e experiência do observador, podendo assim, subestimar a prevalência de DPI e a presença de múltiplos tipos capsulados em uma mesma amostra. Sobrepondo estas desvantagens, nos últimos anos pesquisadores têm desenvolvido novas técnicas moleculares para detecção de isolados de pneumococo, como as reações de PCR (*polymerase chain reaction*). Esta metodologia permite tanto a detecção quanto a sorotipagem de *S. pneumoniae*, e pode ser particularmente útil em vigilância epidemiológica e nos casos em que as culturas forem inicialmente negativas devido ao uso prévio de antibióticos (Lawrence et al 2000, Rubin & Rizvi 2004).

A PCR em tempo real (RT-PCR) consiste na detecção do *S. pneumoniae*, utilizando-se como alvo o gene capsular *lytA* a partir de extratos de DNA preparados diretamente de uma amostra clínica, seguida de reação de amplificação (Corless et al 2001). Já a PCR multiplex convencional é uma técnica capaz de detectar, de forma simultânea, diferentes sorotipos de pneumococos em uma mesma reação de amplificação de DNA (co-amplificação), utilizando para isso mais de um conjunto de pares de *primers* (inicializadores) (Brito et al 2003).

A técnica de RT-PCR para genotipagem do pneumococo começou a ser desenvolvida em 1997 (Messmer et al 1997, Messmer et al 2004), enquanto que os primeiros estudos sobre o uso da PCR multiplex para sorotipagem do *S. pneumoniae* foram publicados em 2003 (Brito et al 2003, Lawrence et al 2003). Desde então, alguns autores têm aprimorado estas práticas moleculares na identificação de cepas de *S. pneumoniae* (Dunbar 1998, Pai et al 2006, Parra et al 2007). Como exemplo, ressalta-se o uso da RT-PCR e PCR multiplex na detecção e sorotipagem de pneumococo diretamente de espécimes clínicas, como líquido e secreção nasofaríngea, e por meio do enriquecimento das amostras (Moreno et al 2005, Dias et al 2007, Billal et al 2008, Azzari et al 2008, Saha et al 2008, Vestrheim et al 2008, Antonio et al 2009, Brugger et al 2009, Njanpop et al 2010, Ceyhan et al 2010, Carvalho et al 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A vigilância da colonização por *S. pneumoniae* permanece como uma necessidade para identificar mudanças na circulação dos sorotipos vacinais e não vacinais, e avaliar o impacto da PCV na colonização por pneumococo em países como o Brasil, onde a vacina foi incorporada na agenda do Programa Nacional de Imunização (PNI). Antecipando a introdução da PCV, pesquisadores do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP) têm-se dedicado a investigações sobre a distribuição de sorotipos, suscetibilidade e padrão molecular de isolados de pneumococos colonizadores e causadores de doença invasiva (Brandileone et al 2003, de Andrade et al 2003, Andrade et al 2004, Laval et al 2006, Andrade et al 2010).

Em 30 de junho de 2008 um caso de meningite em uma criança de 10 anos de idade foi notificado pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Município de Goiânia (SVE/SMS-GO). A criança frequentava a Creche Associação São Francisco de Assis, também conhecida como Projeto Chiquinho, que conta com 46 crianças com idade entre 6 e 12 anos. A paciente faleceu após 12 dias de internação. O diagnóstico etiológico de *S. pneumoniae*, sensível a penicilina, foi confirmado pelo Laboratório Central de Saúde Pública Goiânia-GO (LACEN) em cultura e teste de sensibilidade a partir do líquido. O sorotipo 22F foi identificado pela reação de Quellung. Naquela ocasião, uma equipe composta por pesquisadores do IPTSP e técnicos da SMS-GO realizou uma investigação epidemiológica em todas as crianças da creche e em seus contactantes, e nas crianças da creche Efrata, onde frequentava o único irmão (28 meses de idade) do caso índice.

Recentemente, pesquisadores do CDC desenvolveram técnicas adaptadas de RT-PCR e PCR multiplex convencional para detecção de *S. pneumoniae* diretamente de amostras de secreções nasofaríngeas enriquecidas em caldo (CDC 2010). Acredita-se que este processo possa aumentar o rendimento da PCR, otimizando a detecção e sorotipagem do pneumococo em comparação aos métodos tradicionais. Um estudo que comparou as duas técnicas, com e sem enriquecimento, mostrou que a positividade em detectar crianças portadoras de pneumococo em amostras de nasofaringe foi de 16% pela RT-

PCR, enquanto que pelo enriquecimento em caldo, a positividade foi de 44%. Quanto à sorotipagem, a identificação dos sorotipos pela PCR multiplex aumentou de 12 (metodologia convencional) para 19 sorotipos com a técnica de enriquecimento (Carvalho et al 2010).

Devido a estes resultados promissores, o presente estudo utilizou a RT-PCR e PCR multiplex, em parceria com o CDC, para investigar o vínculo epidemiológico entre o caso índice e os contactantes do mesmo.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

- Avaliar a similaridade entre a cepa de *Streptococcus pneumoniae* de caso fatal de meningite (caso índice) e isolados de nasofaringe de crianças de duas creches no Município de Goiânia, e de seus contactantes (funcionários das creches e contactantes domiciliares).

3.2- Objetivos específicos

- Comparar a prevalência de colonização nasofaríngea por pneumococo nas crianças das creches, pelas técnicas da RT-PCR e cultura enriquecida.
- Avaliar a utilidade da técnica de PCR multiplex para detectar múltiplos sorotipos em uma mesma amostra.
- Comparar a positividade da detecção de sorotipos entre as reações de Quellung e a PCR multiplex convencional.
- Identificar fatores associados à co-colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae* em crianças que frequentam duas creches no Município de Goiânia.
- Avaliar o vínculo epidemiológico entre o isolado de pneumococo do caso índice e das crianças, funcionários das creches, e contactantes domiciliares.

4. METODOLOGIA

4.1- Desenho, local e população do estudo

Em julho de 2008 ocorreu um óbito por meningite pneumocócica em uma criança de 10 anos que frequentava uma creche do município de Goiânia, Goiás-Brasil. Foi então iniciada uma investigação epidemiológica, observacional, descritiva e analítica, conduzida no período de julho a novembro de 2008 em duas creches de Goiânia. A primeira era frequentada pelo caso índice (creche Chiquinho), e a segunda pelo irmão do caso índice (creche Efrata). A população do estudo incluiu 155 crianças das creches Chiquinho e Efrata com idade entre 2 a 163 meses, e 59 crianças e adultos contactantes domiciliares e 10 funcionários da creche Chiquinho.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica em Pesquisa (CEP) do Hospital Materno Infantil da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás-Brasil, atendendo à resolução 196/96 (anexo 1).

4.2- Coleta dos dados

Visitas foram agendadas na própria creche, e entrevistas com os pais e coletas das amostras foram realizadas após obtenção de consentimento informado. Os anexos 2 e 3 apresentam as informações obtidas da criança e do contactante, respectivamente.

4.3- Coleta das amostras

De cada participante foi obtida uma amostra de secreção de nasofaringe, coletada de acordo com as recomendações técnicas da OMS (O'Brien 2003a), por meio de *swab* de alginato de cálcio com haste flexível (Medical Wire, Corsham, UK). Para o transporte, as amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos contendo 1 mL de STGG (*milk-tryptone-glucose-glycerine*), e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia do IPTSP/UFG em Goiânia-Brasil. Os tubos contendo as amostras de

nasofaringe em STGG eram vortexados por 10 a 20 segundos e armazenados em freezer a -80°C , até o encaminhamento ao CDC, Atlanta-EUA, onde foram realizados os procedimentos de cultivo em caldo enriquecido, cultura, e extração do DNA para RT-PCR e PCR multiplex. Um dos pesquisadores do IPTSP (JLC) participou das etapas da RT-PCR e PCR multiplex no CDC, como estratégia de transferência de tecnologia.

4.4- Procedimentos microbiológicos

4.4.1- Enriquecimento

O isolamento de *S. pneumoniae* a partir do meio STGG foi realizado com o auxílio do caldo enriquecido, que consiste em 5 mL do caldo Todd-Hewitt contendo 0,5% de extrato de levedura suplementado com 1 mL de soro de coelho. Após o descongelamento e vórtex dos espécimes do STGG, uma alíquota de 200 μL foi adicionada ao caldo enriquecido e incubada por 4 a 6 horas a 37°C , em estufa de CO_2 .

4.4.2- Cultura convencional

Após a incubação do caldo enriquecido, alíquotas de 10 μL foram semeadas sobre placas de Agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) suplementadas com 5% de sangue de carneiro e incubadas a 37°C , por 18 a 24 horas em estufa de CO_2 . As colônias alfa-hemolíticas sugestivas de pneumococo (apenas uma colônia de cada morfotipo) foram testadas para susceptibilidade a optoquina e solubilidade em bile. Os isolados positivos de *S. pneumoniae* foram utilizados para a sorotipagem pela reação de Quellung. As etapas de isolamento e identificação foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do IPTSP, Goiânia-Brasil, e em seguida validadas no CDC, EUA.

4.5- Sorotipagem por reação de Quellung

Padrão ouro para a sorotipagem de pneumococo, a reação de Quellung foi realizada no CDC, Atlanta-EUA, por meio de aglutinação em látex. Os anti-soros padrões foram

obtidos junto ao *Statens Seruminstitut*, Copenhague-Dinamarca (Sorensen 1993), para a identificação de todos os 93 diferentes sorotipos de pneumococo. Para a reação de Quellung, os isolados obtidos pela cultura foram subcultivados e armazenados em 1 mL do meio STGG ou de caldo tríptico de soja (*tripticase soy broth*) acrescido de 30% de glicerol. Os resultados foram comparados com a sorotipagem obtida pela PCR multiplex convencional, descrita a seguir.

4.6- Procedimentos moleculares

4.6.1- Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 µL do caldo enriquecido, utilizando-se o kit “DNeasy Blood and Tissue” (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante, com um passo de pré-incubação de 1 hora em 100 µL do tampão pré-lise (1,0 M Tris-HCL, 0,5 M EDTA, Triton X-100), acrescido de 0,02 g/mL de lisozima e 5 U/mL de mutanolisina a 37°C. O produto resultante deste processo foi utilizado para a realização dos métodos de PCR no CDC, Atlanta-EUA, enquanto que o restante do caldo enriquecido foi novamente armazenado a -70°C.

