



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae* SOROTIPOS
1 e 5 ISOLADOS DE DOENÇA INVASIVA EM MOÇAMBIQUE**

LUÍS DA CONSEIÇÃO MARTINS DE MORAIS

Salvador – Bahia - Brasil
2012

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae* SOROTIPOS
1 e 5 ISOLADOS DE DOENÇA INVASIVA EM MOÇAMBIQUE**

LUÍS DA CONSEIÇÃO MARTINS DE MORAIS

Orientador: Prof. Mitermayer Galvão dos Reis

Co-orientadores: Prof^a Joice Neves Reis Pedreira

Prof. Betuel Lázaro Sigauque

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia - Brasil
2012

DEDICATÓRIA

Á minha avó e familiares que incentivaram
e apoiaram durante esta jornada

AGRADECIMENTOS

À Deus

À Deus pai por colocar pessoas especiais no meu caminho, as quais contribuíram para meu crescimento como Homem e profissional, e por ter iluminado o meu caminho para que pôdesse terminar mais uma etapa na minha vida, a ti, toda honra, glória e louvor seja dada.

Ao Prof. Dr. Mitermayer G. Dos Reis (Orientador)

Pela confiança, e por ter-me aceito como seu estudante, para mim foi muito orgulho tê-lo como orientador. Obrigado por ter assumido toda parte da cooperação internacional exigida para minha estadia aqui, bem como pela forma sábia e contribuições que deu na realização deste trabalho, pessoais e institucionais. Tenho como exemplo sua competência e perseverança com as quais faz ciência.

À Prof^a. Dr^a. Joice Neves Reis Pedreira (Co-orientadora)

Como teria sido possível a realização deste trabalho, se eu não a tivesse conhecido? Obrigado pela sua dedicação, atenção e empenho no decorrer deste trabalho e por sempre ter incentivado e investido com sabedoria no meu crescimento científico. Este projeto foi possível porque um profissional determinado, sábio e capaz esteve por perto. Também agradeço sua amizade, e carinho, foste igual a uma mãe, Minha grande admiração!!!

Ao Prof. Dr. Betuel Sigauque (Co-orientador)

Estou muito grato por sempre acreditar no meu potencial, e pela confiança transmitida, obrigado pela supervisão, orientação, atenção, acima de tudo pelos incentivos e apoios tão importantes para execução final deste trabalho, o meu muito obrigado.

Aos responsáveis das instituições onde os trabalhos foram realizados

Pela disponibilidade dos meios (infra-estruturas, equipamentos, reagentes, materiais e outros) utilizados no decurso deste trabalho, tanto em Moçambique como no Brasil, respectivamente Prof. Dr. Eusebio V. Macete (CISM) e Prof. Dr. Mitermayer G. Reis (LPBM-FIOCRUZ-BA), meus agradecimentos. Extensivo agradecimento ao Prof. Dr. Pedro L. Alonso (presidente do conselho de administração da Fundação Manhiça/CISM), pela contribuição que tem dado ao centro em todos os domínios.

Às agências de fomento: CAPES, para realização deste trabalho e o CNPq pela bolsa de estudo concedida (processo nº 190101/10-7), obrigado pela disponibilidade financeira concedida, que importantes foram para realizar o meu mestrado.

Outras agências colaboradoras

Fundação Manhiça,

CISM (onde tiveram parte os trabalhos iniciais deste projeto),

Agência Espanhola de Cooperação Internacional (AECI), pelo apoio que dá ao CISM e permite que quer o trabalho de laboratório assim como de outras áreas tenha lugar,

União Europeia através dos projetos: NoE, TESA

Ao Governo Brasileiro através do programa de cooperação do CNPq com o Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique.

Aos participantes do estudo

Aos pais e encarregados de educação das crianças que assinaram o termo de consentimento informado, e aceitaram participar deste estudo, vossa colaboração foi importante, *Khanimanbo**.

À minha família, colegas e amigos

À minha avó (minha mãe de criação)

Sou grato à Deus por ter você na minha vida, pelos ensinamentos e experiência tão importantes que me tens passado sobre a vida, você estará sempre presente em cada conquista minha. Direta ou indiretamente tu és responsável por cada conquista da minha vida. Amo-te muito, meu eterno agradecimento.

Aos meus pais

João de Moraes Júnior e Maria da Conceição A. Martins, por todo incentivo, esforço e amor para que eu estivesse conquistando mais um importante passo em minha vida. Muito obrigado!

Aos meus irmãos

Lara Moraes, Nilza Moraes e Valdmiro Moraes, pela força, apoio moral. Muito obrigado vocês são especiais.

Ao meu tio

Atílio Moraes, pela confiança, força, apoio e incentivo durante a minha formação desde a graduação até hoje, transmitindo-me muita coragem e falando-me com sabedoria e experiência a importância dos estudos. Estou grato por tudo e obrigado por acreditar em mim.

Aos colegas do Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM)

Laboratório: Meus agradecimentos a todos os colegas do Laboratório no geral e em especial os do laboratório de microbiologia, que receberam, processaram as amostras, garantindo que as crianças tivessem apoio necessário das suas mãos. Especial agradecimento aos técnicos Samira Siraje, Mariano Sitaúbe, Esperança Lázaro, e Crisóstomo Messias, extensiva gratidão ao Prof. Dr. Inácio Mandomando (chefe do Laboratório) pelos ensinamentos, incentivos e amizade, tu és um exemplo a seguir.

Clínica: Aos colegas (médicos, enfermeiros, técnicos e agentes de medicina) que carinhosamente atenderam as crianças, coletaram as amostras, realizaram o consentimento informado, preencheram os questionários e cuidaram delas durante o período de internamento, muito obrigado pela vossa contribuição.

E os demais departamento do CISM (Centro de dados, Demografia, Administração, Formação e comunicação, Ciências sociais e antropologia), e a todos colegas que de forma directa e indirecta foram indispensáveis para realização deste trabalho, obrigado pela vossa colaboração. Expresso meu agradecimento a Eng^a. Teresa Machai (responsável do departamento de formação e comunicação), pela atenção prestada durante a minha estadia fora de Moçambique e por toda colaboração.

Aos colegas do projeto de Meninigte (PLBM)

Prof^a. Dr^a. Leila Campos, Prof^a. Dr^a. Soraia Machado, Ana Paula Menezes, Milena Soares, Jailton Júnior, Vivian Galvão, Diego Rios, Sheila Vilasboas, Michele dos Santos, Mariela Leite, Mizael Santos, Eder Silva, Lorena Galvão, Eliane Escobar, Maíra Silva, sinto-me privilegiado em fazer parte deste grupo. Agradeço a vocês por estarem sempre do meu lado em todos momentos, com vocês aprendi o verdadeiro significado da palavra grupo, trabalho e amizade. Obrigado pelos momentos partilhados.

Às amigas

Rayssa Carvalho que esteve sempre presentes nos momentos mais felizes e que também me apoiou nos momentos mais difíceis, minha eterna gratidão, você é especial.

Lana Santana, por estar sempre do meu lado, atenção, carinho e amizade, muito obrigado

Elisangela Santos, pela amizade, apoio e moral em todos momentos, muito grato por tudo.

Ao casal Jailton (Jailton e Norma) filhos, noras e netos (Ana Vitoria, Peter, Patrick, Pamela, Kelly, Lucas e Vitor)

Grato pela hospitalidade e pelo acolhimento durante estes anos, vocês foram minha família fora do meu país. Obrigado por me fazer sentir em “casa” Meus sinceros agradecimentos.

Aos professores do curso de Biotecnologia CPqGM-FIOCRUZ/BA

Que se disponibilizaram a lecionaram as matérias, as quais foram muito importantes para aumento dos nossos conhecimentos científicos, muito obrigado.

Aos professores da banca (de qualificação e da defesa final)

Meus agradecimentos por terem aceitado fazer parte da banca da minha defesa de mestrado, seguramente vossas contribuições serão importantes para melhoria final deste trabalho.

À plataforma de Sequenciamento

Agradeço a Dr^a. Daniele Takahashi e Silvana Paz, pelo apoio concedido na parte de sequenciamento, no decorrer deste trabalho, muito obrigado

Aos colegas da Pós-graduação

Agradeço aos colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração, amizade e pelo convívio durante estes anos. Extensivo agradecimento à Taíse Caires por todo apoio no processo documentação para aquisição e legalização do visto, e pela comunicação com os diversos órgão, estou muito grato.

Aos meus colegas e amigos do LPBM

Elder Damasceno, Lúcio Barbosa, Wendell Vilasboas, Bruno Cerqueira, Fernanda Albuquerque, Fernanda Fraga, Gisele Lopes, Theomira Carmo, Cleiton Santos, Cintya Cajado, pela ajuda, a atenção dispensada, e os demais que não foram aqui por mim mencionados, meus sinceros agradecimentos. Extensivo agradecimento ao Cleiton Guimarães (administrativo) que cuidou de todo processo burocrático e por todo apoio administrativo concedido sempre que precisei. Meus agradecimentos.

Aos meus amigos fora do âmbito acadêmico

Brazão Catopola, Kleverton Silva, Katrine Cavalcanti, pela amizade, companheirismo e diversões nos momentos de lazer. Ao José Machado, Nelia Manaca, Zilk Peixoto (peixinho), José Missasse (um grande amigo), ainda que distante vocês sempre fizeram parte desta caminhada e juntos partilhamos momentos alegres na vida extra acadêmica. Muito obrigado pela vossa amizade.

*Obrigado falado em língua ronga/*tchangani* (dialeto falado entre os nativos da zona sul de Moçambique).

**“.....Pode haver um *mister* para artes da bola,
mas o único treinador para a vida, somos nós mesmo...”**

Mia Couto

MORAIS, Luís. Epidemiologia molecular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipos 1 e 5 isolados de doença invasiva em Moçambique. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é a principal causa de morbi-mortalidade no mundo. Em Moçambique, os sorotipos 1 e 5 são os mais prevalentes. Este estudo investigou a relação clonal de isolados de pneumococo obtidos de doença invasiva entre o período de 2002-2007, utilizando três procedimentos laboratoriais: Box-PCR, PFGE e MLST. Um total de 105 isolados (sendo 72 do sorotipo 1 e 33 do sorotipo 5), foram submetidos a técnica de Box-PCR. O sorotipo 5 apresentou cinco padrões, sendo um clonal com 20 isolados e quatro padrões não clonais. O padrão A foi o predominante com 61% dos isolados, enquanto que por PFGE, 100% dos isolados foram agrupados em um único clone (clone A), e pela técnica de MLST foi identificado apenas um único ST (ST 289). Por outro lado, o sorotipo 1 apresentou maior diversidade clonal pelos três métodos; por Box-PCR os isolados foram agrupados em 3 clones, sendo predominante o padrão B com 58 isolados, padrão C e N com dois isolados cada. Um total de 12 isolados foram não clonais. O clone B apresentou 20 sub-tipos, sendo o mais frequente o sub-tipo B1 com 20 amostras idênticas, seguido por B2, B6, B7 com 5 amostras idênticas cada. Por PFGE, 19 amostras confirmaram ser do mesmo perfil clonal (clone B), enquanto que 12 amostras demonstraram ser não clonais. Quando submetidos ao MLST, foram identificados 6 STs; ST 217 (7 isolados), ST 853 (1 isolado), e quatro novos STs, ST 4125, ST 2909, ST 3779 e ST 4166. O ST 217 pertence ao clone Suécia¹-27 (ST217), identificados previamente em surtos de meningite na África, enquanto o ST 289 foi identificado como um representante do clone Colômbia⁵-19 (ST289) que circulam na América Latina desde 1994. A taxa de não susceptibilidade à penicilina foi de 3%, e à cotrimoxazole foi de 39%. A maior taxa de resistência foi encontrada entre os isolados de sorotipo 1. Este trabalho mostra a persistência de dois sorotipos responsáveis por causar doença pneumocócica invasiva graves, bem como seus respectivos clones em uma região do sul de Moçambique.

Palavras-chave: *S. pneumoniae*, sorotipos, ST , surtos.

MORAIS, Luís. Epidemiologia molecular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipos 1 e 5 isolados de doença invasiva em Moçambique. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is the leading cause of morbidity and mortality worldwide. In Mozambique, serotypes 1 and 5 are the most prevalent. This study investigated the clonal relationship of isolates obtained from pneumococcal invasive disease during the period of 2002-2007 using three laboratory procedures: Box-PCR, PFGE and MLST. A total of 105 isolates (72 serotype 1 and 33 serotype 5) were submitted to Box-PCR technique. The serotype 5 showed five patterns, one clonal with 20 isolates and four non-clonal patterns. The pattern A, covered 61% of all isolates, whereas by PFGE, 100% of the isolates have been grouped into a single clone (clone A), and by MLST was also identified only one ST (ST 289). In another hand, serotype 1 had higher clonal diversity by the three methods; by Box-PCR isolates have been grouped into three clonal patterns, the pattern B being predominantly (58 isolates), C and N with two isolates each. A total of 12 strains were non-clonal. Clone B showed 20 sub-types, the most common subtype B1 with 20 identical samples, followed by B2, B6, B7 with 5 identical samples each. By PFGE, 19 samples confirmed with the same profile clone (clone B), while 12 samples were non-clonal. By MLST, 6 STs were identified, ST 217 (7 isolates), ST 853 (one isolate) and four new STs, ST 4125, ST 2909, ST 3779 and ST 4166. ST 217 belongs to Sweden¹-27 clone (ST217), previously identified in outbreaks of meningitis in Africa, while the ST 289 has been identified as a representative clone Colômbia⁵-19 clone (ST289) that circulate in Latin America since 1994. The rate of non susceptibility to penicilin was 3%, and 39% to cotrimoxazol. The highest resistance rate was found among serotype 1 isolates. This results shows the persistence of two serotypes responsible for cases of severe invasive pneumococcal disease, as well as their respective clones in a region of southern Mozambique.