4.6.2- Real-time PCR (RT-PCR)

O RT-PCR foi aplicado para detecção de *S. pneumoniae*, utilizando-se como alvo o gene *lytA* a partir dos extratos de DNA preparados diretamente do caldo enriquecido. Para a amplificação foi usado 25 µL de volume contendo master (Taqman Universal PCR Master Mix - Applied Biosystems); 20 ng de DNA extraído foi utilizado em cada reação PCR.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador iCycler iQ5 Real Time PCR System (Bio-Rad) seguindo o programa: 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Foram consideradas amostras negativas aquelas com valores de *cycle threshold* (Ct) maiores que 35. Os resultados positivos foram processados para a realização do PCR multiplex convencional.

4.6.3- PCR multiplex convencional

As cepas detectadas pelo RT-PCR foram submetidas à sorotipagem pela PCR multiplex convencional. Para um total de 40 soroespecificidades, utilizou-se 8 reações sequenciais, divididas em cinco sorogrupos, de acordo com o proposto por Pai e colaboradores (2006), e aplicando-se as modificações. Foram testadas somente as amostras positivas para o gene *lytA* com $Ct \leq 30$. As reações incluíram os seguintes sorotipos:

Reação 1 - 14, 6A/6B, 6C, 23F, 19A, 9V/9A

Reação 2 - 19F, 3, 15B/15C, 18 (18A,18B/18C/18F), 7F/7A

Reação 3 - 1, 5, 11A/11D, 9N/9L, 17F

Reação 4 - 7C/7B/40, 12F/12A/44/46, 4, 38/25F, 23A

Reação 5 - 8, 2, 34, 20, 22F/22A

Reação 6 - 33F/33A/37, 15A/15F, 35F/47, 35B, 16F

Reação 7 - 39, 23B, 35A/35C/42, 13

Reação 8 - 24 (24A/24B/24F), 21, 10F/10C/33C, 10A, 31

A mistura de reação para amplificação do PCR foi preparada em um volume final de 25 mL contendo master mix (Platinum PCR Supermix - Invitrogen), 25 mM de cada primer e 30 ng do DNA template.

A reação de amplificação foi realizada pelo aparelho Maxygene Termociclador (Axygen), seguindo o programa: 15 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 54°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão Tris-Acetato-EDTA 1x por 90 minutos a 100V. Os controles positivos e negativos de cada sorogrupo/sorotipo foram adicionados para cada uma das 8 reações. O gel foi corado em solução aquosa de brometo de etídio (0,5 g/mL), visualizado e

fotografado na transiluminação com luz ultravioleta e capturado com o sistema “Molecular Image GelDoc XR” (BioRad).

4.6.4- Multilocus Sequence Typing (MLST)

A cepa do sorotipo 22F do paciente de meningite pneumocócica foi caracterizada pela técnica de MLST, realizada no Laboratório de Bacteriologia do IPTSP, Goiânia-Brasil, conforme protocolo desenvolvido por Enright e colaboradores (Enright & Spratt 1998). O método baseia-se no sequenciamento dos fragmentos internos (~450bp) de regiões altamente conservadas de sete genes *housekeeping* específicos para *S. pneumoniae*. Os pares de *primers* utilizados para os sete genes são descritos na tabela abaixo.

Para a extração do DNA genômico das cepas foi utilizado o protocolo que se encontra disponível no site do CDC (CDC 2009).

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

| Genes | Primer | Sequência (5' – 3') |
|--|--------------|--|
| Shikimato desidrogenase (<i>aroE</i>) | <i>aro-F</i> | GCC TTT GAG GCG ACA GC |
| | <i>aro-R</i> | TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA |
| Glucose-6-fosfato desidrogenase (<i>gdh</i>) | <i>gdh-F</i> | ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT |
| | <i>gdh-R</i> | GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC |
| Glucose quinase (<i>gki</i>) | <i>gki-F</i> | C ATT GGA ATG GGA TCA CC |
| | <i>gki-R</i> | TCT CCC GCA GCT GAC AC |
| Transquetolase (<i>recP</i>) | <i>rec-F</i> | GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG |
| | <i>rec-R</i> | TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC |
| Peptidase de sinal I (<i>spi</i>) | <i>spi-F</i> | TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC |
| | <i>spi-R</i> | GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA |
| Xantina fosforibosiltransferase (<i>xpt</i>) | <i>xpt-F</i> | TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT |
| | <i>xpt-R</i> | AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC |
| D-alanina-D-alanina ligase(<i>ddl</i>) | <i>ddl-F</i> | TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG |
| | <i>ddl-R</i> | CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT |

A mistura da reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂); 80 µM de cada dNTP (MBI Fermentas, Hanover, MD); 0,25 µM de cada primer; 1 U de AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystems); 20 ng do DNA template. A reação de amplificação foi realizada no termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany) seguindo o programa: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Seakem LE, FMC) em tampão Tris-Acetato-EDTA 1 X por 30 minutos a 100V. O marcador de 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi utilizado como padrão de peso molecular. O gel foi corado com brometo de etideo a 0,5 µg/mL visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta. Os produtos da PCR foram sequenciados utilizando-se o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) e analisados no aparelho ABI 3130 Genetic Analyzer. As sequências de DNA obtidas foram analisadas com o auxílio do software DNASTar (Lasergene, Madison, Wis.). As sequências consensos resultantes foram submetidas ao servidor MLST (MLST 2010), que para cada *locus* atribuiu um número de alelo distinto. Um perfil alélico foi gerado com os alelos de cada um dos sete genes para determinação do *sequence type* (ST).

4.7- Análises dos dados

Utilizou-se para a análise dos dados o programa SPSS versão 16.0. Os resultados obtidos pela RT-PCR diretamente do *swab* contendo STGG foram comparados com os obtidos pela cultura enriquecida em caldo. A prevalência de colonização por *S. pneumoniae* por cultura enriquecida e RT-PCR foi calculada como o número de isolados identificados para cada técnica, divididos pelo total de amostras coletadas. A co-colonização por múltiplos sorotipos foi definida pela presença de pelo menos dois tipos capsulares diferentes detectados na mesma amostra de secreção nasofaríngea. Diferença entre medianas foi avaliada pelo teste Kruskal-Wallis. Os fatores de risco associados à co-colonização foram avaliados pelo *odds ratio* e correspondentes

intervalos de 95% de confiança. Valores de p inferiores a 5% foram definidos como estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

As características das crianças participantes e a prevalência de *S. pneumoniae* nas creches são apresentadas na Tabela 2. As crianças que frequentavam a creche Efrata (N=111) eram estatisticamente mais novas do que as que frequentavam a creche Chiquinho (N=44). A mediana de idade das crianças da creche Chiquinho foi estatisticamente menor do que da creche Efrata ($p < 0,001$). Os participantes da creche Efrata receberam mais antibióticos nos últimos 3 meses ($p < 0,001$) e foram menos expostos a creches ($p = 0,000$), quando comparados aos da creche Chiquinho. Apesar disso, a taxa de colonização das crianças da creche Efrata (73%; IC 95% 63,7-80,9) foi maior ($p < 0,01$) em relação às crianças da creche Chiquinho (25%; IC 95% 13,2-40,3).

No total, foram obtidas 224 amostras de nasofaringe de crianças e adultos. A taxa de colonização por pneumococo obtida pela RT-PCR foi 50% (IC 95% 43,5-56,7), significativamente maior ($p = 0,004$) do que a cultura tradicional, que detectou 36,6% (IC95% 30,4-43,3) (Figura 1).

Vinte e quatro tipos capsulares diferentes foram detectados pela PCR multiplex, e dezenove pela reação de Quellung ($p=0,06$). Os sorotipos mais encontrados por ambas as técnicas foram 6A/6B, 14, 19F, 6C, 22F/22A, 23F e 11A/11D, em ordem decrescente de frequência (Tabela 3). Os tipos capsulares 4, 16F, 18, 20, 33F e 39 foram detectados somente por PCR multiplex, enquanto o sorotipo 34 foi identificado apenas pela reação de Quellung. A relação PCR/Quellung foi maior para o sorotipo 6A (razão = 25), seguido pelo 22F/22A (razão = 2,7).

A co-colonização foi detectada em 7,5% (17/224) dos participantes pela PCR multiplex; destes, 12 foram crianças. Cinco das 17 cepas co-colonizadoras mostraram combinações somente de sorotipos vacinais (PCV7), uma mostrou sorotipos exclusivamente não-vacinais, e 11 apresentavam ambos os sorotipos vacinais e não-vacinais. Pela reação de Quellung, houve colonização simultânea em 4,9% (11/224) dos participantes, todos crianças. A concordância de co-colonização entre as duas técnicas ocorreu em cinco

casos. A PCR multiplex foi capaz de detectar 12 combinações de tipos capsulares múltiplos, enquanto que a reação de Quellung detectou apenas 3.

Na creche Chiquinho, não houve colonização pelo sorotipo 22F. No entanto, o sorotipo do líquido do paciente (reação de Quellung) e da nasofaringe do irmão do caso índice (Quellung e PCR multiplex) foram identificados como 22F. Além do irmão, a reação de Quellung detectou mais duas crianças da creche Efrata colonizadas pelo sorotipo 22F. Já a PCR multiplex distinguiu oito casos de portadores do sorotipo 22F, incluindo as mesmas três crianças identificadas pela reação de Quellung, e outras cinco da creche Efrata. De acordo com a Figura 2, o sorotipo 22F foi o segundo mais frequentemente associado a colonizações múltiplas nos participantes das duas creches.

O risco de ser colonizado por múltiplos sorotipos foi maior para as crianças mais novas do que para as mais velhas (OR = 3,47; 1,10-11,02). Por este motivo, os participantes da creche Efrata estavam mais propensos a portar múltiplos sorotipos (OR = 3,55; 1,03-13,37). Apenas a variável idade menor de 5 anos foi fator de risco para a co-colonização (Tabela 4).

O sequenciamento da cepa 22F do líquido da paciente com meningite mostrou o perfil alélico 171, 16, 1, 1, 6, 17, 6 respectivamente para os genes *aroE*, *gdh1*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*. Este perfil não alinhou com nenhum ST da base do MLST, no entanto diferiu apenas no alelo *aroE171* do ST1638 (*aroE10*), reportado em uma cepa do Reino Unido de paciente com bacteremia.