Keywords: *S. pneumoniae*, serotypes, ST, outbreak.

LISTA DE FIGURAS

Nº	Título	Pag.
1	Taxa de incidência de <i>S. pneumoniae</i> (por 100.000 crianças < 5 anos)	17
2	Aspecto microscópico de <i>S. pneumoniae</i> corado pelo método de Gram	18
3	<i>S. Pneumoniae</i> (cepas capsuladas e não capsuladas)	22
4	Fatores de virulência de <i>S. Pneumoniae</i>	23
5	Distribuição global do clone Spain ^{23F}-1 de pneumococo.	34
6	Mapa de África e localização de Moçambique	40
7	Mapa da província de Maputo e de localização do Distrito da Manhiça	44
8	Tese de optoquina em cultura de <i>S. Pneumoniae</i>	51
9	Teste de bile solubilidade	51
10	Placa de antibiograma de <i>S. pneumoniae</i> (método de disco difusão)	53
11	Placa de antibiograma de <i>S. pneumonaie</i> (método de E-Teste)	53
12	Fluxograma do estudo	61
13	Dendrograma dos padrões clonais dos isolados do sorotipo 5 por (Box-PCR, PFGE e MLST)	67
14	Dendrograma dos padrões clonais dos isolados do sorotipo 1 por (Box-PCR, PFGE e MLST)	69

LISTA DE TABELAS

Nº	Título	Pag.
1	Estimativa da cobertura vacinal por VPCs entre crianças menores de 5 anos de idade, por faixa etária, país e tipo de amostra	38
2	Ampliação da área de estudo por ano, área e população abrangida	46
3	Crítérios para interpretação dos padrões de PFGE	57

4	Designação dos genes utilizados para o sequenciamento	59
5	Características clínicas e epidemiológicas das crianças com DPI internadas no Hospital Distrital de Manhica entre Janeiro de 2002 a Dezembro de 2007	63
6	Características clínicas e epidemiológicas das crianças com DPI por sorotipo 1 e 5 genotipados e não genotipados, internadas no Hospital Distrital de Manhica entre Janeiro de 2002 a Dezembro de 2007	65
7	Distribuição do perfil alélico e ST dos sorotipos 1 e 5 identificados por MLST	70

LISTA DE GRÁFICOS

Nº	Título	Pag.
1	Distribuição de sorotipos de <i>S. pneumoniae</i> isolados de DPI no período de 2002 a 2007	62
2	Perfil de sensibilidade antimicrobiana de amostras de <i>S. pneumoniae</i> sorotipos 1 e 5 pelo método de disco difusão em agar	66

LISTA DE ANEXOS

Nº	Título
I	Inquérito de coleta de dados no OPD
II	Inquérito de coleta de dados no INPD
III	Aprovação do Comitê de Bioética

LISTA DA QUADROS

	Título	Pag.
Quadro 1	Grupo de risco para infecções invasivas causadas pelo <i>S. Pneumoniae</i>	28
Quadro 2	Taxas de incidência e mortalidade por DP nos países Africanos	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
	2.1 Descoberta do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
	2.2 Aspectos biológico	22
	2.3 Fatores de Virulência	23
	2.4 Distribuição global dos sorotipos capsulares	24
	2.5 Vacinas pneumocócicas	24
	2.6 Epidemiologia	27
	2.7 Formas clínicas da doença pneumocócica	28
	2.8 Diagnóstico Laboratorial	29
	2.9 Tratamento e Resistência aos fármacos	30
	2.10 Caracterização clonal de pneumococos	32
	2.11 Doença pneumocócica no contexto africano	35
3	DESCRIÇÃO DO PAÍS	40
	3.1 Política e Divisão Administrativa	40
	3.2 Características sócio-demográficas de Moçambique	41
	3.3 Clima	41
	3.5 Saúde	41
4	JUSTIFICATIVA	42
5	PERGUNTA DE INVESTIGAÇÃO	42
6	OBJETIVO	43
7	METODOLOGIA	44
	7.1 Descrição da área de estudo (Distrito da Manhiça)	44
	7.2 Sistema de Vigilância demográfica	45
	7.3 Hospital distrital de Manhiça e Vigilância de Morbilidade	46
	7.4 Infra-estruturas Laboratoriais	46

7.5 Vigilância Hospitalar e coleta de amostras	47
7.6 Aspectos éticos	48
7.7 Critérios de inclusão e exclusão	48
7.8 Gestão de dados	49
7.9 Diagnóstico Laboratorial (Microbiológico)	50
7.10 Identificação de pneumococo	50
7.11 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	52
7.12 Sorotipagem	53
7.13 Tipagem Molecular – (Genotipagem)	53
7.13.1 BOX-PCR	54
7.13.2 PFGE	55
7.13.3 ANÁLISE GENÉTICA (MLST)	57
7.14 Análise estatísticas	59
8 RESULTADOS	61
8.1 Distribuição anual dos sorotipos de pneumococos isolados de DPI	61
8.2 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com DPI	63
8.3 Perfil de susceptibilidade dos sorotipos 1 e 5 isolados de DPI	66
8.4 Análise do perfil clonal do sorotipo 5	67
8.4.1 BOX-PCR	67
8.4.2 PFGE	68
8.5 Análise do perfil clonal do sorotipo 1	68
8.5.1 BOX-PCR	68
8.5.2 PFGE	70
8.6 Análise do perfil clonal por MLST	70
9 DISCUSSÃO	71
10 CONCLUSÃO	78

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS/SIGLAS

3'	Região carboxi-terminal do ácido nucléico
5'	Região amino-terminal do ácido nucléico
CISM	Centro de Investigação em Saúde de Manhiça
DP	Doença Pneumocócica
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAVI	GAVI: Global alliance for vaccine and immunization (Aliança Global para imunização)
HIV	Human Immunodeficiency virus (Vírus de imunodeficiência Humana)
PCR	Polimerase Chain reaction (reação da polimerase em cadeia)
PFGE	Pulsed field Gel Eletroforese (Eletroforese de Campo Pulsátil)
PNEM	Pneumococcal Net work Epidemiology
PCV	Vacina Pneumocócica Conjugada
PPP	Vacina Pneumocócica Polissacarídica
WHO	Organização Mundial de saúde

1. INTRODUÇÃO

A doença pneumocócica (DP) é a principal causa de morbi-mortalidade em crianças no mundo, acometendo também indivíduos idosos e imunossuprimidos de todas as idades. O agente etiológico, o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo ou *S. pneumoniae*) é transmitido de pessoa para pessoa através de gotículas respiratórias (via aerosol). Esta bactéria geralmente coloniza o trato respiratório superior podendo invadir posteriormente outros órgãos e causar várias infecções como otite média, sinusite, artrite, infecções dos ossos e das partes moles, e infecções mais graves tais como, pneumonia e doença pneumocócica invasiva (DPI) como: Sépsis, bacteremia e meningite (Oosterhuis-Kafeja *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2007; WHO, 2008).

Calcula-se que no mundo morrem por ano aproximadamente 1.5 milhões de crianças menores de cinco anos de idade como consequência de infecção por *S. pneumoniae*. Cerca de 90% dessas mortes acontecem nos países em desenvolvimento da África e Ásia, sendo a África-Subsahariana a região com maior número de mortes (O'Brien *et al.*, 2009; WHO, 2009) (Figura1).

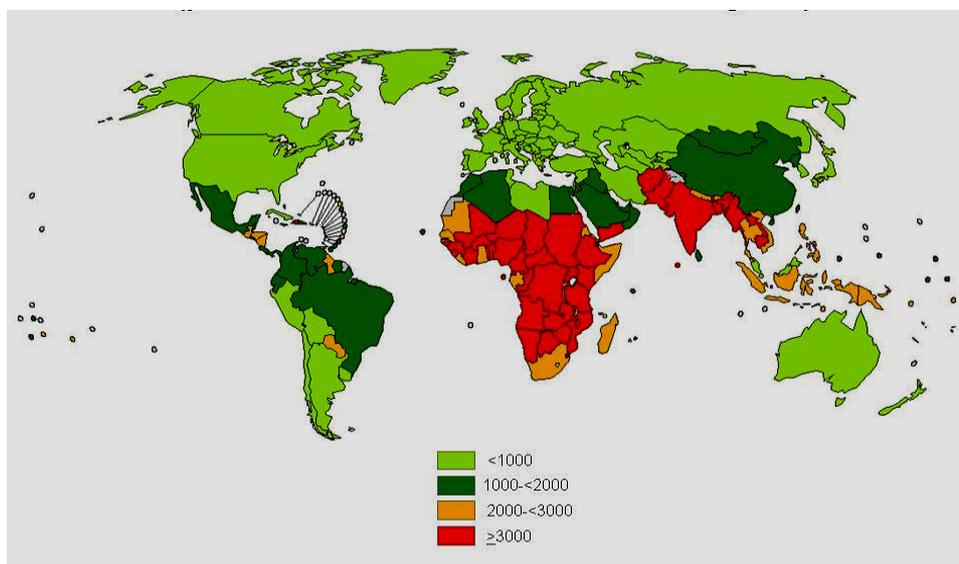


Figura 1. Taxa de incidência de *S. pneumoniae* (por 100.000 crianças < 5 anos)

Fonte: WHO, 2009

A DP é um problema de saúde pública no mundo. Embora existam vacinas, esta doença continua sendo uma das principais causas de morte, no que diz respeito a doenças imunologicamente preveníveis, em crianças menores de 5 anos. A resistência do pneumococo à penicilina, e outros antimicrobianos está descrita em vários países (Tomasz, 1997), o que torna a imunização uma alternativa viável para o controle da DP (Klugman, 2004; Obaro 2009).

O pneumococo é uma bactéria Gram-positiva, apresenta-se em forma de cocos lanceolados, comumente agrupados aos pares, também chamado de diplococos (Figura 2). Esta bactéria possui uma cápsula polissacarídica na sua parede celular, a qual lhe confere uma maior virulência e escape do sistema imunológico do hospedeiro. Em virtude dessas características a cápsula é utilizada na formulação de vacinas contra DP (Connie & George, 2007; Hausdorff *et al.*, 2000a).

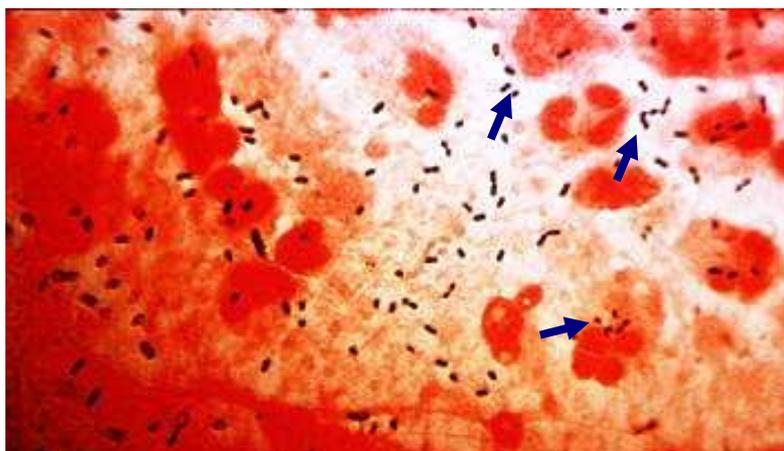


Figura 2. Aspecto microscópico de *S. pneumoniae* corado pelo método de Gram.

Fonte:<http://medic.med.utah.tmc.edu/path/00001452.htm>

As diferenças na constituição e composição da cápsula polissacarídica permitem distinguir a bactéria em vários sorotipos. Atualmente estão descritos 93 sorotipos, sendo os sorotipos 11E, 6C e 6D descritos recentemente por Calix *et al.*, 2010; Bratcher *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2007 respectivamente, porém só alguns sorotipos (15-20%) são virulentos com capacidade de causar doença pneumocócica grave.

A distribuição dos sorotipos varia segundo a localização geográfica, população, sazonalidade, apresentação clínica e idade. Por exemplo, no Sudeste do Brasil (em Uberlândia) os sorotipos frequentemente identificados em DPI são 14, 5, 1, 6B, 18C, 19A, 3, 9V, 19F, 23F, 9N (Mantese *et al.*, 2009), enquanto que no nordeste (em Salvador da Bahia) predominam os sorotipos 14, 3, 23F, 19F, 6B, 18C, 6A entre isolados de pneumococo causadores de meningite (Menezes *et al.*, 2011).

Um estudo realizado em dois países africanos (Burkina Faso e Togo) mostrou que os casos de meningite por pneumococos aconteciam entre os meses de Janeiro a Março, sendo os picos da doença no mês de Fevereiro, onde os sorotipos mais predominantes eram 1, 2, 5 e 6A (Traore *et al.*, 2009). Na Alemanha, Imohl *et al.*, 2010, descreveram que os sorotipos 14, 1, 6B, 19F, 23F e 7F foram mais frequentes em crianças, enquanto que nos adultos os sorotipos mais encontrados foram 14, 3, 7F, 1, 4 e 23F.

Globalmente, os sorotipos 1 e 5 são mais frequentes nos países em desenvolvimento, enquanto outros sorotipos (6B, 14, 19F, 23F) são causas comuns de DPI também nos países desenvolvidos. Essa característica pode estar relacionada ao fato de que esses sorotipos estão frequentemente associados a resistência aos antimicrobianos (Hausdorff *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 1996).

Vacinas pneumocócicas conjugadas (PCV) licenciadas contra DP possuem 7, 10 e 13 sorotipos, conforme a seguinte composição: PCV-heptavalente (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), licenciada no ano 2000 constituída principalmente por sorotipos mais prevalentes nos Estados Unidos da América, a PCV-decavalente composta pelos sorotipos da heptavalente mais os sorotipos 1, 5, 7F (PCV-decavalente = PCV-heptavalente + 1, 5, 7F) e a PCV-tridecavalente composto pelos sorotipos da VPC-decavalente mais sorotipos 3, 6A, 19A (PCV-13decavalente = PCV-decavalente + 3, 6A, 19A). Na África os sorotipos 1 e 5 são os mais prevalentes (Scott *et al.*, 1998; Valles *et al.*, 2006) em alguns países africanos (Burkina Faso e Gana) foram descritos surtos de meningite associado a este sorotipo (Leimkugel *et al.*, 2005; Yaro *et al.*, 2006). Em outras partes do mundo, a exemplo do Canadá, foram descritos surtos de

meningite causado pelo sorotipo 5 (Romney *et al.*, 2008; Vanderkooi *et al.*, 2011). Este sorotipo também foi descrito num estudo de colonização nasofaríngea na Gâmbia (Hill *et al.*, 2010).

Durante várias décadas os cientistas dedicaram maior atenção ao estudo da cápsula polissacarídica, dada sua importância na virulência e imunogenicidade. Com a descrição do fenômeno de troca capsular (Coffey *et al.*, 1998) abriram-se novos desafios no estudo dos pneumococos. A troca capsular é um processo que acontece como resultado da transferência ocasional de DNA entre bactérias durante a replicação, ocorrendo a transferência de genes capsulares de uma bactéria para outra, com consequente alteração de características genéticas, levando a que um determinado fenótipo (sorotipo) apresente diferentes clones (Genótipos) (Brueggemann *et al.*, 2003; Enright & Spratt 1998). Com este fato cientistas têm-se confrontado com as seguintes questões: 1. Será o sorotipo (cápsula) ou o genótipo responsável pela habilidade de pneumococo causar DPI? 2. Se a cápsula constitui um fator importante para virulência da bactéria, então isolados bacterianos com distintos clones, porém expressando o mesmo tipo capsular, possuem capacidades similares de causar DPI? (Brueggemann *et al.*, 2003). Uma vez que a troca capsular leva a alterações nas características fenotípicas e genotípicas e assim influenciam no comportamento da bactéria em relação a sua patogenia, o estudo genético (clones) se torna importante. Todavia, o maior problema se deve ao fato de que as ferramentas existentes para determinar a caracterização genotípica da bactéria são escassas. As técnicas atualmente utilizadas apresentam desvantagens como: baixa reprodutibilidade intra e inter-laboratorial e são inadequadas para quantificar a relação genética entre os isolados; porém a maior limitação centra-se na dificuldade de comparar os resultados produzidos em laboratórios de diferentes regiões do mundo (Maiden *et al.*, 1998). Várias técnicas, incluindo eletroforese de campo pulsátil (PFGE), BOX-PCR e recentemente o Multilocus Sequence Typing (MLST), têm sido usados para determinar a relação genotípica entre isolados de *S. pneumoniae* (McGee *et al.*, 2001; Obert *et al.*, 2007; Tenover *et al.*, 1995), entretanto as mesmas só tem validade se aplicadas em conjunto.

Em Moçambique a incidência da DP é alta, sendo que para a DPI é de 416 episódios por 100.000 crianças menores de cinco anos de idade (Roca *et al.*, 2006) e para pneumonia confirmada radiologicamente é de 19 episódios por 1000 crianças menores de 24 meses de idade (Roca *et al.*, 2010). Um estudo sobre sorotipos demonstrou que os sorotipos 1 e 5 são os mais prevalentes e contribuem com cerca de 50% do total de sorotipos invasivos (Valles *et al.*, 2006). Entretanto, dados sobre o perfil genético desses sorotipos não são conhecidos.

Neste trabalho, usamos as seguintes técnicas moleculares: BOX-PCR, PFGE e MLST, para descrever o perfil clonal dos sorotipos 1 e 5 isolados em DPI, durante 6 anos (2002 – 2007) de vigilância de infecções bacteriana invasivas em crianças no distrito da Manhiça, sul de Moçambique, antes da introdução da PCV nos programas rotineiros de vacinação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descoberta do *Streptococcus pneumoniae*

Uma revisão sobre esta bactéria, abordando aspectos históricos da sua descoberta, foi realizada por Austrian em 1960 e 1999, segundo ele,

Esta bactéria foi descoberta por dois pesquisadores praticamente na mesma época, George Miller Sternberg em Setembro de 1880 nos Estados Unidos da América e Louis Pasteur em Dezembro do mesmo ano na França, através do isolamento do microorganismo em ratos inoculados com saliva humana, inicialmente foi denominada de "*Micrococcus Pasteuri Sternberg*", em homenagem ao seus descobridores. Pouco tempo depois, Friedlander fez o primeiro reconhecimento em pulmões seccionados e corados pela técnica de Gram que certamente eram "*Streptococcus*". Daí passou a chamar-se de *Streptococcus pneumoniae*, "*Streptococcus*" por apresentar pelo método do Gram a mesma estrutura dos estreptococos e "*pneumoniae*" por ser considerado agente etiológico da pneumonia. Mais tarde foi observado que o pneumococo era capaz de causar meningite, endocardite, artrite e otite média. Experimentalmente foi reproduzida a endocardite pneumocócica em coelhos.

2.2 Aspectos biológicos

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria pertencente ao Reino Monera; Filo Firmicutes; Classe Bacilli; Ordem Lactobacillales; Família Streptococcaceae; Gênero *Streptococcus*; Espécie *Streptococcus pneumoniae*. Como todos os estreptococos, os pneumococo são cocos (bactéria de forma arredondada), medem cerca de 1 µm de diâmetro, são anaeróbios facultativos, as cepas patogénicas possuem cápsula no seu revestimento (Figura 3). Esta bactéria produz pneumolisina ou α -hemolisina, enzima que degrada parcialmente a hemoglobina, com conseqüente formação de um halo verde em redor das colónias de pneumococos em placas de agar sangue (Winn *et al.*, 2006).

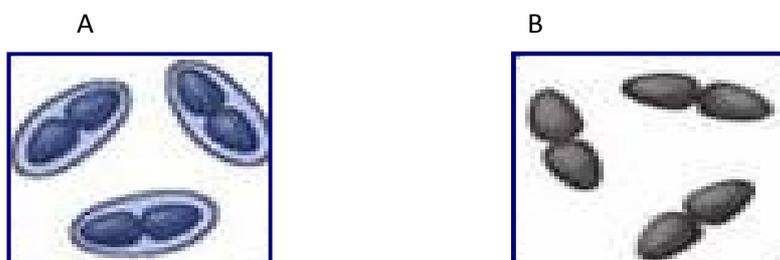


Figura 3: *S. Pneumoniae* (cepas capsuladas e não capsuladas)
A: Bactéria encapsulada; **B:** Bactéria não encapsulada

Fonte: Coffey *et al.*, 1998.

2.3 Fatores de Virulência

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do pneumococo, conferindo a este maior potencial invasivo e de escape do sistema imunológico do hospedeiro. Esta apresenta diversificações no tamanho, composição e propriedade antifagocitárias (Hausdorff *et al.*, 2000; Wasfy *et al.*, 2005). Além da cápsula outros fatores de virulência incluem parede celular, as colinas ligadoras de proteínas (CBPs), proteínas da superfície do pneumococo A e C (PspA e PspC), neuraminidase ancoradas à proteínas (LPXTG), hialuronidase (Hyl), enolase (Eno), pneumolisina, autolisina A (Lyt A), as proteínas transportadoras de metais (Psa A), proteínas aquisitoras de ferro A (Pia A) e proteínas exportadoras de ferro (Piu A), figura 4A (Kadioglu *et al.*, 2008; Tuomanen, 1999). Recentemente Barocchi *e col.* 2006, descreveram o pili, figura 4B. O Pili é um apêndice flexível e filiforme localizado na superfície das bactérias, participa dos processos de aderência além de estimular a resposta inflamatória do hospedeiro, esta estrutura tem sido apontada como uma candidata para produção de futuras vacinas contra a DP (Gianfaldoni *et al.*, 2007; Tai, 2006; Barochi *et al.*, 2006).

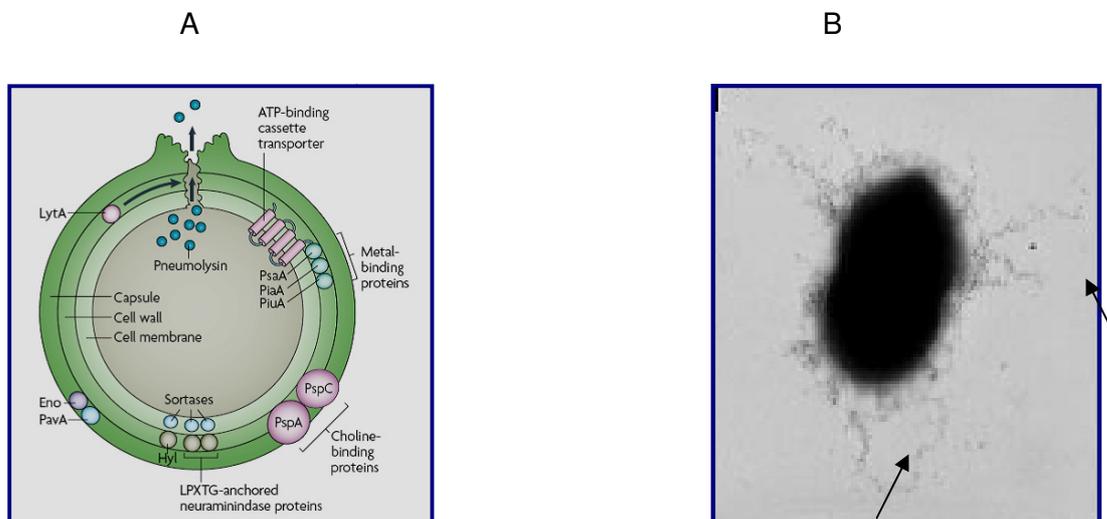


Figura 4: Fatores de virulência de *S. pneumoniae*

A: Esquema representativo de diferentes fatores de virulência de *S. pneumoniae*. A cápsula polissacarídica; a parede celular; as colinas ligadoras de proteínas; as proteínas de superfície A e C (PspA e PspC); a neuraminidase (LPXTG); a proteína de adesão e virulência (PavA); enolase (Eno); a pneumolisina; a autolisina A (LytA); as proteínas ligadoras de metal [antígenos de superfície A (PSaA), PiaA, PiuA)]. Fonte: Kadioglu *et al.*, 2008

2.4 Distribuição Global dos sorotipos capsulares

O estudo realizado por Johnson *et al.*, 2010, com cepas de várias regiões do mundo (África, Ásia, Oceania, América do Norte, América Latina e Caribe), revelou que dos 21 diferentes sorotipos identificados, sete (1, 5, 6A, 6B, 14, 19F e 23F) foram globalmente os mais frequentes. O sorotipo 14 foi o mais comum, seguido pelo sorotipo 6B em todas as regiões. O sorotipo 5 foi o terceiro mais comum na África, América Latina e Caribe. O sorotipo 19A frequentemente associado a resistência a antimicrobiano foi mais prevalente na Europa (6%) do que em outras regiões.

Esse trabalho demonstrou ainda que, 26% de 25.493 isolados foram identificados em amostras de crianças com idade inferior a 2 anos, sendo o sorotipo 14 comum para todas as idades. Em relação a carga da doença, os sete sorotipos mais comuns causaram aproximadamente 9 milhões de casos e 500.000 mortes em crianças <5 anos de idade. Nas áreas com alta incidência de DP (África, Ásia, Oceania, América Latina e Caribe) pelos 3 sorotipos mais prevalentes, excedeu a incidência total da DP na América do Norte e Europa. Os sorotipos 23F e 19F contribuíram com cerca de 9% a 18% dos casos de DPI, enquanto que os sorotipos 1, 5 e 14, contribuíram para cerca de 28% a 43% de DPI em todas as regiões. O sorotipo 18C foi mais comum em países com alta renda (Europa, América do Norte e Oceania).

2.5 Vacinas pneumocócicas

A tentativa de controle da infecção pneumocócica por meio de vacinação iniciou em 1911, passando por três fases durante oito décadas subsequentes. Inicialmente as vacinas preparadas com bactérias mortas foram usadas em casos de epidemia e administrada a aproximadamente 1 milhão de pessoas, porém os benefícios da mesma foram discutíveis. A descoberta de que adultos imunizados com pequenas quantidades de polissacáridos capsulares purificados produziam anticorpos para os homólogos tipos capsulares, levou ao desenvolvimento de vacinas tetravalentes capazes de garantir proteção contra

infecção por aqueles sorotipos presentes nela. Com o descobrimento da penicilina e outros antimicrobianos efetivos contra a infecção pneumocócica, o interesse no controle da doença pela profilaxia diminuiu (AUSTRIAN, 1999).