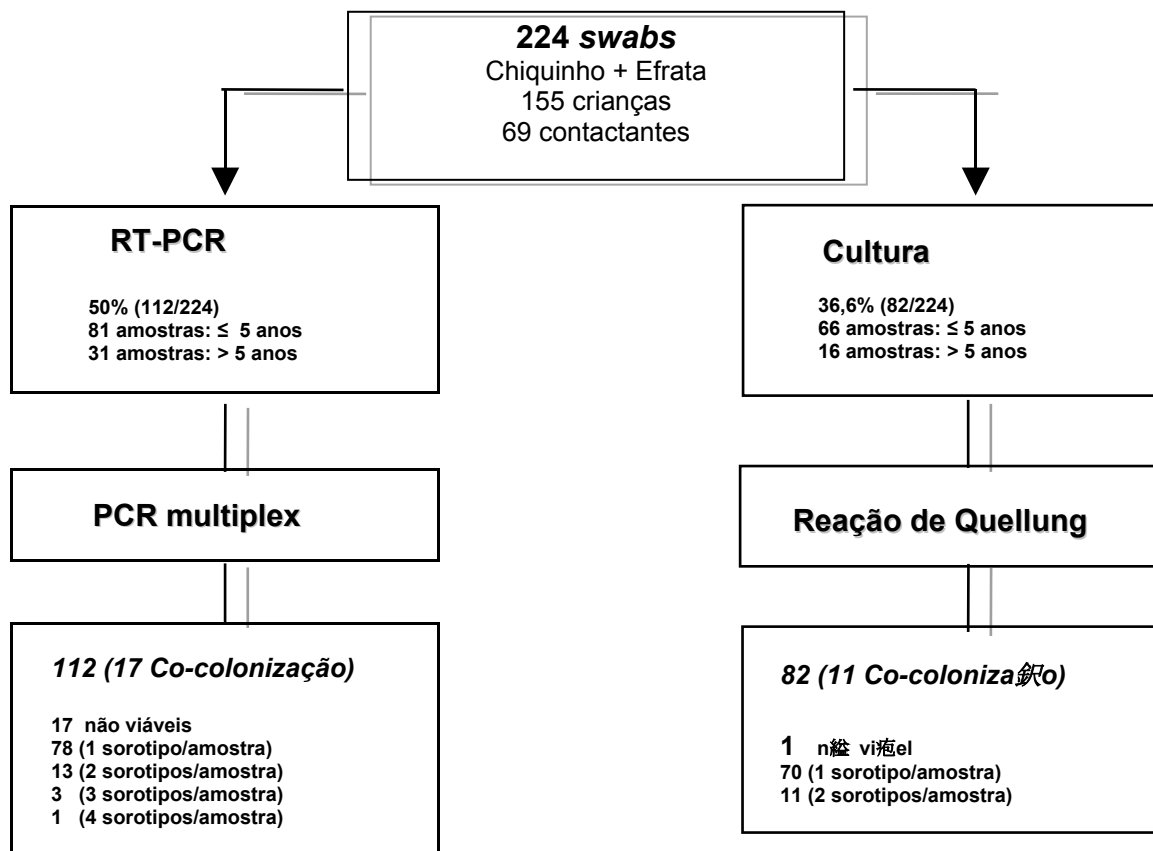


Figura 1. Fluxograma da detecção de portadores e co-colonização pela PCR e cultura convencional, para o total de 224 amostras coletadas

Tabela 2. Características das crianças e prevalência de *S. pneumoniae* nas creches Chiquinho e Efrata

| Variáveis | Creches | | Valor de P |
|--|--------------------------------|------------------------------|------------|
| | Chiquinho ^a N=44 | Efrata ^b N=111 | |
| Idade - anos | | | |
| Mediana (variância) | 10,33 (3,05) | 3,0 (1,24) | 0,000 |
| Mín-max | 7-13 | 0-5 | |
| Sexo masculino | 23 (52,3%) | 67 (60,4%) | 0,359 |
| Tempo de frequência (meses) na creche (dp) | 27,3 (21,9) | 13,6 (10,8) | 0,000 |
| Tempo de frequência (meses) em outra creche (dp) | 54,3 (22,7) | 14,4 (8,3) | 0,000 |
| Média de indivíduos no domicílio (dp) | 4,6 (3,1) | 4,5 (1,7) | 0,862 |
| Fumantes no domicílio | 14 (31,8%) | 38 (34,2%) | 0,852 |
| Uso de antibióticos nos últimos 3 meses | 8 (18,2%) | 59 (53,2%) | 0,000 |
| Prevalência de <i>S. pneumoniae</i> | | | |
| Cultura | 6 (13,6%) | 66 (59,5%) | 0,000 |
| Real-time PCR | 11 (25,0%) | 81 (73,0%) | 0,000 |

^a creche do caso índice

^b creche do irmão do caso índice

dp= desvio padrão

Tabela 3. Prevalência de sorotipos capsulares em nasofaringe de 155 crianças e 69 contatos das creches pelo PCR multiplex e reação de Quellung

| Tipos capsulares | PCR | | Reação de | | Razão PCR/Quellung |
|----------------------|-----------|------|--------------|---------|-----------------------|
| | Multiplex | | Quellung | | |
| | N | % | N | % | |
| 6A/6B* | 25 | 11,2 | 1(6A)/13(6B) | 0,4/5,8 | 25/1,9 |
| 14 | 17 | 7,6 | 10 | 4,7 | 1,7 |
| 19F | 15 | 6,7 | 11 | 4,9 | 1,4 |
| 6C | 13 | 5,8 | 11 | 4,9 | 1,2 |
| 22F/22A* | 8 | 3,6 | 3(22F) | 1,3 | 2,7 |
| 23F | 7 | 3,1 | 6 | 2,7 | 1,2 |
| 11A/11D* | 6 | 2,7 | 8(11A) | 3,6 | 0,7 |
| 13 | 3 | 1,3 | 2 | 0,9 | 1,5 |
| 3 | 2 | 0,9 | 3 | 1,3 | 0,7 |
| 15B/15C* | 2 | 0,9 | 1(15B) | 0,4 | 2,0 |
| 4 | 1 | 0,4 | 0 | 0,0 | 1,0 |
| 8 | 1 | 0,4 | 1 | 0,4 | 1,0 |
| 9V/9A* | 1 | 0,4 | 1(9V) | 0,4 | 1,0 |
| 12F/12A/44/46* | 1 | 0,4 | 1(12F) | 0,4 | 1,0 |
| 15A/15F* | 1 | 0,9 | 2(15A) | 0,9 | 0,5 |
| 16F | 1 | 0,4 | 0 | 0,0 | 1,0 |
| 18(18A/18B/18C/18F*) | 1 | 0,4 | 0 | 0,0 | 1,0 |
| 20 | 1 | 0,4 | 0 | 0,0 | 1,0 |
| 23B | 1 | 0,4 | 1 | 0,4 | 1,0 |
| 33F/33A/37* | 1 | 0,4 | 0 | 0,0 | 1,0 |
| 35B | 1 | 0,9 | 2 | 0,9 | 0,5 |
| 35F/47* | 1 | 0,4 | 1(35F) | 0,4 | 1,0 |
| 39 | 1 | 0,4 | 0 | 0,0 | 1,0 |
| 34 | 0 | 0,0 | 1 | 0,4 | 1,0 |
| Não-tipável | 6 | 2,7 | 14 | 6,2 | 0,4 |

* Os sorotipos separados por barra correspondem a um sorogrupo detectado pela PCR multiplex

Tabela 4. Variáveis associadas a múltiplos sorotipos de pneumococo em 224 isolados de nasofaringe de crianças e contatos das creches

| Variáveis | Múltiplos sorotipos ^a | | OR (95%CI) | Valor de P |
|---|----------------------------------|--------------|-------------------|------------|
| | Sim N=17 | Não N=207 | | |
| Idade - anos | 13 | 100 | 3,47 (1,10-11,02) | 0,022 |
| ≤5 | 4 | 107 | | |
| >5 | | | | |
| Sexo | | | 1,85 (0,66-5,19) | 0,232 |
| Masculino | 11 | 103 | | |
| Feminino | 6 | 104 | | |
| Crianças e contatos | | | 3,55 (1,03-13,37) | 0,020 |
| Efrata | 13 | 99 | | |
| Chiquinho | 4 | 108 | | |
| Uso de antibióticos nos últimos 3 meses | | | 1,20 (0,43-3,38) | 0,724 |
| Sim | 6 | 82 | | |
| Não | 11 | 125 | | |

^apela multiplex PCR

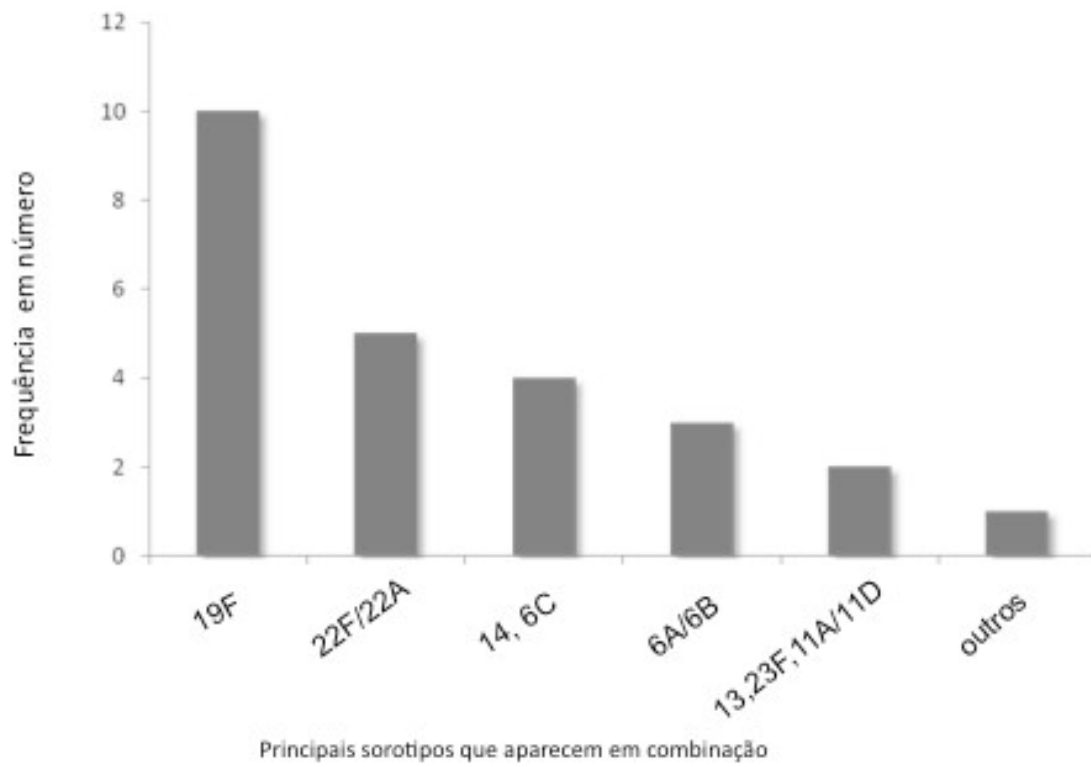


Figura 2. Frequência de sorotipos associados à co-colonização pela PCR multiplex

6. DISCUSSÃO

Este estudo ilustra a importância da vigilância da colonização de pneumococo em contactantes de paciente com DPI, além de demonstrar a utilidade da técnica PCR multiplex em investigações epidemiológicas sobre colonização por pneumococo. Sabe-se que portadores de pneumococo são, em geral, carreadores de um único sorotipo. No entanto, nos últimos anos, com o advento da PCR multiplex, a colonização simultânea por múltiplos sorotipos na infância vem ganhando importância (Melegaro et al 2007, Antonio et al 2009, Brugger et al 2009, Rivera-Olivero et al 2009, Brugger et al 2010).

Os resultados da nossa investigação mostraram que 7,5% das crianças das creches estavam colonizadas simultaneamente por mais de um sorotipo, principalmente pelos tipos 19F e 22F. Co-colonização por *S. pneumoniae* tem sido reportada em até 30%, principalmente em populações com altas taxas de portador (Graten et al 1989, Rivera-Olivero et al 2009). Acredita-se que a colonização por múltiplos sorotipos de pneumococo esteja relacionada à expressão de tipos capsulares não-vacinais, que apresentam baixa prevalência, e competem com sorotipos vacinais pela permanência na nasofaringe de portadores (Auranen et al 2010, Brugger et al 2010).

O uso da reação de Quellung subestimou a disseminação do tipo capsular 22F na creche Efrata em 71,4% ($7/2 = 3,5$ vezes). Uma possível explicação para isso é o fato de que o rendimento da reação de Quellung é diretamente dependente da cultura, e conseqüentemente do inóculo bacteriano (Huebner et al 2000, Hare et al 2008). Isso o torna um método laborioso e de menor sensibilidade.

Originalmente, a PCR multiplex convencional foi desenvolvida para detectar sorotipos invasivos de *S. pneumoniae* em amostras de líquidos estéreis (Pai et al 2006, Dias et al 2007, Morais et al 2007). Porém, nos últimos anos, a técnica também vem sendo aplicada para a sorotipagem de espécimes nasofaríngeas (Moreno et al 2005, Billal et al 2008, Antonio et al 2009, Brugger et al 2009, Carvalho et al 2010). Nesta investigação, os achados da PCR multiplex sugerem fortemente que a fonte de infecção do paciente

estava localizada em outra creche, frequentada pelo irmão do mesmo, viabilizando assim o vínculo epidemiológico entre o caso índice e a provável fonte de infecção.

Alguns autores têm pesquisado a fonte de aquisição de cepas de pneumococo em um mesmo cenário epidemiológico, especialmente em creches, verificando a similaridade entre isolados colonizadores de nasofaringe e doença pneumocócica invasiva. Nos EUA, a investigação de três casos de meningites por pneumococo multi-resistente em crianças que frequentavam uma creche resultou em medidas drásticas de contenção e controle da doença, como a antibioticoprofilaxia para os contactantes para diminuir a taxa de portador de *S. pneumoniae*. Na Noruega e Tailândia, também houve surtos de meningite pneumocócica em creches, fato que acionou ações de vigilância no intuito de detectar o relacionamento genético entre cepas de pneumococo de nasofaringe das crianças e seus contactantes (Craig et al 1999, Lauderdale et al 2005, Sogstad et al 2006).

Vale ressaltar que o caso de meningite pneumocócica ocorreu no mês de julho, inverno no Brasil. Alguns autores descreveram casos de meningite e outras infecções pneumocócicas durante as estações do inverno e no início da primavera (Leimkugel et al 2005, Antonio et al 2008). Acredita-se que a infecção por *S. pneumoniae* seja favorecida na sazonalidade, quando há maior circulação de vírus respiratórios como o vírus Influenza, o qual “pavimenta” o trato respiratório para o desenvolvimento de DPI (Yaro et al 2006, Chien et al 2009, Klugman et al 2009, Traore et al 2009).

Similarmente aos achados da literatura, os sorotipos 6A/6B, 14 e 19F, contemplados na vacina PCV, predominaram na nasofaringe das crianças das creches deste estudo. O sorotipo 6C, um dos últimos tipos capsulares descobertos (Park et al 2007a), foi o quarto mais isolado na nasofaringe. Recentemente descrito, alguns autores associam o sorotipo 6C à doença invasiva (Sá-Leão et al 2009, Vickers et al 2010).

Interessante observar que o caso de meningite pelo sorotipo 22F ocorreu na creche Chiquinho, mas nenhuma outra criança desta creche estava colonizada por este sorotipo. Os demais isolados 22F eram de crianças que frequentavam a creche Efrata, incluindo o

irmão da paciente, sugerindo a propagação do sorotipo 22F na mesma. O tipo capsular 22F foi o quinto em ordem de frequência. Ainda não se sabe qual a importância deste sorotipo como colonizador de nasofaringe, mas a tendência é de que haja um aumento da prevalência do mesmo, seguindo a teoria da “substituição” dos sorotipos não-vacinais, e em analogia ao aumento deste tipo capsular nos casos de meningite nos EUA. No Brasil, o pneumococo 22F tem sido raramente encontrado em crianças portadoras de creches (Laval et al 2006, Reis et al 2008).

Diversos estudos têm avaliado o impacto da vacinação infantil contra o *S. pneumoniae* nos EUA e Europa, nos últimos quatro anos da introdução da PCV7 (após 2004). Estas investigações mostram que tem ocorrido um aumento na incidência de DPI causada estritamente por sorotipos não-vacinais como o 19A e 22F. Este último tem sido descrito como importante causa de meningite pneumocócica, tanto em crianças quanto em adultos, nos EUA e alguns países da Europa (Jacobs et al 2008, Hsu et al 2009). Os resultados de testes moleculares têm mostrado que o aumento da prevalência do sorotipo não-vacinal 22F está relacionado com o surgimento do clone ST433. Curiosamente, este genótipo parece estar associado ao sorotipo 19A (Arduany et al 2009, Jacobs et al 2009, Hsu et al 2009).

Estudo recente realizado nos EUA mostrou que o tipo capsular 22F é o sexto mais associado a alto potencial de invasividade, dentre os mais de 90 sorotipos diferentes de pneumococo. Este cálculo considera a incidência de DPI e a prevalência de colonização do sorotipo a ser estudado (Yildirim et al 2010). No Brasil, o sorotipo 22F não consta entre os sorotipos invasivos prevalentes em crianças da faixa etária de 5-14 anos e mesmo nas demais faixas etárias (Brandileone et al 2003, OPAS 2008, Castañeda et al 2009). Apesar da escassez de estudos brasileiros sobre meningite pneumocócica, apenas uma investigação identificou o sorotipo 22F como causador da doença na infância (Vieira et al 2007).

Neste estudo, o sequenciamento genético da cepa 22F detectou um novo ST, ainda não descrito na base do MLST. Vale ressaltar que até a presente data, a base do MLST

registrou apenas uma cepa com o alelo *aroE171*, num total de 11.073 cepas depositadas. O sequenciamento das demais 8 cepas 22F, do irmão e contactantes do irmão, encontra-se em andamento e os resultados certamente contribuirão para esclarecer o vínculo epidemiológico e molecular entre a cepa do caso de meningite e as demais cepas, do irmão e contactantes do mesmo. No entanto, as evidências até o momento acumuladas com nossos achados sinalizam que o irmão de 2 anos e 4 meses de idade provavelmente adquiriu a cepa 22F na creche e transmitiu para a irmã de 10 anos. Isso nos remete a discussão sobre a faixa etária para a colonização e a transmissão intra-familiar do pneumococo.

Em estudo recente realizado na Finlândia, crianças, contactantes domiciliares e funcionários de três creches foram submetidos a coletas mensais de amostras de nasofaringe por um período de 9 meses. Os resultados mostraram “micro-epidemias” intra-familiares de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* colonizadores (Leino et al 2008).

Está bem estabelecida a relação inversamente proporcional entre risco de colonização e faixa etária (Aniansson et al 1992, Principi et al 1999, Syrjänen et al 2001, Hussain et al 2005). Respaldo-se nesta proposição, este estudo mostrou que as crianças que frequentavam a creche Efrata, com média de idade mais baixa que a creche Chiquinho, apresentavam maiores taxas de colonização por pneumococo. Nesse contexto, merece atenção a idade da paciente com meningite pneumocócica (10 anos). Atualmente, existe uma tendência em se estudar a incidência da DPI na faixa etária maior de 5 anos de idade, sobretudo para se avaliar uma possível imunidade de grupo conferida pela vacinação contra o pneumococo (O’Brien & Dagan 2003, Dias & Caniça 2007, Dinleyici & Yargic 2008). Com o uso da PCV7 na rotina de vacinação em menores de 2 anos, a incidência de DPI por cepas não-vacinais tem crescido em crianças maiores e em adultos, principalmente nos países desenvolvidos (Grijalva et al 2007, Hsu et al 2009, Pilishvili et al 2010).

Algumas limitações deste estudo devem ser mencionadas. O período de coleta de *swabs* nas creches estendeu-se por 5 meses, o que poderia interferir na interpretação epidemiológica do estudo. Assim, sorotipos considerados de colonização mais transitória poderiam não ter sido detectados. Um outro aspecto diz respeito a possibilidade de exposição a antibióticos no intervalo entre o início da investigação até a coleta do *swab*. No entanto, uma das vantagens da genotipagem pela PCR em comparação às metodologias tradicionais é a detecção do DNA da bactéria, que permite identificá-la mesmo que não esteja viável (cepa morta), após a exposição a antibióticos. Com isso, diminuem as chances de resultados falso negativos de portador (Saha et al 2008).

Em junho de 2010, o Brasil tornou-se o primeiro país a introduzir a vacina pneumocócica 10-valente (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) no calendário nacional de imunizações. A avaliação do impacto desta vacina em isolados invasivos e não invasivos deve-se respaldar em testes com alta acurácia. Esta investigação mostrou a importância da vigilância em contactantes de paciente com DPI, e o papel da PCR multiplex em estudos de impacto da vacinação nos sorotipos vacinais e não vacinais, uma vez que minimiza falsos resultados, positivos ou negativos, viabilizando a detecção de cepas co-colonizadoras com sorotipos potencialmente emergentes.