Porém com o surgimento de cepas de pneumococos resistentes à antibióticos, levando ao insucesso no tratamento das infecções pneumocócicas, ou pela exacerbação da resposta inflamatória, causada pela lise celular, contribuíram para a elevada morbi-mortalidade dessa doença. Esse fato apontou para a necessidade da prevenção da DP através da vacinação. Gradualmente foram sendo introduzidas vacinas contendo antígenos polissacarídicos dos sorotipos 6, 14 e 23 (Cherry *et al.*, 2004). Atualmente, existem dois diferentes tipos de vacinas comercializadas para prevenir a enfermidade: vacinas pneumocócicas polissacarídicas e vacinas pneumocócicas conjugadas.

a) Vacinas pneumocócicas polissacarídicas (PPV): A vacina pneumocócica polissacarídica icositriavalente (PPV-icositriavalente), contém 23 sorotipos de pneumococo respectivamente: sorotipo 14, 3, 6, 19F, 23F, 18C, 4, 10A, 19A, 9N, 8, 11A, 9V, 17F, 5, 12F, 15B, 20, 1, 22F, 7F, 2 e 33F. Está indicada para adultos e crianças que tenham fator de risco específico para DP, tal como: crianças maiores de 2 anos, idosos com idade superior a 65 anos, pacientes com anemia falciforme, esplenectomia, doença crônica pulmonar ou renal, imunossupressão congênita ou adquirida, transplante de órgãos, terapia prolongada com imunossupressores. Esta vacina é classificada como vacina timo-independente (T-II), uma vez que é capazes de ativar as células B sem cooperação com as células T, porém a resposta imunológica gerada por este tipo de vacina é muito baixa e não estimula anticorpos de memória. Por essa razão, essa vacina é menos efetiva na prevenção da DP em crianças menores de 2 anos, uma vez que essas ainda não tem as células B madura. (Hausdorff *et al.*, 2000; Oosterhuis-Kafeja *et al.*, 2007).

b) Vacina pneumocócica conjugada (PCV): nesta vacina, a cápsula polissacarídica de pneumococo foi conjugada com toxóides tetânicos, toxóide diftérico CRM197 (tóxina mutante não tóxica) A toxina tetânica e o toxóide diftérico, mostram melhores resultados quando conjugados com a cápsula polissacarídica. Uma vez que, para cada sorotipo necessita-se de uma grande

quantidade de conjugado a fim de estimular uma resposta imune-específica, e devido a diversidade de sorotipos, apenas um número limitado destes podem ser incluídos numa vacina (Briles *et al.*, 1997).

No ano de 2000 foi licenciada e comercializada, nos Estados Unidos da América, a primeira vacina pneumocócica polissacarídica conjugada (Prevar[®] Wyeth) contendo os 7 sorotipos mais prevalentes neste país (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F). A PCV-heptavalente é conjugada à proteína CRM 197. Essa vacina pode ser utilizada a partir de dois meses de idade, uma vez que estimula uma resposta imunológica T – dependente, com produção de anticorpos e indução de memória imunológica (Hausdorff *et al.*, 2005). Um outro aspecto positivo da vacinação por PCV-heptavalente foi a presença de “imunidade por rebanho” (Black *et al.*, 2004;Whitney *et al.*, 2003).

Após a introdução desta vacina naquele país, houve uma redução dos casos meningite por sorotipos vacinais, de 0.61 casos/100.000 habitantes entre 1998-1999, para 0.05 casos/100.000 habitantes em 2006-2007, porém a incidência de meningite por sorotipos não vacinais aumentou de 0.48 casos/100.000 habitantes em 1998-1999 para 0.77 casos/100.000 em 2006-2007 (Thipeng *et al.*, 2011). O sorotipo 19A foi o mais frequente de entre sorotipos não vacinais como principal causa de DPI. Esta vacina foi também menos efetiva contra otite média para o sorotipo 19F, em relação aos outros sorotipos (Pai *et al.*, 2005). Um outro fenômeno observado além da substituição de sorotipos, foi a troca capsular entre sorotipo vacinal 4 e o não vacinal 19A (Brueggemann *et al.*, 2007).

Embora a PCV-heptavalente não contenha os sorotipos 1 e 5, que são a principal causa de DPI em quase toda parte do mundo, principalmente na África, esta vacina está sendo gradualmente introduzida nos países africanos através do financiamento da *Global alliance for vaccine and immunization* (GAVI). Dado a sua importância como causa de DPI, os sorotipos 1 e 5, foram recentemente incluídos na novas PCV, a PCV-decavalente e PCV-tridecavalente (Ruvisky *et al.*, 2010). Todavia, ainda existe grande preocupação com o surgimento de DPI causada por sorotipos não inclusos nas vacinas

atualmente comercializadas, bem como a evidência da troca capsular, fato que ameaça a eficácia destas (Hanage *et al.*, 2010; Pelton *et al.*, 2007).

2.6 Epidemiologia

S. pneumoniae é o principal patógeno causador de otite, sinusite, bronquite, pneumonia adquirida na comunidade, bem como causa predominante de meningite e bacteremia. A incidência da DPI e a distribuição dos sorotipos divergem segundo as regiões geográficas, sazonalidade, apresentação clínica e idade. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2005, este patógeno foi responsável por cerca de 1.6 milhões de mortes em crianças menores de cinco anos de idade, dentre essas, a maior parte das mortes foram em crianças menores de dois anos de idade (WHO, 2007). Um estudo sobre pneumonia clínica em crianças menores que cinco anos de idade revelou que 95% dos episódios da doença acontecem nos países em desenvolvimento (Rudan *et al.*, 2004). Para além da idade infantil, constituem outros fatores de risco para a DP a idade avançada (idosos maiores de 65 anos), imunossupressão e demais (Quadro 1).

Os países em desenvolvimento na África e Ásia apresentam maior taxa de DP e de mortalidade, sendo até 10 vezes mais alta que a dos países desenvolvidos (Europa e Estados Unidos da América), onde a incidência anual da pneumonia é de cerca de 34-40 casos/1000 em crianças menores de 5 anos (Jokinen *et al.*, 1993; McConnochie *et al.*, 1988). No Canadá a incidência era 82 casos/100.000 habitantes em 2001 antes da introdução da PCV-heptavalente (Kellner *et al.*, 2005).

No continente africano, a incidência da DPI pode variar entre 24,2 a 554 casos por 100.000/crianças/ano, sendo mais elevada em crianças menores de um ano, variando de 45,3 a 554 casos, enquanto em crianças menores de cinco anos a incidência é de 240 por 100.000/crianças/ano, dependendo de cada país e período em que os estudos foram realizados (Campbell *et al.*, 2004; Eskola *et al.*, 1992; O'Dempsey *et al.*, 1996; Usen *et al.*, 1998).

Quadro 1 – Grupo de risco para infecções invasivas causadas pelo *S. pneumoniae*.

Grupo de risco para infecções pneumocócicas
<ul style="list-style-type: none">• Crianças menores de 5 anos de idade; • Adultos maiores de 65 anos de idade;• Indivíduos com resposta imunológica comprometida por: doenças congênitas, ou adquiridas (pacientes com HIV) e/ou por tratamento com imunossupressores; • Portadores de anemia hemolítica e falciforme;• Pacientes com doença crônica (diabetes, cirrose, doença cardiorespiratória, nefropatias e outras); • Indivíduos com fratura craniana e fístula liquórica; • Indivíduos que vivem em aglomerados e em contato com crianças; • Tabagistas; • Pessoas que tiveram infecções respiratórias por outros patógenos virais.

Fonte: Bricks & Berezin 2006.

Cerca de 18.000 crianças menores de seis anos de idade morrem anualmente de doença pneumocócica invasiva na América Latina e Ilhas do Caribe. O programa de vigilância de pneumococo (SIREVA-Vigia projeto) coordenado por Pan-American Health Organization (PAHO) na América Latina, demonstrou alta prevalência de sorotipo 5 (10%) sendo de 14,1% e 15% na Argentina e Uruguai respectivamente, 12% no Chile, 8% na Colômbia e 7% no Brasil (Ruvinsky *et al.*, 2010). A apresentação clínica mais frequente e fatal é a forma invasiva da doença, principalmente a meningite, sépsis e bacteremia, onde na África ceifam muitas vidas. Surtos causados por *S. pneumoniae* (sorotipos 1 e ou 5), já foram descritos na África e no Canadá (Leimkugel *et al.*, 2006; Vanderkooi *et al.*, 2011).

2.7 Formas clínicas da doença pneumocócica

S. pneumoniae é responsável por uma variedade de manifestações clínicas, desde infecções simples do trato respiratório superior, até formas graves que ameaçam a vida tais como a pneumonia grave, bacteriemia, sépsis e meningite. A doença pneumocócica comumente se apresenta em 2 formas: a forma não invasiva (otite média, sinusite, conjuntivite, bronquite e pneumonia) e a forma invasiva (pneumonia grave, sépsis, bacteremia e meningite) sendo esta a forma mais grave da doença.

A DPI apresenta diferentes formas clínicas: **Pneumonia** que se caracteriza pela presença de alterações radiológicas, como por exemplo derrame pleural, infiltrado alveolar, dentre outros achados, o que indica a presença de bactéria (ou vírus) nos pulmões. Sintomas como febre, tosse, dificuldade e ou aumento da frequência respiratória também estão presentes; **Bacteremia** na qual observa-se a presença da bactéria viva na corrente sanguínea, podendo ser sintomática ou assintomática, quando esta é sintomática, se classifica como **sépsis**; No sistema nervoso central (SNC), o pneumococo pode causar **meningite** (inflamação das membranas que revestem o a medula espinhal e o cérebro) e ou meningoencefalite. (Ayieko *et al.*, 2007).

2.8 Diagnóstico Laboratorial

A detecção rápida e viável do pneumococo é fundamental com vista a fornecer o tratamento adequado da doença. O diagnóstico laboratorial consiste na identificação da bactéria, ou do DNA ou do antígeno nas amostras de sangue, no líquido cefalorraquidiano (LCR) ou em outro fluido corporal, podendo essa identificação ser feita de três formas diferentes: sorológicas, molecular e através de cultura em meios sólidos.

a) Sorológica (reação antígeno *versus* anti-soro): Consiste em detectar antígenos de pneumococo nos diferentes fluidos corporais, utilizando partículas de latex

revestidas de anticorpos específicos (Connie & George, 2000; Murray *et al.*, 2007).

b) Molecular: Consiste na extração e amplificação do DNA da bactéria em amostras de LCR, soro ou plasma, utilizando técnicas de biologia molecular, ex: PCR em tempo Real (Corless *et al.*, 2001; Sidikou *et al.*, 2003).

c) Cultura em meios sólidos: Caracteriza-se pelo isolamento e identificação da bactéria através da cultura de fluidos corporais em meios de cultura. Embora tenha baixa sensibilidade e requeira muitos recursos materiais, equipamento e pessoal treinado, a cultura continua sendo a melhor técnica para a rotina clínica quando comparada à outras técnicas de detecção, porque pode fornecer dados sobre susceptibilidade antimicrobiana (Corless *et al.*, 2001).

Os pneumococos, crescem bem em meios ricos (agar com 5% de sangue de carneiro), sob condições especiais de temperatura e concentração de CO₂ (37°C e 5%, respectivamente). A morfologia das colônias pode variar segundo a origem do isolado. Os isolados de amostras invasivas apresentam colônias opacas, devido a elevada produção da cápsula, e antígenos de proteção e menor quantidade de moléculas de superfície. Em contraste, isolados provenientes da colonização nasofaríngea apresentam colônias transparentes, devido elevada produção de moléculas de adesão e menor quantidade cápsula (Tuomanen, 1999; Yother *et al.*, 1998).

Uma característica típica na identificação do pneumococo é a presença da α -hemólise quando cultivado em meio contendo sangue, resultante da destruição parcial dos eritrócitos (no meio de cultura). As provas de identificação comumente utilizadas no laboratório são a susceptibilidade à optoquina e à solubilidade em sais biliares. Os pneumococos são normalmente sensíveis à optoquina (considera-se sensível se tiver um halo de inibição ≥ 14 mm), e positivo ao teste de bile solubilidade (Connie & George, 2000; Murray *et al.*, 2007; Winn *et al.*, 2006).

2.9 Tratamento e resistência aos fármacos

Emergência de cepas de *S. pneumoniae* resistente aos antibióticos tem complicado a estratégia de manejo da doença pneumocócica. Resistência a

diferentes classes de antimicrobianos bem como a sua distribuição por sorotipos tem sido descrito em vários países (Applebaum 1992; Tamayo *et al.*, 1999). No Japão a proporção de cepas de pneumococo multi-droga resistente (MDR) tem aumentando drasticamente (Qin *et al.*, 2006). Antes de 1967 esta bactéria era susceptível à penicilina e a muitos outros antibióticos. A primeira cepa de *S. pneumoniae* não susceptível a penicilina foi descrita na Austrália em 1967 (Hansman *et al.*, 1967). Pneumococo resistente à penicilina e outros antibióticos (designadas de cepas multirresistentes) foi descrita pela primeira vez na África do Sul, abrangendo os sorotipos 6A e 19A e apresentava uma Concentração Inibitória Mínima (MIC) igual a 0,12 a 4mg/L (Jacobs *et al.*, 1978).

Na Espanha a primeira cepa resistente à penicilina com MIC igual a 0,5mg/L foi isolada em Barcelona (Linares *et al.*, 1983). Na década de 1980 taxas elevadas de resistência começaram a ser reportadas em vários países, constituindo um problema sério no tratamento da DP, principalmente meningite pneumocócica (Appelbaum, 1992). O consumo de antibióticos tem sido apontado como a principal causa de surgimento de cepas resistentes. Um estudo que comparou o consumo de antibióticos entre Americanos e Europeus revelou que países nórdicos europeus, apresentam taxa baixa de consumo de antibiótico enquanto que os países do sul (Grécia, França e Itália) apresentaram taxas elevadas, similares a encontradas nos pacientes Americanos (pacientes não internados) (Linares *et al.*, 2010). Em São Paulo (sudeste do Brasil), um estudo mostrou que 93,5% dos isolados de pneumococos eram susceptíveis à penicilina (Yoshioka *et al.*, 2011), enquanto que no nordeste (em Salvador) um estudo mostrou que 22% dos isolados eram não susceptíveis à penicilina, e o sorotipo 14 foi o único que apresentou resistência à penicilina e cefotaxima (O Menezes *et al.*, 2011)

Principais mecanismos de resistência:

- a) Resistência à penicilina e a β lactâmicos: O mecanismo de resistência à penicilina ocorre por mutações nas proteínas ligadoras de penicilina

(PBPs), resultando na diminuição da afinidade da penicilina aos PBPs, ou seja, ocorre redução na capacidade das moléculas do antimicrobiano se ligarem aos PBPs: 1A, 1B, 2A, 2B e 2X (Hackenbeck *et al.*, , 1986). Contudo outros antibióticos como Ceftriaxona, Cefotaxima e Carbapenem são poucos afetados (Smith & Klugman 1998).