7. CONCLUSÕES

- Os procedimentos padrão para isolamento e sorotipagem do pneumococo na nasofaringe tendem a subestimar a prevalência de colonização, enquanto a RT-PCR e a PCR multiplex são métodos altamente sensíveis para detecção da colonização e co-colonização, respectivamente.
- As técnicas moleculares (PCR multiplex e MLST) permitiram evidenciar a similaridade entre a cepa da paciente com meningite e a cepa do irmão.
- Na era pós-vacinação, a PCR multiplex teria grande importância na vacinologia baseada em evidências, por adicionar informações sobre o impacto da vacinação anti-pneumocócica nas taxas de colonização, especialmente no que diz respeito à substituição de sorotipos vacinais.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Casos de meningite em creches são sempre preocupantes. A possibilidade de ocorrência de um “surto” nestas instituições sempre gera ansiedade tanto nos órgãos de saúde, quanto nos pais e diretores de creches. Quando o agente etiológico da meningite é o meningococo, as medidas preventivas estão bem estabelecidas, como por exemplo, a quimioprofilaxia. No entanto, quando se trata de meningite pneumocócica, a pergunta é: “o que fazer?” Atualmente, não existem ações políticas no sentido de controlar uma potencial transmissão da doença.

O caso de meningite pneumocócica deste estudo causou grande inquietação nos pais das crianças que frequentavam a creche da paciente com meningite. A diretora da creche “Projeto Chiquinho” contactou a equipe da SMS-GO para que ações de vigilância pudessem ser implementadas. Isso se traduziu em uma investigação epidemiológica realizada por pesquisadores do IPTSP em parceria com a SMS-GO, que incluiu crianças e contactantes da creche do paciente e da creche frequentada pelo irmão do caso índice para verificar a circulação do sorotipo identificado no líquido da paciente.

Confirmado o diagnóstico de meningite pneumocócica pelo sorotipo 22F, conseguimos tranquilizar os pais das crianças informando não haver risco iminente de surto. Diferentemente do meningococo, o pneumococo não costuma causar epidemias; além disso, a cepa isolada foi sensível a penicilina. A investigação mostrou que não havia circulação do sorotipo 22F na creche da paciente com meningite, e na ocasião das entrevistas com os pais, não identificamos nenhuma criança com fator de risco (comorbidades, imunodepressão, etc) que necessitasse receber a vacina anti-pneumocócica nos CRIES (Centros de Referência em Imunobiológicos Especiais). Desde o início do estudo até os dias atuais nenhum outro caso de meningite pneumocócica foi notificado nas duas creches. Fica então a contribuição desta parceria entre IPTSP e SMS, que proporcionou ações de vigilância epidemiológica bem sucedidas.

REFERÊNCIAS

Adegbola RA, Hill PC, Secka O, Ikumapayi UN, Lahai G, Greenwood BM, Corrah T. Serotype and antimicrobial susceptibility patterns of isolates of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in The Gambia 1996-2003. *Trop Med Int Health* 2006; 11(7):1128-1135.

[Aguiar SI](#), [Brito MJ](#), [Gonçalo-Marques J](#), [Melo-Cristino J](#), [Ramirez M](#). Serotypes 1, 7F and 19A became the leading causes of pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal after 7 years of heptavalent conjugate vaccine use. *Vaccine* 2010; 28(32):5167-5173.

Alexandre C, Dubos F, Courouble C, Pruvost I, Varon E; the Hospital Network for Evaluating the Management of Common Childhood Diseases, Martinot A. [Rebound in the incidence of pneumococcal meningitis in northern France: effect of serotype replacement.](#) *Acta Paediatr* 2010; 99(11):1686-1690.

Andrade ALSS, Oliveira R, Vieira MA, Minamisava R, Pessoa-Jr V, Brandileone MCC, Alfieri F, Pagliarini R, Presa J, Gray S, Markowitz J, Rodgers GL. Active epidemiologic surveillance of invasive pneumococcal disease (IPD) and chest radiograph (CXR) confirmed pneumonia (CXR+Pn) in children in Goiânia, Brazil. 2nd Vaccine Global Congress, December 7-9, 2008 Boston MA, USA.

Andrade AL, Oliveira RM, Vieira MA, Minamisava R, Pessoa-Jr V, Brandileone MC, Alves S, Alfieri F, Pagliarini R, Presa J, Gray S, Alexander R, Markowitz J, Isaacman D, Rodgers GL. Active surveillance of invasive pneumococcal disease (IPD) and chest radiograph-confirmed pneumonia (CXR+Pn) in infants and young children in Goiânia, Brazil. 7th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, March 14-18, 2010 Tel Aviv, Israel.

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

Aniansson G, Alm B, Andersson B, Larsson P, Nylén O, Peterson H, Rignér P, Svanborg M, Svanborg C. Nasopharyngeal colonization during the first year of life. *J Infect Dis* 1992; 165 Suppl 1:S38-42.

Antonio M, Hakeem I, Awine T, Secka O, Sankareh K, Nsekpong D, Lahai G, Akisanya A, Egere U, Enwere G, Zaman SM, Hill PC, Corrah T, Cutts F, Greenwood BM, Adegbola RA. Seasonality and outbreak of a predominant *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 clone from The Gambia: expansion of ST217 hypervirulent clonal complex in West Africa. *BMC Microbiol* 2008; 8:198.

[Antonio M](#), [Hakeem I](#), [Sankareh K](#), [Cheung YB](#), [Adegbola RA](#). Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. *J Med Microbiol* 2009; 58(3):296-302.

Ardanuy C, Rolo D, Fenoll A, Tarrago D, Calatayud L, Liñares J, Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(3):507-510.

Auranen K, Mehtälä J, Tanskanen AS, Kaltoft M. [Between-strain competition in acquisition and clearance of pneumococcal carriage--epidemiologic evidence from a longitudinal study of day-care children.](#) *Am J Epidemiol* 2010; 171(2):169-176.

Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, de Martino M, Resti M. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J Med Microbiol* 2008; 57(10):1205-1212.

Berezin EN, Cardenuto MD, Ferreira LL, Otsuka M, Guerra ML, Brandileone MC 2007. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(7):643-645.

Berezin EN, Falleiros-Carvalho LH, Lopes CR, Sanajotta AT, Brandileone MC, Menegatti S, Safadi MA, Guerra ML. Pneumococcal meningitis in children: clinical findings, most frequent serotypes and outcome. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78(1):19-23.

Berg S, Trollfors B, Persson E, Backhaus E, Larsson P, Ek E, Claesson BE, Jonsson L, Rådberg G, Johansson S, Ripa T, Kaltoft MS, Konradsen HB. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and cerebrospinal fluid related to vaccine serotypes and to clinical characteristics. *Scand J Infect Dis* 2006; 38(6-7):427-432.

Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Arai J, Katsurahara T, Moriyama S, Fujihara K, Yamanaka N. Determination of pneumococcal serotypes/genotypes in nasopharyngeal secretions of otitis media children by multiplex PCR. *Eur J Pediatr* 2008; 167(4):401-407.

Bingen E, Levy C, Varon E, de La Rocque F, Boucherat M, d'Athis P, Aujard Y, Cohen R; Bacterial Meningitis Study Group. Pneumococcal meningitis in the era of pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(3):191-199.

Black S. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease: a complicated story. *Clin Infect Dis* 2008; 47(4):485-486.

Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(3):144-154.

Bogaert D, Engelen MN, Timmers-Reker AJ, Elzenaar KP, Peerbooms PG, Coutinho RA, de Groot R, Hermans PW. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9):3316-3320.

[Brandileone MC](#), [de Andrade AL](#), [Di Fabio JL](#), [Guerra ML](#), [Austrian R](#). Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. [J Infect Dis](#) 2003; 187(8):1206-1212.

[Brito DA](#), [Ramirez M](#), [de Lencastre H](#). Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. [J Clin Microbiol](#) 2003; 41(6):2378-2384.

[Brueggemann AB](#), [Griffiths DT](#), [Meats E](#), [Peto T](#), [Crook DW](#), [Spratt BG](#). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. [J Infect Dis](#) 2003; 187(9):1424-1432.

Brugger SD, Frey P, Aebi S, Hinds J, Mühlemann K. Multiple colonization with *S. pneumoniae* before and after introduction of the seven-valent conjugated pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One* 2010; 5(7):e11638.

Brugger SD, Hathaway LJ, Mühlemann K. Detection of *S. pneumoniae* strain cocolonization in the nasopharynx. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6):1750-1756.

Camargos P, Fischer GB, Mocelin H, Dias C, Ruvinsky R. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. *Paediatric Respiratory Reviews* 2006; 7: 209–214.

Cardoso VC, Cervi MC, Cintra OA, Salathiel AS, Gomes AC. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82(1):51-57.

Carvalho MG, Pimenta FC, Jackson D, Roundtree A, Ahmad Y, Millar EV, O'Brien KL, Whitney CG, Cohen AL, Beall BW. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(5): 1611–1618.

Castañeda et al, The SIREVA II Project 2000-2005. Laboratory-Based Surveillance of *Streptococcus pneumoniae* Invasive Disease in Children in 10 Latin American Countries. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2009; 28(9): e265-270.

Centers for Diseases Control and Prevention. 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 Mortal Wkly Rep* 2005; 54:893-897.

Centers for Diseases Control and Prevention. Invasive pneumococcal in children 5 years after conjugate vaccine introduction – eight states, 1998-2005, among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57:144-148.

Centers for Diseases Control and Prevention. Pediatric bacterial meningitis surveillance - African region, 2002-2008. [MMWR Morb Mortal Wkly Rep](#) 2009a; 58(18):493-497.

Centers of Diseases Control and Prevention 2006. Disponível em <http://www.nfid.org/pneumococcal/>. Acesso em 28/08/2010.

Centers of Diseases Control and Prevention 2009. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-DNA-extraction-culture-May2009.pdf>. Acesso em 30/09/2010.

Centers of Diseases Control and Prevention 2010. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>. Acesso em 28/08/2010.

Ceyhan M, Yildirim I, Sheppard CL, George RC. Pneumococcal serotypes causing pediatric meningitis in Turkey: application of a new technology in the investigation of cases negative by conventional culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(3):289-293.

Chien YW, Klugman KP, Morens DM. Bacterial pathogens and death during the 1918 influenza pandemic. *N Engl J Med* 2009; 361(26):2582-2583.

Coles CL, [Kanungo R](#), [Rahmathullah L](#), [Thulasiraj RD](#), [Katz J](#), [Santosham M](#), [Tielsch JM](#). Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young South Indian infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(3):289-295.

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4):1553–1558.

Craig AS, Erwin PC, Schaffner W, Elliott JA, Moore WL, Ussery XT, Patterson L, Dake AD, Hannah SG, Butler JC. Carriage of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and impact of chemoprophylaxis during an outbreak of meningitis at a day care center. *Clin Infect Dis* 1999; 29(5):1257-1264.

Critchley IA, [Jacobs MR](#), [Brown SD](#), [Traczewski MM](#), [Tillotson GS](#), [Janjic N](#). Prevalence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among isolates from U.S. children in 2005-2006 and activity of faropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(7):2639-2643.

[Dagan R](#). Serotype replacement in perspective. *Vaccine* 2009; 27 Suppl 3:C22-24.

Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, Mendelman PM, Bohidar N, Yagupsky P. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174(6):1271–1278.

[de Andrade AL](#), [Pimenta FC](#), [Brandileone MC](#), [Laval CA](#), [Guerra ML](#), [de Andrade JG](#), [Di Fabio JL](#). Genetic relationship between *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal and cerebrospinal fluid of two infants with Pneumococcal Meningitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8):3970-3972.

Dias CA, Teixeira LM, Carvalho MG, Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol* 2007; 56(9):1185–1188.

Dias R, [Caniça M](#). Invasive pneumococcal disease in Portugal prior to and after the introduction of pneumococcal heptavalent conjugate vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51(1):35-42.

Di Fabio JL, [de Quadros C](#). Considerations for combination vaccine development and use in the developing world. *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 4:S340-345.

Dinleyici EC, [Yargic ZA](#). Pneumococcal conjugated vaccines: impact of PCV-7 and new achievements in the postvaccine era. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7(9):1367-1394.

Dunais B, Bruno P, Carsenti-Dellamonica H, Touboul P, Dellamonica P, Pradier C. Trends in nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among children attending daycare centers in southeastern France from 1999 to 2006. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27(11):1033-1035.

Dunais B, [Pradier C](#), [Carsenti H](#), [Sabah M](#), [Mancini G](#), [Fontas E](#), [Dellamonica P](#). Influence of child care on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(7):589-592.

Dunbar SA, Eason RA, Musher DM, Clarridge JE. Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6):1617-1620.

Edmond K, [Clark A](#), [Korczak VS](#), [Sanderson C](#), [Griffiths UK](#), [Rudan I](#). Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010; 10(5):317-328.

Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; 144(Pt 11):3049-60.

Espinosa-de Los Monteros LE, [Aguilar-Ituarte F](#), [Jiménez-Juárez RN](#), [Rodríguez-Suárez RS](#), [Gómez-Barreto D](#). *Streptococcus pneumoniae* serotype replacement in nasopharyngeal colonization in children vaccinated with PCV7 in Mexico. *Salud Publica Mex* 2010; 52(1):4-13.

Farrell DJ, Felmingham D, Shackcloth J, Williams L, Maher K, Hope R, Livermore DM, George RC, Brick G, Martin S, Reynolds R; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends and serotype distributions among *Streptococcus pneumoniae* from community-acquired respiratory tract infections and from bacteraemias in the UK and Ireland, 1999 to 2007. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62 Suppl 2:ii87-95.

Farrell DJ, Jenkins SG, Reinert RR. Global distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes isolated from paediatric patients during 1999-2000 and the in vitro efficacy of telithromycin and comparators. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt 11):1109-1117.

Fedson DS, Musher DM, Eskola J. Pneumococcal vaccine. In: Plotkin AS, Orestein WA. Vaccines 3rd ed. Philadelphia Saunders 1999, p.553-608.

Finland M, Barnes MW. Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J Clin Microbiol* 1977; 5(2):154-166.

Franco CM, [Andrade AL](#), [Andrade JG](#), [Almeida e Silva S](#), [Oliveira CR](#), [Pimenta FC](#), [Lamaro-Cardoso J](#), [Brandão AP](#), [Almeida SC](#), [Calix JJ](#), [Nahm MH](#), [de Cunto Brandileone MC](#). Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. [Pediatr Infect Dis J](#) 2010; 29(1):77-79.

Frazão N, [Brito-Avô A](#), [Simas C](#), et al. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. [Pediatr Infect Dis J](#) 2005; 24(3):243-252.

Gessner BD, Mueller JE, Yaro S. African meningitis belt pneumococcal disease epidemiology indicates a need for an effective serotype 1 containing vaccine, including for older children and adults. *BMC Infect Dis* 2010; 10(22):1-10.

Ghaffar F, Friedland IR, McCracken GH Jr. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18(7):638-646.

Gratten M, Montgomery J, Gerega G, Gratten H, Siwi H, Poli A, Koki G. Multiple colonization of the upper respiratory tract of Papua New Guinea children with *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1989; 20(4):501-9.

Grijalva CG, Nuorti JP, Arbogast PG, Martin SW, Edwards KM, Griffin MR. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* 2007; 369(9568):1179-1186.

Hare KM, Morris P, Smith-Vaughan H, Leach AJ. Random colony selection versus colony morphology for detection of multiple pneumococcal serotypes in nasopharyngeal swabs. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27(2):178-180.

Hathaway LJ, Stutzmann Meier P, Battig P, Aebi S, Muhlemann K. A homologue of aliB is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 2004; 186(12):3721-3729.

[Hausdorff WP](#). Invasive pneumococcal disease in children: geographic and temporal variations in incidence and serotype distribution. [Eur J Pediatr](#) 2002; 161 Suppl 2:S135-139.

[Hausdorff WP](#), [Bryant J](#), [Paradiso PR](#), [Siber GR](#). Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. [Clin Infect Dis](#) 2000; 30(1):100-121.

Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. [Lancet Infect Dis](#) 2005; 5(2):83-93.

[Hausdorff WP](#), [Siber G](#), [Paradiso PR](#). Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. [Lancet](#) 2001; 357(9260):950-952.

[Hennessy TW](#), [Singleton RJ](#), [Bulkow LR](#), [Bruden DL](#), [Hurlburt DA](#), [Parks D](#), [Moore M](#), [Parkinson AJ](#), [Schuchat A](#), [Butler JC](#). Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on invasive disease, antimicrobial resistance and colonization in Alaska Natives: progress towards elimination of a health disparity. [Vaccine](#) 2005; 23(48-49):5464- 5473.

Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. [J Clin Microbiol](#) 1995; 33(10):2759-2762.

Hill PC, Akisanya A, Sankareh K, Cheung YB, Saaka M, Lahai G, Greenwood BM, Adegbola RA. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. [Clin Infect Dis](#) 2006; 43(6):673-679.

Hill PC, Townend J, Antonio M, Akisanya B, Ebruke C, Lahai G, Greenwood BM, Adegbola RA. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in rural Gambian villages: a longitudinal study. [Clin Infect Dis](#) 2010; 50(11):1468-1476.

[Hortal M](#), [Algorta G](#), [Bianchi I](#), [Borthagaray G](#), [Cestau I](#), [Camou T](#), [Castro M](#), [de los Santos M](#), [Diez R](#), [Dell'Acqua L](#), [Galiana A](#), [Giordano A](#), [Giordano P](#), [Lopez-Ghemi G](#), [Milanese N](#), [Mogdasy C](#), [Palacio R](#), [Pedreira W](#), [Pisano A](#), [Pivel L](#). Capsular type distribution and susceptibility to antibiotics of *Streptococcus pneumoniae* clinical strains isolated from Uruguayan children with systemic infections. Pneumococcus Study Group. [Microb Drug Resist](#) 1997; 3(2):159-163.

[Hsu HE](#), [Shutt KA](#), [Moore MR](#), [Beall BW](#), [Bennett NM](#), [Craig AS](#), [Farley MM](#), [Jorgensen JH](#), [Lexau CA](#), [Petit S](#), [Reingold A](#), [Schaffner W](#), [Thomas A](#), [Whitney CG](#), [Harrison LH](#). Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. [N Engl J Med](#) 2009; 360(3):244-256.

[Hsu K](#), [Pelton S](#), [Karumuri S](#), [Heisey-Grove D](#), [Klein J](#). Population-based surveillance for childhood invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. [Pediatr Infect Dis J](#) 2005; 24(1):17-23.

[Hsu KK](#), [Shea KM](#), [Stevenson AE](#), [Pelton SI](#); [Massachusetts Department of Public Health](#). Changing serotypes causing childhood invasive pneumococcal disease: Massachusetts, 2001-2007. [Pediatr Infect Dis J](#) 2010; 29(4):289-293.

Huang SS, Hinrichsen VL, Stevenson AE, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Pelton SI, Lipsitch M, Hanage WP, Lee GM, Finkelstein JA. Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics* 2009; 124(1):e1-11.

Huang SS, Platt R, Rifas-Shiman SL, Pelton SI, Goldmann D, Finkelstein JA. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. *Pediatrics* 2005; 116(3): e408-413.

Huebner RE, Dagan R, Porath N, Wasas AD, Klugman KP. Lack of utility of serotyping multiple colonies for detection of simultaneous nasopharyngeal carriage of different pneumococcal serotypes. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(10):1017-1020.

Hussain M, Melegaro A, Pebody RG, George R, Edmunds WJ, Talukdar R, Martin SA, Efstratiou A, Miller E. A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. *Epidemiol Infect* 2005; 133(5):891-898.

Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. [Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines.](#) *Int J Infect Dis* 2010; 14(3):e197-209.

Jacobs MR, Bajaksouzian S, Bonomo RA, Good CE, Windau AR, Hujer AM, Massire C, Melton R, Blyn LB, Ecker DJ, Sampath R. Occurrence, distribution, and origins of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C, a recently recognized serotype. *J Clin Microbiol* 2009; 47(1):64-72.

Jacobs MR, Good CE, Bajaksouzian S, Windau AR. 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](#) 2008; 47(11):1388-1395.

Johnson HL, Deloria-Knoll M, Levine OS, Stoszek SK, Freimanis Hance L, Reithinger R, Muenz LR, O'Brien KL. Systematic Evaluation of Serotypes Causing Invasive Pneumococcal Disease among Children Under Five: The Pneumococcal Global Serotype Project. *PLoS Med* 2010; 7(10): e1000348.

Käyhty H, Auranen H, Nohynek H, Dagan R, Mäkelä H. Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. [Expert Review of Vaccines](#) 2006; 5(5): 651-667.

Klugman KP, Chien YW, Madhi SA. Pneumococcal pneumonia and influenza: a deadly combination. *Vaccine* 2009; 27 Suppl 3:C9-C14.

Laval CB, de Andrade AL, Pimenta FC, de Andrade JG, de Oliveira RM, Silva SA, de Lima EC, Fabio JL, Casagrande ST, Brandileone MC. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. [Clin Microbiol Infect](#) 2006; 12(1):50-55.