- b) Resistência à macrolídeos: ocorre por uma modificação no sitio ativo mediado pela enzima *ermB*-metilase, que confere resistência à todos macrolídeos, lincosamidas e estreptogamina B. Os macrolídeos agem bloqueando a síntese protéica. Outro mecanismo de resistência é devido ao efluxo da bomba, codificado pelos gene *mef* (*mef A* e *mef E*). Este mecanismo de resistência não abrange a lincosamidas e estreptogaminas (Felmingham *et al.*, 2007).
- c) Resistência à quinolonas (fluoroquinolonas): é devido a uma mutação de ponto, produzindo alterações na região da subunidade DNA topoisomerase IV ($ParC_2GyrB_2$) e DNA girase ($GyrA_2GyrB_2$) (Stanphone *et al.*, 2005). Contudo a resistência pode também ser adquirida por recombinação intra-específica ou interespecífica com *Streptococcus* do grupo *mitis* (Ferrandiz *et al.*, 2000).

O maior impacto da resistência aos antimicrobianos depreende-se com a dificuldade no tratamento e manejo do paciente, e disseminação de clones resistentes a antibióticos, implicando em alterações no padrão da doença aumentando o potencial invasivo e letalidade (Klugman 2002). Normalmente o tratamento de DP, é ajustado em cada país em função da epidemiologia da doença, e do perfil de resistência antimicrobiana da região (para cada grupo de microorganismo), o que é raramente conhecido em muitos países africanos por falta de informação (pesquisa).

2.10 Caracterização clonal de pneumococos

Um clone pode ser definido como um isolado ou grupo de isolados descendentes de uma cepa precursora comum que exibem características

fenotípicas ou genotípicas comuns definidas através de um método de tipagem como pertencentes a um mesmo grupo.

Em 1997, foi criada uma rede internacional designada *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN), cujo objetivo é padronizar a nomenclatura e classificação de clones, bem como estabelecer uma vigilância e classificação de pneumococos resistentes aos antibióticos ((MacGee *et al.*, 2001). Os critérios de inclusão estabelecidos pela PMEN, sugerem que:

1. O clone deve ter ampla distribuição geográfica (isolado pelo menos em 2 continentes);
2. O clone deve ser resistente a um ou mais antibióticos utilizados na rotina clínica ou ser um clone susceptível, globalmente conhecido, por ser importante na doença;
3. Dados sobre o clone devem ser publicados na imprensa, antes da sua ratificação pela rede;
4. Novos clones para serem aceitos pela rede precisam ser propostos na reunião anual do PMEN;
5. Os clones devem ser disponibilizados para análise e confirmação antes da aceitação e publicação para a rede;
6. O clone deve ser disponibilizado para o depósito na coleção de ATCC dos clones.
7. O mesmo estará disponível através do laboratório de Streptococcus na Alemanha e na Universidade de Emory nos Estados Unidos da América (<http://www.sph.emoryedu/PMEN/index.html>)

Nomenclatura dos clones:

O sistema usado para nomear os clones é o seguinte: O primeiro país que identificou o clone, seguido do número sequencial de identificação (submissão na rede PMEN), e o sorotipo. Exemplo: o clone **Spain^{23F}-1**, le-sê: Spain (Espanha em Inglês), o primeiro país a identificar o clone, 23F refere-se ao primeiro sorotipo de pneumococo identificado com este perfil, e 1 significa o

número do clone na base de dado do PMEN. Membros de um único clone podem expressar diferentes sorotipos capsulares, neste caso a nomenclatura deverá ser: **Spain^{23F}-1-19F** (PMNE, 1997). O uso de ferramentas moleculares tem demonstrado que a introdução de resistência antimicrobiana em diferentes regiões do mundo foi devido à transmissão e expansão de poucos clones resistentes à antibióticos. Tem-se como exemplo o clone Spain^{23F} – 1, que se propagou da Espanha para diferentes partes do mundo (Klugman 2002), conforme demonstrado na figura 5.

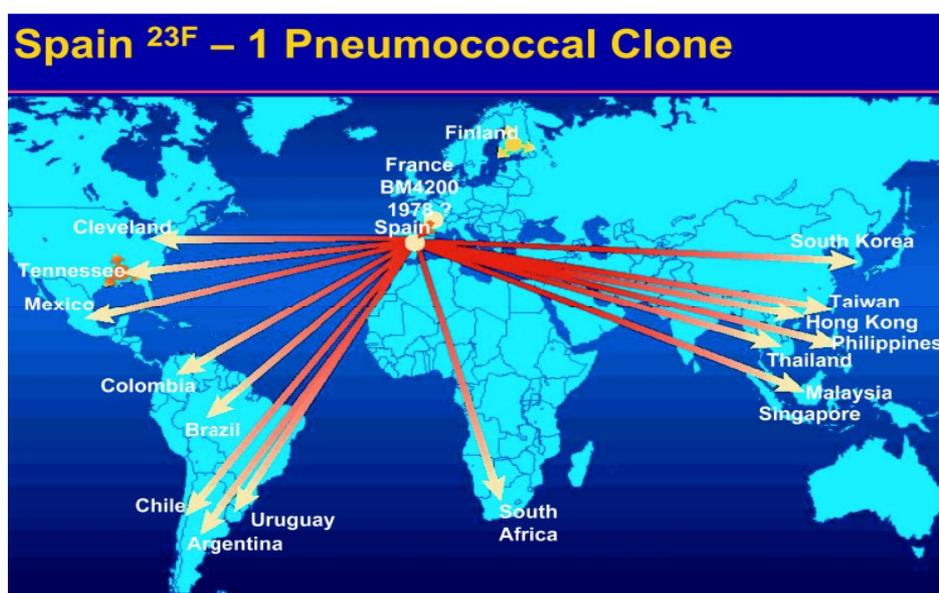


Figura 5. Distribuição global do clone Spain^{23F}-1 de pneumococo.

Aumento e expansão de novos clones na era pós-vacinal

A epidemiologia das doenças causadas por *S. pneumoniae* em países que introduziram a PCV-heptavalente, tem apresentado novos desafios, observa-se um aumento de doença pneumocócica causada por sorotipos não vacinais, processo conhecido como substituição de sorotipos (Eskola *et al.*, 2001), além deste fato observa-se também o aumento e expansão de diferentes tipos capsulares com mesmo perfil genético, este procedimento é designado de troca capsular (Brueggemann *et al.*, 2007). A transferência de genes de virulência e ou de determinantes de resistência entre cepas de pneumococos, tem ocasionado mudanças no perfil genético de uma dada cepa (Enrigh &

Spratt, 1998; Maiden & Spratt, 1998). Embora a resistência esteja associada a um limitado número de sorotipos (6A, 6B, 9V, 14, 19A, 23F), o uso prévio de antibióticos constitui um fator de risco para aquisição de doença invasiva (Ko *et al.*, 2000), cepas resistentes à antibióticos tendem a ser mais clonais que cepas susceptíveis (MacGee *et al.*, 2001). Entretanto clones que são altamente invasivos podem causar menos doença, se estiverem presentes nas vacinas (Dagan, 2003; Klugman, 2002).

2.11 Doença pneumocócica no contexto Africano

As infecções respiratórias agudas (IRAs), são a principal causa de mortalidade infantil no mundo, aproximadamente 21% destas mortes ocorrem em crianças africanas menores de 5 anos de idade (Zar 2006). Com uma estimativa de 4.2 milhões de mortes anuais (Black *et al.*, 2010), a África Sub-Sahariana representa o paradigma dos efeitos devastadores de uma doença infecciosa que afeta a sobrevivência de muitas crianças africanas. Além das IRAs, juntam-se a malária, doenças diarreicas e HIV (Williams *et al.*, 2002; Zar, 2006), o que constitui, sem dúvida, uma carga enorme para os sistemas de saúde dos países africanos. Das IRAs, a DP é a que mais mortes causa, muitas dessas pela forma invasiva da doença (bacteremia e meningite) (O'Dempsey *et al.*, 1996). Ainda que *S. pneumoniae* seja uma causa importante de DP nos países africanos, principalmente nas zonas rurais onde vive a maior parte da população, a falta de infra-estrutura, recursos humanos qualificados e limitados recursos financeiros culminam com a escassez de informação sobre a doença neste continente, o que dificulta a tomada de decisões incluindo estratégias de prevenção e controle das doenças (Berkley *et al.*, 2005). A incidência da DP na África é mais elevada que a dos países desenvolvidos (Johnson *et al.*, 2010), ainda que sejam limitados os trabalhos disponíveis, um resumo de estudos realizados em alguns países africanos, as incidências e as taxas de mortalidade estão apresentadas no quadro 2.

Quadro 2: Taxas de incidência e mortalidade por DP nos países africanos

PAÍS	INCIDÊNCIA (/100.000 hab.)	FORMA CLÍNICA DA DOENÇA	MORTALIDADE	AUTORES
África do Sul	42 pop. Geral	DPI	50,1%	(Madhi <i>et al.</i> , 2000)
Burkina Faso	14 pop. Geral 77 (<1 ano) 65 (5-15anos)	DPI	46%	(Yaro <i>et al.</i> , 2006)
Gâmbia	554 (< 1 ano) 240 (<5 anos)	DPI	1% Pneumonia. 55% Meningite.	(O'Dempsey <i>et al.</i> 1996)
Gâmbia	224 (<1 ano) 139 (<2 anos) 82 (<3 anos)	DPI	_____	(Usen <i>et al.</i> , 1998)
Gâmbia	363 (5meses) 576 (6-11meses)	DPI	_____	(Antonio <i>et al.</i> , 2008)
Gana	43 (<1 ano) 15-26 (2-60 anos)	DPI (Meningite pneumocócica)	44%	(Leimkugel <i>et al.</i> , 2005)
Malawi	_____	DPI	24%	(Harrington <i>et al.</i> , 2007)
Mali	84	DPI	24%	(Campbell <i>et al.</i> , 2004)
Moçambique	416 (<5anos) 779 (<3meses)	DPI	10% 56% MP ⁺	(Roca <i>et al.</i> , 2006)
Moçambique	20 (<15anos) 10 (MP ⁺)	DPI	36% 45% MP ⁺	(Sigauque <i>et al.</i> , 2008)
Moçambique	_____	DPI	11% PS ⁺	(Sigauque <i>et al.</i> , 2009)
Moçambique	1072 (<2 meses) 507 (<1ano) 53 (1-4 anos) 26 (5-15anos)	DPI (Meningite pneumocócica)	21% MP ⁺	(Roca <i>et al.</i> , 2009)
Quênia	1457 (<1 ano) 1080 (<2 anos) 505 (<5 anos)	DPI (PAC)	26% PAC	(Berkley <i>et al.</i> , 2005)

DPI: Doença pneumocócica invasiva; PAC: Pneumonia adquirida na comunidade

MP: Meningite pneumocócica; PS: Pneumonia grave

Além das elevadas taxas de incidências e letalidade por DP, a resistência aos antimicrobianos é também um problema sério no manejo das DP na África, uma vez que o tratamento inicial por infecções bacterianas continua empírico, dado a escassez de recursos para realizar uma vigilância sobre resistência

antimicrobiana (Roca *et al.*, 2006). Dados disponíveis apontam taxas elevadas de resistência à penicilina no continente africano, sendo a mais elevada na África do Sul com cerca de 76%. Um estudo realizado neste país em indivíduos soro positivo para o HIV mostrou que 45,9% e 44,5% dos isolados foram resistentes à penicilina e cotrimoxazole respectivamente (Leibowitz *et al.*, 2003). A taxa de Multi droga resistente (MDR) entre isolados de pneumococos na África do Sul é de 24% (Madhi *et al.*, 2000).

Em Moçambique a taxa de resistência à penicilina continua moderada, contudo a prevalência de pneumococo com nível intermediário de resistência a este antibiótico foi de 52% em isolados de colonização Valles *et al.*, 2006. Um estudo recente mostrou uma taxa de resistência de 50% para cotrimoxazole (Mandomando *et al.*, 2009). Num contexto de recursos limitados, impõe-se a necessidade de desenvolvimento de novos meios de tratamento e prevenção. Desse modo, a prevenção a longo prazo através da vacinação se torna uma grande prioridade de saúde pública (Zar, 2006).

A PCV-heptavalente apresentou uma redução significativa nas taxas de doença pneumocócica nos Estados Unidos da América e na Europa. Uma vez que a distribuição dos sorotipos varia de acordo com a área geográfica, esta vacina não é eficaz para os países africanos, onde os sorotipos 1 e 5 são mais prevalentes (Valles *et al.*, 2006, Mudhune *et al.*, 2009, O'Brien *et al.*, 2009; Bogaerts *et al.*, 1993, Husdorff *et al.*, 2000) e as doenças invasivas por esses sorotipos causam surtos com elevada letalidade (Yaro *et al.*, 2006; Leimkugel *et al.*, 2005).

Dois ensaios clínicos realizados com a PCV-nanovalente (contendo sorotipos 1 e 5) na Gâmbia e na África do Sul, apresentaram resultados benéficos na redução da incidência da doença, principalmente entre pacientes portadores do vírus de imunodeficiência humana (Cutts *et al.*, 2005; Klugman *et al.*, 2003). Entretanto, essa vacina não foi disponibilizada para uso. Novas PCVs contendo sorotipos 1 e 5, já estão sendo comercializadas. Informação sobre a cobertura das três PCVs está apresentada na tabela 2. A PCV-13 é a que apresenta melhor cobertura quando comparada com as demais (Mudhune & Wamae 2009).

Tabela 1. Estimativa da cobertura vacinal por PCVs entre crianças menores de 5 anos de idade, por faixa etária, país e tipo de amostra*

		Nº Pacientes	PCV- heptavalente	PCV- decavalente	PCV- tridecavalente
Idade (meses)	0-5	90	41,1%	72,2%	84,4%
	6-29	163	56,4%	74,9%	89,9%
	30-59	61	34,4%	77,0%	88,2%
País	Quênia	258	46,5%	75,9%	79,1%
	Tanzânia	13	46,1%	100%	100%
	Uganda	43	55,8%	58,1%	79,1%
Amostra	Sangue	213	46,5%	77,0%	88,3%
	LCR	101	50,5%	69,3%	84,1%

*A cobertura foi calculada segundo o número de isolados disponíveis de cada país.

Fonte: Mudhune & Wamae 2009.

Em 2005, aproximadamente 2.3 milhões de crianças estavam infectadas pelo HIV, a mortalidade foi de 570.000 em crianças < 15 anos, e calcula-se que ocorreram cerca de 700.000 novas infecções anuais. A maior parte dessas crianças infectadas reside na África (www.unaids.org, 2005 UNAIDS/WHO/AIDS). A alta prevalência do HIV na África Sub-Sahariana, constitui um fator impactante na incidência e no desfecho das doenças respiratórias infecciosas. Estudos mostram que indivíduos infectados por HIV são mais susceptíveis a infecções por *S. pneumoniae* (Jones *et al.*, 1998; Madhi *et al.*, 2000).

Um estudo realizado em crianças sul-africanas para avaliar a eficácia da PCV-novalente (1, 4, 5, 9V, 14, 19F, 23F, 6B e 18C) em portadores de HIV obteve como resultado uma redução na incidência de DP em 56% nos portadores de HIV e em 20% nas crianças HIV negativas em relação ao primeiro episódio da doença. Também foi relatado, nesse estudo, uma redução na incidência da doença causada pelos sorotipos vacinais, diminuição dos

casos de doença pneumocócica radiologicamente confirmada, bem como uma redução de pneumococos invasivos resistentes à antibióticos em ambos os grupos estudados (Klugman *et al.*, 2003). Na Gâmbia, a mesma vacina apresentou uma eficácia de 77% contra a DPI causada por sorotipos vacinais, de 50% contra doença causada por todos sorotipos, de 15% contra todos internamentos e de 16% contra mortalidade (Cutts *et al.*, 2005).

Os países africanos ainda carecem de informação sobre a carga da doença (taxas de incidência, prevalência, mortalidade e impacto econômico da doença), cobertura vacinal (distribuição dos sorotipos entre os indivíduos portadores e doentes, resistência à antimicrobianos), de disponibilidade financeira para a introdução da vacina nos programas rotineiros de imunização, bem como apresentam limitações para realizar estudo de avaliação/monitória após a introdução da vacina.

3. DESCRIÇÃO DO PAÍS

Moçambique é um país do continente africano, que ocupa uma extensão territorial de 799.380 km². Localiza-se na costa oriental da África Austral, limitado a norte pela Zâmbia, Malawi e Tanzânia, a leste pelo Canal de Moçambique e pelo Oceano Índico, a sul pela África do Sul e a oeste pela Suazilândia e pelo Zimbabwe. No Canal de Moçambique, faz fronteira com as ilhas Comores e Madagáscar (INE, 2009) (Figura 6).



Legenda:

1: Zona Norte (Lichinga, Pemba, Nampula)

2: Zona Centro (Queliamne, Tete, Chimoio, Beira)

Figura 6. Mapa da África e localização de Moçambique

Fonte: INE-Moçambique, 2010

3. 1 Política e Divisão Administrativa

Moçambique é uma República presidencialista cujo governo é formado pelo partido político com maioria parlamentar. As eleições são realizadas a cada cinco anos. O País tem 10 províncias, divididas em três zonas (Norte, centro e sul), cada província se divide em distritos e estes em postos administrativos e localidades. As principais cidades são: Nampula (no norte), Beira (no centro) e Maputo (no sul), a capital do país (INE, 2010).

3. 2 Características sócio-demográficas de Moçambique

Moçambique foi uma colónia de Portugal durante 500 anos. Tornou-se independente em 1975 por meio de uma luta armada que durou 10 anos e que culminou com a instituição da primeira República (uma República socialista). Dois anos após a independência, seguiu-se uma guerra civil que durou 16 anos. A paz foi restabelecida em Outubro de 1992, sendo que neste mesmo período se assinalou o fim da República socialista. Em 1995 regressam cerca de 1.7 milhões de Moçambicanos refugiados nos países vizinhos (INE, 2010).

O país tem uma população de cerca de 22.416.881 habitantes. A maior parte da população vive na zona rural (14.197.384) contra os 6.028.912 que vivem nas cidades. A taxa de analfabetização é de 54.4%. A língua oficial é o português, entretanto cada região fala uma língua materna diferente, maioritariamente de origem bantu (existe 30 línguas maternas diferentes em Moçambique). Os produtos de exportação são o algodão, castanha de caju, e camarão. A principal atividade da população é a agricultura de subsistência e a moeda nacional é o metical (Mt). O rendimento *per capita* anual foi de 454 dólares americanos em 2009 (INE, 2010).

3. 3 Clima

O clima é do tipo inter-tropical, com duas estações: a estação chuvosa de Outubro à Abril, e a estação seca, entre os meses de Junho à Setembro. A precipitação média nas montanhas ultrapassa os 2000 mm. A umidade relativa é elevada situando-se entre 70 a 80%, embora os valores diários chegam a oscilar entre 10 e 90%. As temperaturas médias variam entre 20 °C no Sul e 26 °C no norte, sendo mais elevadas durante a época das chuvas.

3. 4 Saúde

Segundo o INE, em 2009 o país tinha 1042 médicos. A malária constitui o principal problema de saúde, seguida do HIV/SIDA sendo as taxas de mortalidade dessas doenças de 29% e 27% respectivamente. A mortalidade infantil é de 118/1000 nascimentos, e a esperança de vida ao nascer é de 52 anos.

4. JUSTIFICATIVA

Os dados anteriores a este trabalho demonstram que em Moçambique, os sorotipos 1 e 5 são a principal causa de doença pneumocócica invasiva em crianças. A emergência global de pneumococo resistente a vários antimicrobianos é um fato, embora este fenômeno esteja associado a um número limitado de clones e sorotipos o que levanta uma série de hipóteses referentes a eventos de pressão seletiva e/ou virulência intrínseca do patógeno. Surto de meningite causado por *S. pneumoniae* sorotipo 1 clone ST 217 reportados em Gana e Burkina Faso, descreveram este clone como hipervirulento e altamente letal (Leimkugel *et al.*, 2005). A magnitude do surto descrito nestas regiões teria provavelmente atingido outros países africanos.

A caracterização molecular dos isolados de pneumococo em Moçambique, constitui uma oportunidade única para descrever o perfil clonal dos isolados mais prevalentes e invasivos, bem como reconhecer os clones que circulam neste país. A descrição dos padrões obtidos através da metodologia molecular empregue neste trabalho, pode ser útil localmente para propósitos epidemiológicos ou, internacionalmente, para descrever o relacionamento de cepas de pneumococos isoladas neste país com as de outras áreas do mundo antes da introdução da PCV. Os resultados deste trabalho são valiosos, pois poderão ser utilizados como base para avaliar as possíveis alterações que as PCVs podem causar na composição clonal desses sorotipos.

5. PERGUNTA DE INVESTIGAÇÃO:

O perfil clonal dos sorotipos 1 e 5, isolados em doença pneumocócica invasiva em Moçambique não é similar aos descritos em outros países africanos como cepas hiper virulentas?

6. OBJETIVOS

Geral:

Descrever a composição clonal dos sorotipos 1 e 5 de *S. pneumoniae*, isolados de doença pneumocócica invasiva no distrito da Manhica, em Moçambique.

Específicos:

1. Descrever as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com DPI causada por pneumococos sorotipo 1 e 5;
2. Descrever o perfil de susceptibilidade dos isolados de pneumococos sorotipos 1 e 5 obtidos por cultura de sangue ou líquido cefalorraquidiano (LCR);
3. Caracterizar os isolados dos sorotipos 1 e 5 por BOX-PCR, PFGE e MLST.

7. METODOLOGIA

7.1 Descrição área de estudo (Distrito da Manhiça)

O distrito de Manhiça está situado no sul de Moçambique, na província de Maputo, a cerca de 80 km a norte da província (Figura 7). O clima desta região é subtropical, com duas estações distintas, uma quente e chuvosa entre os meses de Novembro a Abril e outra fria e em geral seca durante o resto do ano. O Distrito tem uma população estimada de 156.445 indivíduos (INE, 2009). A densidade populacional estimada é de 66 habitantes/Km². A maior parte da população é jovem (41% abaixo de 15 anos), maioritariamente do sexo feminino. O Distrito tem duas zonas distintas. A primeira zona localiza-se a oeste do Distrito, é caracterizado por dunas costeiras, planícies e solos arenosos (ao longo do rio Incomati). A segunda zona é moderadamente alta (100m acima do nível médio do mar), apresenta solos de média fertilidade (MAE, 2005).

A despeito da existência de duas fábricas de açúcar (que empregam cerca de 65% da população), e outros pequenos comerciantes, economicamente Manhiça é caracterizada por famílias camponesas que produzem basicamente milho, feijão, banana, mandioca, arroz e amendoim. Algumas pessoas dedicam-se ao artesanato e produção de bebidas alcoólicas tradicionais, criação de gado bovino e produção de blocos de construção civil (MAE, 2005).

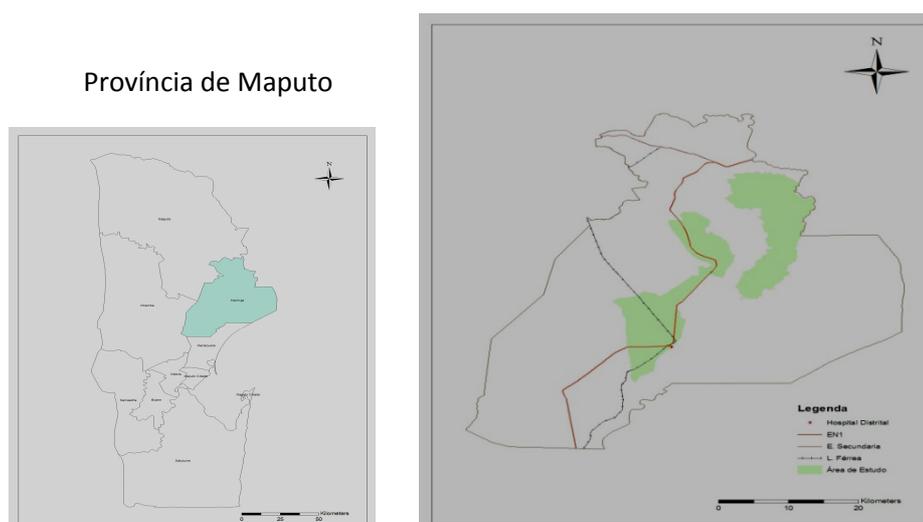


Figura 7. Mapa da província de Maputo e de localização do Distrito da Manhiça

Mapa do distrito da Manhiça. Em verde corresponde a área de estudo

Fonte: www.manhica.org (2010)

7. 2 Sistema de vigilância demográfica (SVD)

Em 1996 o Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM), realizou um censo nesse distrito. Este censo abrangeu 33.953 habitantes, numa área de 100km². Informações sobre eventos vitais (nascimento, mortes, gravidez, migração) eram recolhidas a cada três meses. Em 2000 esta área foi ampliada cobrindo mais postos administrativos. Os agregados familiares foram mapeados por GPS, a cada membro da família foi atribuído um número único de identificação (Perm ID)¹, em cada agregado foram recolhidas informações como: data de nascimento, sexo, estado civil, e grau de relacionamento ou parentesco com o chefe do agregado bem como o nível de educação. Em 2005 mais uma localidade foi recensada, e a área sob vigilância demográfica foi ampliada para 500km², cobrindo cerca de 21% da área total do distrito (Tabela 3). O Perm ID permite que se faça uma associação entre o SVD e o sistema de morbidade, permitindo desse modo cálculos exato de incidência sob tempo de risco (exposição) a uma dada doença.

Tabela 2: Ampliação da área de estudo por ano, área e população abrangida

	1996	2002	2005
Área Censada	Manhiça, Maragra	+ Ilha Josina Machel, Palmeira, Malavele	+ Tanninga
Área geográfica (km²)	100	300	500
Habitacões	8.038	17.006	18.725
Pop. ½ do ano	33.953	71.719	78.183

¹ Perm ID: é um número único de identificação de cada membro de um agregado, constituído por 8 dígitos, sendo os 4 primeiros referentes ao bairro, os 3 seguintes ao agregado e os 2 últimos ao indivíduo dentro do agregado

7. 3 Hospital Distrital da Manhiça (HDM) e Vigilância de Morbidade

O HDM, é o hospital de referência nesse distrito, tem 110 leitos para internamento, serviço de atendimento ambulatorial, uma maternidade, uma sala de pequenas cirurgias e uma sala de urgências. Os serviços de saúde bem como o tratamento são gratuitos para todos pacientes atendidos internados ou ambulatoriais. A malária e pneumonia são as principais causas de morte em crianças, sendo a pneumonia a primeira e a mais importante em neonatos (Sacarlal *et al.*, 2009). A partir de 1997 o CISM e o HDM passaram a desenvolver em conjunto um sistema de vigilância pediátrica para todas as crianças menores de 15 anos que são atendidas no serviço ambulatorial (OPD). A detecção passiva dos casos foi estabelecida no HDM e em todos os postos periféricos de saúde dentro da área sob vigilância demográfica.