Lauderdale TL, Lee WY, Cheng MF, Huang IF, Lin YC, Hsieh KS, Huang IW, Chiou CC. High carriage rate of high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a

Taiwan kindergarten associated with a case of pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis* 2005; 5(95):1-8.

[Lawrence ER](#), [Arias CA](#), [Duke B](#), [Beste D](#), [Broughton K](#), [Efstratiou A](#), [George RC](#), [Hall LM](#). Evaluation of serotype prediction by *cpsA-cpsB* gene polymorphism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4):1319-1323.

Leach AJ, Morris PS, McCallum GB, Wilson CA, Stubbs L, Beissbarth J, Jacups S, Hare K, Smith-Vaughan HC. Emerging pneumococcal carriage serotypes in a high-risk population receiving universal 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent polysaccharide vaccine since 2001. *BMC Infect Dis* 2009; 9:121.

Leimkugel J, Adams Forgor A, Gagneux S, Pfluger V, Flierl C, Awine E, Naegeli M, Dangy JP, Smith T, Hodgson A, Pluschke G. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghanawith features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. *J Infect Dis* 2005; 192(2):192-199.

[Leino T](#), [Hoti F](#), [Syrjänen R](#), [Tanskanen A](#), [Auranen K](#). Clustering of serotypes in a longitudinal study of *Streptococcus pneumoniae* carriage in three day care centres. *BMC Infect Dis* 2008; 8:173.

Lipsitch M. What capsule contributes to the pneumococcus? In: 7th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Tel Aviv, Israel, March 14-18, 2010.

[Lloyd-Evans N](#), [O'Dempsey TJ](#), [Baldeh I](#), [Secka O](#), [Demba E](#), [Todd JE](#), [Mcardle TF](#), [Banya WS](#), [Greenwood BM](#). Nasopharyngeal carriage of pneumococci in Gambian children and in their families. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(10):866-871.

Lo WT, Wang CC, Yu CM, Chu ML. Rate of nasopharyngeal carriage, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* among children in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36(3):175-181.

Lucarevski BR, Baldacci ER, Bricks LF, Bertoli CJ, Teixeira LM, Mendes CM, Oplustil C. Oropharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by children attending day care centers in Taubate, SP: correlation between serotypes and the conjugated heptavalent pneumococcal vaccine. *J Pediatr (Rio J)* 2003; 79(3):215-220.

Malfroot A, Verhaegen J, Dubru JM, Van Kerschaver E, Leyman S. A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(9):797-803.

Mayoral C, Baroni MR, Giani R, Virgolini S, Ragueira M. Distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasoras em el Hospital de Niños de Santa Fe. *Rev Arg Microb* 2008; 40(1):13-16.

McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefevre JC, Tomasz A, Klugman KP. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the

pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2565-2571.

Melegaro A, Choi Y, Pebody R, Gay N. Pneumococcal carriage in United Kingdom families: estimating serotype-specific transmission parameters from longitudinal data. *Am J Epidemiol* 2007; 166(2):228-235.

Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49(4):249-254.

Messmer TO, Whitney CG, Fields BS. Use of polymerase chain reaction to identify pneumococcal infection associated with hemorrhage and shock in two previously healthy young children. *Clin Chem* 1997; 43(6 Pt 1):930-935.

Ministério da Saúde do Brasil 2010 (DATASUS). Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/meningite/bases/meninbrnet.def>. Acesso em 12/08/2010.

Millar EV, O'Brien KL, Zell ER, Bronsdon MA, Reid R, Santosham M. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Navajo and White Mountain Apache children before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(8):711-716.

Moore MR, Hyde TB, Hennessy TW, et al. Impact of a conjugate vaccine on community-wide carriage of nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Alaska. *J Infect Dis* 2004; 23(11):1015-1022.

Morais L, Carvalho MG, Roca A, Flannery B, Mandomando I, Soriano-Gabarro M, Sigauque B, Alonso P, Beall B. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *J Med Microbiol* 2007; 56(9):1181-1184.

Moreno J, Hernández E, Sanabria O, Castañeda E. Detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal samples by PCR-based multiplex assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12):6152-6154.

Mothibeli KM, du Plessis M, von Gottberg A, de Gouveia L, Adrian P, Madhi SA, Klugman KP. An Unusual Pneumococcal Sequence Type Is the Predominant Cause of Serotype 3 Invasive Disease in South Africa. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(1): 184-191.

Motlová J. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups among patients with invasive pneumococcal diseases in the Czech Republic in 1996-2003: background data for vaccination strategy. [Epidemiol Microbiol Imunol](#) 2005; 54(1):3-10.

Multi Locus Sequence Typing Databases 2010. Disponível em <http://www.mlst.net>. Acesso em 15/11/2010.

Musher DM. Pneumococcal vaccine--direct and indirect ("herd") effects. [N Engl J Med](#) 2006; 354(14):1522-1524.

Nigrovic LE, Kuppermann N, Malley R. Children with bacterial meningitis presenting to the emergency department during the pneumococcal conjugate vaccine era. *Acad Emerg Med* 2008; 15(6):522–528.

Njanpop Lafourcade BM, Sanou O, van der Linden M, Levina N, Karanfil M, Yaro S, Tamekloe TA, Mueller JE. Serotyping pneumococcal meningitis cases in the African meningitis belt by use of multiplex PCR with cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2):612-614.

O'Brien KL, [Dagan R](#). The potential indirect effect of conjugate pneumococcal vaccines. *Vaccine* 2003; 21(17-18):1815-1825.

O'Brien KL, Nohynek H. Report from a WHO working group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 2003a; 22: 133-140.

O'Brien KL, [Wolfson LJ](#), [Watt JP](#), [Henkle E](#), [Deloria-Knoll M](#), [McCall N](#), [Lee E](#), [Mulholland K](#), [Levine OS](#), [Cherian T](#). Burden of disease caused by *S. pneumoniae* in children younger than 5 yr: global estimates. *Lancet* 2009; 374(9693): 893-902.

Ochoa TJ, [Rupa R](#), [Guerra H](#), [Hernandez H](#), [Chaparro E](#), [Tamariz J](#), [Wanger A](#), [Mason EO Jr](#). Penicillin resistance and serotypes/serogroups of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children younger than 2 years in Lima, Peru. [Diagn Microbiol Infect Dis](#) 2005; 52(1):59-64.

Organização Pan-Americana de Saúde 2008. Informe Regional de SIREVA II, 2007. Disponível em [http://www.opas.org.br/ftp/Sireva 2007.zip](http://www.opas.org.br/ftp/Sireva%202007.zip). Acesso em 20/09/2010.

Pai RR, Gertz E, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44(1):124–131.

Park IH, Park S, Hollingshead SK, Nahm MH. Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. *Infect Immun* 2007; 75(9):4482-4489.

Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2007a; 45:1225-1233.

Parra E, Castañeda E, Moreno J. Identification of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* by polymerase chain reaction. *Biomedica* 2007; 27(3):454-460.

Pelton SI, [Huot H](#), [Finkelstein JA](#), [Bishop CJ](#), [Hsu KK](#), [Kellenberg J](#), [Huang SS](#), [Goldstein R](#), [Hanage WP](#). Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant Pneumococcus in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. [Pediatr Infect Dis J](#) 2007; 26(6):468-472.

Pichichero M, Casey JR. Emergence of a Multiresistant Serotype 19A Pneumococcal Strain Not Included in the 7-Valent Conjugate Vaccine as an Otopathogen in Children. *JAMA* 2007; 298(15):1772-1778.

Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney CG, Moore MR; Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis* 2010; 201(1):32-41.

Pilishvili T, Zell ER, Farley MM, Schaffner W, Lynfield R, Nyquist AC, Vazquez M, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Jackson D, Schuchat A, Whitney CG. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children in the era of conjugate vaccine use. *Pediatrics* 2010a; 126(1):e9-17.

Poehling KA, Talbot TR, Griffin MR, Craig AS, Whitney CG, Zell E, Lexau CA, Thomas AR, Harrison LH, Reingold AL, Hadler JL, Farley MM, Anderson BJ, Schaffner W. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 2006; 295(14):1668-1674.

Principi N, Marchisio P, Schito GC, Manneli S. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children; Ascanius Project Collaborative Group. *Ped Infect Dis Jour* 1999; 18(6):517-523.

Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine* 2010; 28(26): 4249-4259.

Reis JN, Cordeiro SM, Coppola SJ, Salgado K, Carvalho MGS, Teixeira LM, Thompson TA, Facklam RR, Reis MG, Ko AI. Population-Based Survey of Antimicrobial Susceptibility and Serotype Distribution of *Streptococcus pneumoniae* from Meningitis Patients in Salvador, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1): 275-277.

Reis JN, Palma T, Ribeiro GS, Pinheiro RM, Ribeiro CT, Cordeiro SM, da Silva Filho HP, Moschioni M, Thompson TA, Spratt B, Riley LW, Barocchi MA, Reis MG, Ko AI. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. *J Infect* 2008; 57(3):204-213.

Rivera-Olivero IA, Blommaert M, Bogaert D, Hermans PW, de Waard JH. Multiplex PCR reveals a high rate of nasopharyngeal pneumococcal 7-valent conjugate vaccine serotypes co-colonizing indigenous Warao children in Venezuela. *J Med Microbiol* 2009; 58(5):584-587.

Robinson DA, Edwards KM, Waites KB, Briles DE, Crain MJ, Hollingshead SK. Clones of *Streptococcus pneumoniae* isolated from nasopharyngeal carriage and invasive disease in young children in central Tennessee. *J Infect Dis* 2001; 183(10):1501-1507.

Rodrigues F, Nunes S, Sá-Leão R, Gonçalves G, Lemos L, de Lencastre H. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care

centers in the central region of Portugal, in the era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Microb Drug Resist* 2009;15(4):269-277.

Rubin LG, Rizvi A. PCR-based assays for detection of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3, 14, 19F and 23F in respiratory specimens. *J Med Microbiol* 2004; 53(7):595-602.

Russell FM, Carapetis JR, Tikoduadua L, Paeds D, Chandra R, Seduadua A, Satzke C, Pryor J, Buadromo E, Waqatakirewa L, Mulholland EK. Pneumococcal nasopharyngeal carriage and patterns of penicillin resistance in young children in Fiji. *Ann Trop Paediatr* 2006; 26(3):187-197.

Saha SK, Darmstadt GL, Baqui AH, Hossain B, Islam M, Foster D, Al-Emran H, Naheed A, Arifeen SE, Luby SP, Santosham M, Crook D. Identification of serotype in culture negative pneumococcal meningitis using sequential multiplex PCR: implication for surveillance and vaccine design. *PLoS One* 2008; 3:e3576.

Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Frazão N, Simões AS, Crisóstomo MI, Paulo AC, Saldanha J, Santos-Sanches I, de Lencastre H. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(11):1002-1007.

Sá-Leão R, Tomasz A, Sanches IS, Nunes S, Alves CR, Avô AB, Saldanha J, Kristinsson KG, de Lencastre H. Genetic antibiotic-resistance diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day-care centers as autonomus epidemiological units. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):4137-4144.

Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo 2010 (Centro de Vigilância Estadual). Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/meni_dados.html. Acesso em 12/08/2010.

Soewignjo S, Gessner BD, Sutanto A, Steinhoff M, Prijanto M, Nelson C, Widjaya A, Arjoso S. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage prevalence, serotype distribution, and resistance patterns among children on Lombok Island, Indonesia. *Clin Infect Dis* 2001; 32(7):1039-1043.

Sogstad MK, Aaberge IS, Sordal JO, Hoiby EA, Froholm LC, Alme AR, Caugant DA. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Norwegian children attending day-care centres. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(8):510-514.

Sorensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 1993; 31(8):2097-2100.

Syrjänen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, Herva EE, Takala AK. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. *J Infect Dis* 2001; 184(4):451-459.

[Syrogiannopoulos GA](#), [Katopodis GD](#), [Grivea IN](#), [Beratis NG](#). Antimicrobial use and serotype distribution of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered from Greek children younger than 2 years old. [Clin Infect Dis](#) 2002; 35(10): 1174-1182.

Tomasz A, Corso A, Severina EP, Echániz-Aviles G, Brandileone MC, Camou T, Castañeda E, Figueroa O, Rossi A, Di Fabio JL. Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: an overview. PAHO/Rockefeller University Workshop, Pan American Health Organization. Microb Drug Resist 1998; 4(3):195-207.

Traore Y, Tameklo TA, Njanpop-Lafourcade BM, Lourd M, Yaro S, Niamba D, Drabo A, Mueller JE, Koeck JL, Gessner BD. Incidence, seasonality, age distribution, and mortality of pneumococcal meningitis in Burkina Faso and Togo. [Clin Infect Dis](#) 2009; 48 (Suppl 2):S181-189.

[Valenzuela MT](#), [O'Loughlin R](#), [De La Hoz F](#), [Gomez E](#), [Constenla D](#), [Sinha A](#), [Valencia JE](#), [Flannery B](#), [De Quadros CA](#). The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. [Rev Panam Salud Publica](#) 2009; 25(3):270-279.

[van Gils EJ](#), [Veenhoven RH](#), [Hak E](#), [Rodenburg GD](#), [Bogaert D](#), [Ijzerman EP](#), [Bruin JP](#), [van Alphen L](#), [Sanders EA](#). Effect of reduced-dose schedules with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal pneumococcal carriage in children: a randomized controlled trial. [JAMA](#) 2009; 302(2): 159-167.

Vestrheim DF, Høiby EA, Aaberge IS, Caugant DA. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing children attending day-care centers in Norway. [J Clin Microbiol](#) 2008; 46(8):2508-2518.

[Vickers I](#), [Fitzgerald M](#), [Murchan S](#), [Cotter S](#), [O'Flanagan D](#), [Cafferkey M](#), [Humphreys H](#). Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in the Republic of Ireland. [Epidemiol Infect](#) 2010; 19:1-8.

Vieira AC, Gomes MC, Rolo Filho M, Eudes Filho J, Bello EJ, de Figueiredo RB. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. [J Pediatr \(Rio J\)](#) 2007; 83(1):71-78.

Wattal C, Oberoi JK, Pruthi PK, Gupta S, Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. [Indian J Pediatr](#) 2007; 74(10):905-907.

Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EAM, Ndiritu M, Klugman KP, Ruckinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. [Clin Infect Dis](#) 2010; 51(6):692-699.

Wolf B, Rey LC, Brisse S, Moreira LB, Milatovic D, Fleer A, Roord JJ, Verhoef J. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing

children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(5):757-765.

World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization, WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82:93-104.

[Yaro S](#), [Lourd M](#), [Traoré Y](#), [Njanpop-Lafourcade BM](#), [Sawadogo A](#), [Sangare L](#), [Hien A](#), [Ouedraogo MS](#), [Sanou O](#), [Parent du Châtelet I](#), [Koeck JL](#), [Gessner BD](#). Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. *Clin Infect Dis* 2006; 43(6):693-700.

Yildirim I, Hanage WP, Lipsitch M, Shea K, Stevenson A, Finkelstein J, Huang SS, Lee GM, Kleinman K, Pelton SI. Serotype specific invasive capacity and persistent reduction in invasive pneumococcal disease. *Vaccine* 2010; xxx-xxx, in press, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.10.032.

[Zemlickova H](#), [Jakubu V](#), [Urbaskova P](#), [Motlova J](#), [Musilek M](#), [Adamkova V](#). Serotype-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in Czech children. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 9):1079-1083.

ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do protocolo do estudo no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Materno Infantil de Goiânia

CARTA DE APROVAÇÃO

Protocolo N° 74/08

Titulo do Projeto: **Relacionamento genético entre cepas de pneumococos de nasofaringe de crianças de duas creches de Goiânia e cepa isolada em liquor com meningite pneumocócica". Versão 2.**

Investigador(a) Responsável: **Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade**

Prezada Senhora,

Ao cumprimentar-lhe informo que o **Comitê em Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil CEP-HMI**, analisou e aprovou, o Projeto de pesquisa em epígrafe, em sua Versão 2 de 22-10-2008, uma vez que o mesmo atende aos princípios éticos vigentes.

Informo, ainda, que a presente aprovação tem validade pelo período de tempo definido no projeto e caso hajam alterações no cronograma, ainda que alheias a vontade do pesquisador, estas deverão ser informadas a esse Comitê para fins de análise e deliberação.

Por oportuno, permito-me lembrar-lhe da necessidade de V.Sa. ter que elaborar e encaminhar à esse Comitê relatórios semestrais relativos ao andamento, encerramento, conclusão e publicação da pesquisa.

Atenciosamente,


Dr. MARCO AURÉLIO ALBERNAZ

Coordenador do CEP-HMI

Missão:

Promover a saúde da mulher e da criança por meio das ações sócio-educativas e assistência médico-hospitalar, no contexto da saúde pública do Estado de Goiás e contribuir para o desenvolvimento científico através do ensino e pesquisa.

Visão:

Ser referência em serviços especializados nas áreas da saúde da mulher e da criança, com enfoque na humanização da assistência integral aos seus clientes.

Anexo 2: Questionário da criança

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

FICHA DA CRIANÇA

| | Etiqueta |
|--|------------------------|
| 01. Data da entrevista: __ / __ / 08 | |
| 02. Nome da Criança: _____ | NOMECR () |
| 03. Sexo Masc (1) Fem (2) | SEXO () |
| 04. Data de Nascimento: ____/____/____ | DN () |
| 05. Nome da Mãe: _____ | NOMEM () |
| 06. Nome do Pai: _____ | MONEP () |
| 07. Telefones para contato: _____ | FONES () |
| 08. Há quanto tempo a criança freqüenta esta creche? ____ dias ____ meses 8)NA | TC () |
| 09. Período que freqüenta a creche: (1) matutino (2) vespertino | PERI () |
| 10. Já freqüentou outra creche? (1) Não (2) Sim (8) NA Se NÃO , passe para a pergunta 13 . | OUTCR () |
| 11. Nome da creche _____ | OUTCRN () |
| 12. Quando e por quanto tempo? Há ____meses. Por ____meses (8) NA | OUTCRQ () |
| 13. A criança esteve internada: Se NÃO , passe para a pergunta 15 . (1) Não internou nos últimos 6 meses (2) Nos últimos 3 meses (3) Nos últimos 6 meses (9) NS/NR | OUTCRT () |
| 14. A criança recebeu antibiótico na última internação? (1) Não (2) Sim (8) NA (9) NS/NR | ANTIBI () |
| 15. A criança tomou antibiótico há quantos dias atrás? (NÃO CONSIDERAR O ANTIBIÓTICO DA INTERNAÇÃO) (1) Não tomou (2) 1-7 (3) 7-30 (4) 31-60 (5) 61-90 (6) 91 ou mais (9)NS/NR | ANTIBD () |
| 16. Indique o número de doses registradas no cartão de vacinação: Prevenar (anti-pneumocócica) _____doses (99) NS/NR Pneumo 23 _____doses (99) NS/NR | PREV () PNEU23 () |
| 17. Quantas pessoas moram na casa (incluindo a criança): _____ | QPMC () |
| 18. Algum contactante domiciliar fuma? (1) Não (2) Sim (9) NS/NR | ACFUMA () |
| Entrevistador (a): _____ | |

Anexo 3: Questionário do contactante

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

FICHA DE CONTACTANTE

| | | Etiqueta |
|--|--|------------------------|
| 01. Data da entrevista: __ / __ / 08 | | DATEV () |
| 02. Nome da criança-fonte: _____ | | NOMECR () |
| 03. NID da criança-fonte: _____ | | NIDCR () |
| 04. Nome do contactante: _____ | | NCONT () |
| 05. Grau de parentesco: (1) pai (2) mãe (3) irmão (4) avó (5) outro | | PARENT () |
| 06. Data de nascimento: __ / __ / __ | | DNASC () |
| 07. Ocupação: (1) profissional da saúde (2) outro | | OCUP () |
| 08. Que Instituição frequênta? (1) creche (2) escola (3) unidade de saúde (4) outro (9) NA | | INST () |
| 09. Nome da Instituição: _____ | | NINST () |
| 10. Esteve internado nos últimos 3 meses?: (1) sim (2) não | | INTER3 () |
| 11. Tomou antibiótico há quanto tempo (em dias): (1) não tomou (2) 1-7 (3) 8-30 (4) 31-60 (5) 61-90 (6) 91 ou mais (9) NS | | ANTIB () |
| 12. Número de doses de vacina anti-pneumocócica no cartão de vacinação: Prevenar _____ doses (99) NS Pneumo 23 _____ doses (99) NS | | PREV () PNEU23 () |
| 13. Nível de escolaridade: Não sabe ler nem escrever (0) Completo Incompleto 1º grau (1) (2) 2º grau (3) (4) Superior (5) (6) (9) NR/NS | | NESC () |
| Entrevistador (a): | | |

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](#)