7. 4 Infraestruturas Laboratoriais

O Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) conta com um Laboratório certificado com ISO 9000:2008 desde ano de 2010. O laboratório dividi-se em quatro unidades (Hematologia e Bioquímica, Microbiologia e micobacteriologia, Biologia Molecular e Imunologia), e serviço de suporte (preparação de meios de cultura e Biossegurança).

a) Hematologia e Bioquímica: Equipado com aparelhos para realização de hemograma e determinação de parâmetros bioquímicos (enzimáticos). Diagnóstico qualitativo e quantitativo (determinação de parasitemia) da malária através de leitura de lâminas coradas a Giensa, e na determinação de hematócrito.

b) Microbiologia e Micobacteriologia: Com capacidade para cultura de diferentes fluidos corporais, identificação de microorganismos por meio de provas bioquímicas e sorológicas, realização de teste de susceptibilidade aos antibióticos (disco difusão e E-Teste), sorotipagem de isolados bacterianos com base em anti-soros específicos.

c) Biologia Molecular: Possui infra-estrutura necessária para realização de técnicas como PCR, PFGE, determinação de carga viral e PCR em tempo real.

d) Imunologia: Realiza pesquisa no âmbito das respostas celulares e humorais, cultura de células, e determinação da produção de citocinas, contagem de células CD4, utilizando a citometria de fluxo com 4 cores (BD 4 colour FACS Calibur).

7. 5 Vigilância Hospitalar e coleta de amostras

Serviço de atendimento externo (OPD): Para cada criança menor de 15 anos de idade, atendidas neste serviço, um questionário sobre dados demográficos, sintomas e diagnóstico, é preenchido por um agente ou técnico de medicina (anexo I). A coleta de sangue, através de picada no dedo, para pesquisa de malária e determinação de hematócrito (PCV) são rotineiramente realizados em crianças com febre, ou com relato histórico de febre nas prévias 24h. Crianças que apresentam algum sinal de gravidade como pneumonia clínica, sépsis, bacteremia, ou sintomas de meningites, (indicação para coleta de hemocultura, ou LCR) durante o exame físico ou com o hematócrito $<25\%$ e parasitemia alta são imediatamente transferidas para o HDM para o internamento.

Nos serviços de Internamento (INPD) do HDM para cada criança internada, um questionário específico é preenchido com informações detalhadas sobre sinais e sintomas observados desde a hora do internamento até o momento da alta (anexo II). Desde 1997, com o estabelecimento da vigilância bacteriana, tornou-se rotina a coleta de sangue venoso para pesquisa da bactéria em todas as crianças menores 2 anos com febre ou relato prévio de febre, e em crianças com menos de 15 anos, com temperatura axilar $\geq 39^{\circ}\text{C}$, e ou apresentando algum sinal de gravidade. A punção lombar é realizada em todas as crianças que apresentam os seguintes critérios: rigidez da nuca, abaulamento das fontanelas, perda de consciência, relato de convulsão (excluindo epilepsia), sinais neurológicos focais, irritabilidade ou sonolência, suspeita de sépsis ou recém nascido internado com febre ou suspeita de sépsis neonatal.

7. 6 Aspectos éticos

Os estudos em curso tem aprovação ética de entidades nacionais, e ou estrangeiras quando necessário. Os resultados das análises laboratoriais são reencaminhada ao hospital para orientar o tratamento do paciente. Toda informação do paciente é mantida em sigilo. Os isolados bacterianos são colocados em meio líquido, skim milk (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) contendo 10% de glicerol, e estocados a -70°C , para posteriores determinações laboratoriais. Aprovação do Comitê Nacional de Bioética para Saúde-Moçambique (anexo III).

7. 7 Critérios de inclusão e exclusão:

Estes isolados são provenientes de crianças que participaram de um estudo de vigilância de infecções bacterianas invasivas, que durante o recrutamento apresentavam sintomas e critérios para coleta de sangue ou de líquido cefalorraquidiano (LCR). Para cada caso específico, seguem abaixo descritos os critérios.

Coleta de hemocultura:

Crianças menores de 2 anos de idade que apresentassem febre ou relato de febre nas prévias 24h.

Crianças menores de 15 anos com febre, ou com relato de febre nas prévias 24h e que apresentassem suspeita de sépsis, bacteremia, ou pneumonia clínica (tosse, dificuldade respiratória, frequência respiratória aumentada).

Coleta de Líquido cefalorraquidiano (LCR):

Todas as crianças que apresentassem sintomas de meningite como:

-Rigidez da nuca, abaulamento das fontanelas, perda de consciência, história de convulsão, sinais neurológicos focais, irritabilidade ou sonolência, suspeita de sépsis ou recém-nascido internado com febre ou suspeita de sépsis neonatal.

Foram excluídas deste trabalho crianças com evidência de asma, doença cardíaca congênita, asfixia neonatal, crianças maiores de 15 anos de idade.

Definições de caso:

Pneumonia clínica: Presença de tosse, dificuldade respiratória, frequência respiratória aumentada de acordo à idade exemplo: 60 batimentos/min para crianças menores de 2 meses, 50 batimentos/min para crianças de 2 à menores de 12 meses, 40 batimentos/min para crianças de 1 à menores de 5 anos (WHO, 1999).

Pneumonia grave: Presença de tiragem intercostal em crianças com pneumonia clínica e ou alteração radiológica (Puumalainen *et al.*, 2008; Ayieko *et al.*, 2007).

Malária: (parasitemia por *Plasmodium falciparum*): Quando uma ou mais formas assexuadas do parasita eram observadas após leitura de 100 campos microscópicos em 100X.

Anemia: Percentual de eritrócitos (volume total de células) por volume total de fluido sanguíneo. O valor da anemia foi obtida a partir do valor do hematocrito. Os níveis de anemia foram classificados em baixa (25–33%), moderados (15–24%) e graves (<15%).

Desnutrição foi calculada a partir do Z-score (razão de peso por idade). Desnutrição grave foi atribuída às crianças que apresentavam um Z-score < -3. O Z-score calcula-se subtraindo a mediana do peso da população para a idade da criança pelo peso da criança, dividindo pelo desvio padrão (SD) do peso da população para àquela idade. Ex: se os dados de referência da população para uma dada idade são: peso 10.1kg, SD 1.0kg e o peso da criança é 6.1kg, a criança tem um Z-score de -4. $[(6.1-10.1)]/1.0=-4$ (Shann 1993).

7. 8 Gestão de dados

O CISM tem uma unidade de gestão de dados. Todos os questionários são introduzidos duplamente no programa FoxPro (versão 2.6, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), caso haja discrepância, os dados são corrigidos a partir dos questionários fonte (originais). As análises estatísticas são feitas usando o programa estatístico STATA.

7. 9 Diagnóstico Laboratorial (Microbiológico)

Um questionário com informações relevantes sobre o paciente e amostras, foi preenchido quando as hemoculturas chegavam ao laboratório. A seguir as hemoculturas foram introduzidas/incubadas no aparelho, BACTEC 9050 até 4 dias (caso não fosse positiva durante este período, eram consideradas hemoculturas negativas). As hemoculturas positivas eram retiradas do aparelho, realizada a coloração de Gram. Amostras que na coloração fossem cocos Gram positivos compatíveis com estreptococos, foram semeados numa placa de agar com 5% de sangue de carneiro (Selecta Media, SA) seguindo-se todos os cuidados de assépsia e incubada em estufa (Nuair-air Jacket) com 5% de CO₂ à 35°C.

7. 10 Identificação do pneumococo

Após 24h de incubação a bactéria era identificada seguindo-se os procedimentos microbiológicos padrões:

- a) Morfologia das colônias e teste de susceptibilidade a Optoquina;
- b) teste de bile solubilidade.

a) Morfologia das colônias e teste de susceptibilidade a optoquina; a bactéria foi semeada em uma placa de agar sangue, em duas direções, e o disco de optoquina (BD – BBL Sensi – Disc, Becton Dickinson and Company, USA) foi colocado no centro da placa com ajuda de uma pinça estéril e incubado a 35° C em atmosfera de 5% de CO₂ observando-se todas as condições de assépsia. A leitura foi realizada após 24 horas de crescimento através da medição do halo de inibição de crescimento, usando uma régua automática calibrada. Um diâmetro ≥ 14 mm em volta do disco confirma que a bactéria é pneumococo (Figura 8). Tanto os isolados sensíveis ou resistentes a optoquina foram submetidas ao teste de bile solubilidade para confirmação definitiva.



Figura 8. Teste de optoquina em cultura de *S. pneumoniae*

Fonte: Arquivo pessoal

c) **Teste de bile solubilidade** foi realizado utilizando uma solução de desoxicolato de sódio a 10% (Sigma – Aldrich, Germany). As bactérias foram suspensas em soro fisiológico a 0,9%, com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland (10^8 UFC/mL) (utilizando um leitor automático, DEN-1 MacFarland densitmeter-BIOSAN). Alíquotas de 0,5 mL da suspensão foram distribuídas em dois tubos, sendo um tubo teste e outro controle. Ao tubo teste foi adicionado 0,5 mL da solução de desoxicolato de sódio a 10% e ao tubo controle foi adicionado 0,5 mL de solução de soro fisiológico. Os tubos foram incubados a 35°C e observadas a cada 15 minutos até 2 horas quanto ao desaparecimento ou não da turvação no tubo teste (Figura 9). O desaparecimento da turvação indicava teste positivo. Uma vez confirmada a espécie, os isolados eram submetidos aos testes de susceptibilidade antimicrobiana realizado através do teste de disco difusão em agar e E-teste quando necessário .

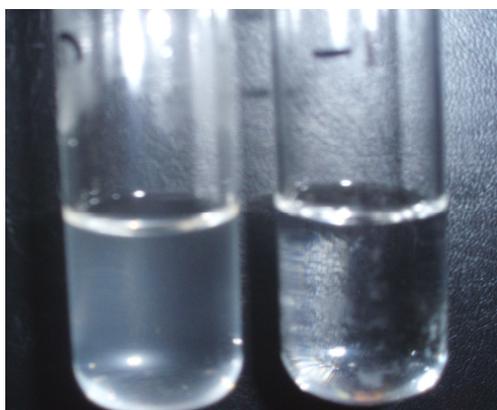


Figura 9. Teste de bile solubilidade

A esquerda: Tubo Controle (teste negativo) (*S. pneumoniae* + soro fisiológico): Tubo turvo

A direita: Tubo Teste (teste positivo) (*S. pneumoniae* + desoxicolato de sodio 10%): Tubo límpido (transparente).

. 11 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Teste de difusão em Agar: O teste de difusão em agar foi realizado seguindo as recomendações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2008), utilizando os seguintes antimicrobianos: cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), oxacilina (1µg), sulfametoxazol/trimetoprima (1,25/23,75µg), tetraciclina (30µg)(BD-BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson and Company, USA). A partir de um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas fez-se uma suspensão em soro fisiológico a 0,9% com turvação de 0,5 na escala de McFarland. Disseminou-se esta suspensão com o auxílio de um *swab* estéril no Meio de Agar *Mueller – Hinton* sangue (com 5% de sangue da carneiro) (Selecta Media, SA) Os discos foram colocados assepticamente com uma pinça a uma distância de 2cm entre um e o outro, e incubado a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. A leitura foi realizada 24h depois, medindo o diâmetro dos halos de inibição de crescimento e interpretada segundo o CLSI, 2008 (Figura 10).

E-test: As amostras que apresentaram diâmetros da zona de inibição menor que 20 mm, em volta do disco de oxacilina foram submetidas ao método do E-teste para determinar a susceptibilidade a penicilina (medindo a concentrações inibitórias mínimas). A partir de um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas foi realizada uma suspensão bacteriana em soro fisiológico a 0,9% com turvação padronizada com a escala 0,5 de McFarland. Esta suspensão foi disseminada com o auxílio de um *swab* estéril no Meio de Agar *Mueller - Hinton* sangue. Sob a superfície da placa foram depositadas as fitas contendo concentrações diferentes de penicilina (2.0 – 32.0mg/L)(Lio filmchem s.r.l. Italy) e incubadas a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas (Figura 11). A leitura foi realizada através da observação do ponto de intersecção do crescimento bacteriano com a fita, o qual identifica a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. A cepa padrão utilizada como controle de qualidade dos antibiogramas foi ATCC 49619. Sub culturas foram armazenadas a -70°C em meio líquido (Skim milk -DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) +10% de glicerol (Labchem, SA).



Figura 10. Placa de antibiograma de *S. pneumoniae* (método de disco difusão)

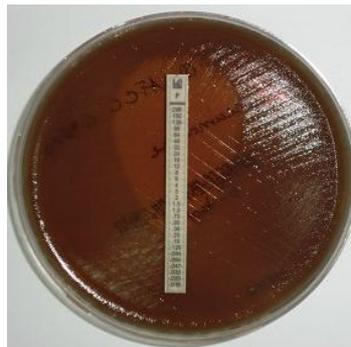


Figura 11. Placa de antibiograma de *S. pneumoniae* (método de E-Teste)

Todos os resultados produzidos a cada passo eram enviados ao Hospital Distrital da Manhica para serem utilizados na orientação da terapia antimicrobiana indicada ao paciente e uma cópia era enviada ao centro de dados afim de serem introduzidas no respectivo banco de dados.

7. 12 Sorotipagem

A sorotipagem foi realizada retrospectivamente, utilizando a técnica de Multiplex PCR (Morais *et al.*, 2007; Pai *et al.*, 2006), amostras não tipáveis por este método foram levadas para o *Center for Disease Control and prevention* (CDC) em Atlanta, afim de serem sorotipadas com antisoros específicos através da reação de intumescimento capsular (reação de Quellung), um total de 5% das amostras sorotipadas pela técnica de Multiplex PCR, foram submetidas ao método de Quellung como controle de qualidade.

7. 13 Tipagem Molecular (Genotipagem)

As determinações moleculares foram realizadas no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) utilizando as seguintes técnicas: BOX-PCR (van Belkum *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 2000), PFGE (Tenover *et al.*, 1995; MacGee *et al.*, 2001) e MLST (www.mlst.net; Enrigh *et al.*, 1998).

7. 13. 1 BOX-PCR

Este procedimento consiste em amplificar certas regiões conservadas e repetidas no DNA cromossômico da bactéria, utilizando oligonucleotídeo (*primer*) BOX específicos.

Isolamento das colônias: Colônias de *S. pneumoniae*, de crescimento primário, foram subcultivadas em meio de agar suplementado com 5% de sangue de carneiro. Colônias recentes (com 24h de crescimento), e não contaminadas, foram utilizadas para o procedimento.

Extração do DNA: As colônias foram re-suspendidas em PBS e reconstituídas em tampão de lise (Tris-HCl 10mM; 50mM de kcl; 1,5mM MgCl₂; 0,01% gelatina; polissorbato 20mg e proteinase K 0,5mg/ml). A suspensão foi incubada a 55°C por 20 minutos, fervida em seguida à 100°C por 15 minutos em seguida centrifugada.

Reação de PCR: Uma vez terminada a extração dos ácidos nucleicos, seguiu-se a reação de PCR. Para tal, foram adicionados num tubo *ependorf* de 1,5mL, 5µL de DNA, 1 µL de *primer* BOX (5'-ATA CTC TTC GAA AAT CTC TTC AAA C-3'), 200 µL de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP), 10% de Dimetilsulfoxido (DMSO) e 2U de *Taq* DNA polimerase nativa. A reação de amplificação foi realizada a 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto, e extensão a 65°C por 16 minutos. Esta condição foi a mesma para a extensão final da reação.

Eletroforese (corrida e revelação do gel): Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% dissolvido em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). A corrida foi realizada durante 2h a uma tensão elétrica (*d. d. p*) de 80V. O gel foi corado durante 15 minutos numa solução de brometo de etídio a 5%. A revelação das bandas foi feita sob luz ultravioleta, a fotografia do gel foi armazenada em arquivo do tipo *tiff*.

Interpretação do perfil eletroforético: Imagens digitalizadas dos padrões de bandas obtidas foram transferidas para um programa informatizado (software Gel Compar versão 4, Applied Maths). Os padrões foram classificados como idênticos relacionados (não-idêntico) e diferentes, comparando-se o número de bandas e a mobilidade produzida durante a eletroforese. Para cepas contendo 7 bandas ou mais, um padrão foi classificado como clone (idêntico), se dois ou mais isolados, produziram o mesmo perfil eletroforético (igual número de banda e mobilidade), sendo então identificados por uma letra (comum para todos isolados com mesmo perfil).

Foram classificados como relacionadas, cepas que apresentaram até 3 bandas de diferenças, sendo identificados por uma letra seguida de um número (um código alfa-numérico). E aqueles isolados que apresentaram mais de 3 bandas de diferença, foram classificados como um outro padrão, recebendo uma outra letra diferente para sua identificação.

7. 13. 2 PFGE

Este procedimento consiste em utilizar o DNA genômico da bactéria, para tal, todo material genético da bactéria é colocado e manipulado num *plug*. Usando uma enzima de restrição específica (*SmaI*) é possível separar o DNA. Uma vez que se geram fragmentos maiores de DNA, só por meio de eletroforese em campo pulsátil, é possível separá-lo ao longo do gel de agarose. Para o PFGE, foi realizado uma cultura primária par ativar o metabolismo bacteriano. Em seguida, foi feito uma subcultura, semeando a bactéria em três direções numa placa de agar sangue, e incubada numa estufa a 35°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

Preparação da suspensão bacteriana: As amostras foram re-suspendidas individualmente num tubo *ependorf* contendo solução salina a 0,9%, até atingirem uma turvação (densidade óptica) entre 0,5-0,6 (450nm). Em seguida esta solução foi centrifugada por 5 minutos a 12000 rotações por minuto (rpm).

O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi re-suspendido com 300µL de PIV gelado, e 4 µL de lisozima (25mg/mL).

Preparação dos blocos de agarose (*plugs*): A cada tubo contendo a suspensão bacteriana, foi adicionada 300 µL de gel de agarose (2%), a amostra foi homogeneizada e transferida para um molde para formação dos *plugs*. O molde foi refrigerado a 0°C/10min. Os *plugs* foram colocados numa solução contendo 2mL de lisozima (Tampão EC), 40 µL lisozima e 5U/mL de mutanolisina, e incubado a 37°C/2h. A seguir, os *plugs* foram lavados duas vezes com 2mL de Tris-HCL, EDTA (tampão TE) à 37°C. Em separado foi adicionado 2mL de EDTA tetra sódico, Nacl (tampão ES) e 40 µL de Proteinase K (25mg/ml) e incubou-se à 55°C, durante 24h.

Nota: O volume dessas soluções variaram segundo o número de amostra a analisar.

Lavagem dos *plugs*: Os *plugs* foram lavados a cada 1h, em um total de 6 a 8 lavagens antes de se realizar o corte do DNA com a enzima de restrição.

Digestão do DNA com enzima de restrição (*SmaI*): Antes de se proceder a digestão, foram realizadas mais 4 a 6 lavagens com tampão TE. Em seguida, os *plug* selecionados foram lavados com o tampão de enzima (uma vez durante 1 hora). Cada *plug* foi colocado num tubo contendo a solução de corte constituída por: 270 µL de água de PCR, 30 µL de tampão de enzima, 3 µL de albumina de soro bovino (BSA), 1 µL da enzima *SmaI* (20U/*plug*). Esta solução foi incubado durante 24h.

Eletroforese: Após a digestão enzimática, os *plugs* foram submetidos à eletroforese em campo pulsátil, utilizando o equipamento CHEF-DR II (Bio Rad). Os *plugs* foram colocados em gel de agarose a 1,2% dissolvido em 100mL Tris-borato EDTA (tampão TBE) 0,5X. Colocou-se 1,900mL de tampão TBE na cuba de eletroforese e se ligou de modo a se atingir a temperatura ideal (14°C) antes de iniciar a corrida do gel, que foi realizada nas seguintes condições: Pulso inicial: 2 segundos, pulso final: 30s, voltagem: 6V/cm, velocidade da bomba: 80, duração da corrida: 23h. O gel foi corado durante 15 minutos numa solução de

brometo de etídio a 5%. A revelação das bandas foi feita sob luz ultravioleta e a fotografia do gel foi armazenada (salva) em arquivo na extensão *tiff*.

Interpretação do perfil eletroforético: As imagens digitalizadas dos padrões de bandas obtidas, foram descarregadas num sistema computadorizado (software Gel Compar versão 4, Applied Maths). A interpretação dos isolados foi realizados seguindo os critérios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995). Tabela 4.

Tabela 3: Critérios para interpretação dos padrões de PFGE

Categories	Número de mutações	Número de bandas diferentes
Indistinguível	0	0
Relacionado	1	1-3
Possivelmente relacionado	2	4-6
Diferente	≥3	≥7

Estas técnicas foram realizadas seguindo os protocolos padronizados no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM).

7. 13. 3 Análise genética (MLST)

Um ou mais isolados representativos cada padrão obtido no PFGE, foram selecionados e submetidos a técnica de MLST. Os genes foram amplificados por PCR utilizando *primers* descritos por Enright *et al.*, 1998, para os genes conservados “*house-keeping*” (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP* *spi*, *xpt* e *ddl*). Tabela 5.

Foi feita uma cultura primaria das bactérias. Após 24h de crescimento, as colônias foram cultivadas novamente em agar sangue. Uma reação de PCR para identificar a presença dos sete genes em cada amostra foi realizada de acordo com o portocolo de MLST (www.mlst.net). Sendo que para extração do DNA, 10 colônias foram colocadas num tubo contendo 100µl de água pura, e aquecido a 90°C durante 15 minutos. A reação de amplificação foi realizada

com 12,5 µl de Taq polimerase (supermix-PRODIMOL), 1µl de cada *primer aroE, gdh, gki, recP spi, xpt e ddl* (de ambas as direções *forward e reverse*) e 8,5µl de água. À esta mistura foi acrescentada 2µl de DNA, sendo utilizada as seguintes condições de amplificação: 94°C e 3 minutos, 30 ciclos de (94°C e 30 segundos, 50°C 45 segundos, 70°C 2 minutos), 70°C 10 minutos e 4°C para extensão final.

Para confirmar a amplificação, dois microlitros do produto amplificado foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% durante 30 minutos e corados com brometo de etídio e visualizados com iluminação ultravioleta num sistema de documentação de gel (Gel Doc; Bio-Rad). Os testes foram considerados positivos se apenas uma banda (correspondente para cada gene analisado) estivesse presente, sendo: *aroE* - 405 pb, *gdh* - 459 pb, *gki* - 483 pb, *recP* - 448 pb, *spi* - 472 pb, *xpt* - 486 pb, *ddl* - 441pb.

Purificação e sequenciamento das amostras: Uma vez identificada a presença dos genes, o produto de PCR de cada gene específico foi purificado usando o reagente Al Aquick (Qiagen). Dois microlitros do produto purificados foram adicionado a um tubo contendo 5µL de mistura de PCR (2µL de *primer*, 0.75µL de tampão save money, 1µL de corante Big Dye e 1.25µL de água) para sequenciamento. As amostras foram amplificadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 1minuto a 96°C, 30 ciclos de 15 segundos a 96°C e 4minutos a 60°C. Após essa etapa, seguiu-se a precipitação do DNA com etanol; 40µL de isopropanol (65%) foram adicionados a cada tubo, depois centrifugado e descartado o sobrenadante, em seguida, 200µL de etanol (70%) foram acrescentados a cada tubo, novamente centrifugado, descartado o sobrenadante e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos (no escuro). Imediatamente antes de colocar as amostras no sequenciador procedeu-se a desnaturação; para tal, 10µL de formamida foram adicionados a cada tubo e desnaturado a 95°C por 5 minutos no termociclador, terminado esse tempo, as amostras foram colocadas no gelo ou freezer a -20°C durante 2 minutos. Retirados daqui foram colocadas no sequenciador (Applied Biosystems ABI 3100).

Análise e interpretação das sequências: As sequências (eletroferograma) obtidas foram editadas e alinhadas usando os *softwares* Bio Edit e Chromas (Chromas versão 2, beta 3). Os eletroferogramas foram depositados no banco de dados de MLST para obtenção dos valores alélicos e dos tipos de sequências (ST) correspondente. Os ST obtidos pelo MLST foram determinados com base na sequência dos alelos de cada um dos sete *loci* sequenciados, utilizando o *software* disponíveis na página *web* de MLST (<http://www.mlst.net>) para pneumococos. Para identificar a relação clonal entre cepas deste trabalho com de outras regiões geográficas, o perfil dos alelos dos isolados foi comparado com cepas de referências de pneumococo de outras regiões depositadas no banco de dados de MLST.

Tabela 4: Designação dos genes utilizados para sequenciamento

Genes (designação)	Sequência	(Pb)*
<i>aro E</i> (shiquimate desidrogenase)	5' GCCTTTGAGGCGACAGC 3'	405
<i>ddl</i> (d-alanina d-alanina ligase)	5' CACAACCAGCNAGCITTT 3'	441
<i>gdh</i> (glucose-6-fosfato desidrogenase)	5' GCTTGAGGTCCCATGIACTNCC 3'	459
<i>gki</i> (glucose quinase)	5' TCTCCCGCAGCTGACAC 3'	483
<i>recP</i> (transquetolase)	5' GCCAACTCAGGTCATCCAGG 3'	448
<i>spi</i> (sinal peptidase)	5' GTGATTGGCCAGAAGCGGAA 3'	472
<i>xpt</i> (xantina fosforribosiltransferase)	5' AGATCTGCCTCCTTAAATAC 3'	486

* Pb: Pares de base

7. 14 Análises estatísticas

Como referido anteriormente, isolados analisados neste trabalho são proveniente de pacientes atendidos durante uma vigilância de infecções bacterianas invasivas. Do total dos pneumococos identificados, os isolados viáveis foram sorotipados. Para selecionar os isolados de sorotipo 1 e 5 que seriam genotipados, o total dos sorotipos 1 e 5, foram divididos em dois grupos de forma randomica (tendo em conta as variáveis clínicas, demográficas e epidemiológicas).

Em seguida nós testamos estatisticamente a homogeneidade entre esses dois grupos, e não encontramos nenhuma diferença estatística significativa entre eles.

O que assegurou a ausência de viés ou “*bias*” entre esses grupos ou seja: sorotipos 1 e 5 genotipados e não genotipados são estatisticamente iguais. (Tabela 7).

Os dados clínicos, demográficos e epidemiológicos foram armazenados em bases de dado no formato FoxPro (versão 2.6, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), posteriormente convertidos ao Software STATA 8.000 (StataCorp. 2003. Stata Statistical Software: Release 8.0 College Station, TX: Stata Corporation) para análise.

As variáveis de interesse foram analisadas (segundo a sua frequência e distribuição). A diferença entre duas ou mais proporções foi avaliada através do teste estatístico não paramétrico, teste exato de Fisher. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Para análise dos STs, as sequências das nossas amostras foram submetidas no banco de dados do MLST (<http://www.mlst.net>). Os STs gerados no nosso trabalho foram comparados com os depositados no banco, para ver a sua ocorrência e distribuição mundial, e também foram estratificados e analisados em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes, de modo a identificarmos algum fator que se relacionasse com a clonalidade das cepas estudadas.

8. RESULTADOS

8.1 Distribuição anual dos sorotipos de pneumococo isolados de DPI.

Durante o período do estudo de 01 de Janeiro de 2002 até 31 de Dezembro de 2007, foram internadas 27.005 crianças menores de 15 anos dos quais 23.313 realizaram hemoculturas ou punção lombar. Foram identificados 449 pneumococos invasivos, destes 419 foram isolados de casos com bacteremia, e 30 de casos de meningite dos quais 24 foram isolados pneumococos no sangue (mas apenas classificados como meningite). Dos 449 pneumococos identificados, 353 isolados viáveis foram sorotipados. Deste 38% (134) foram sorotipo 1 e 5 e 62% (219) outros sorotipos (Figura 11).

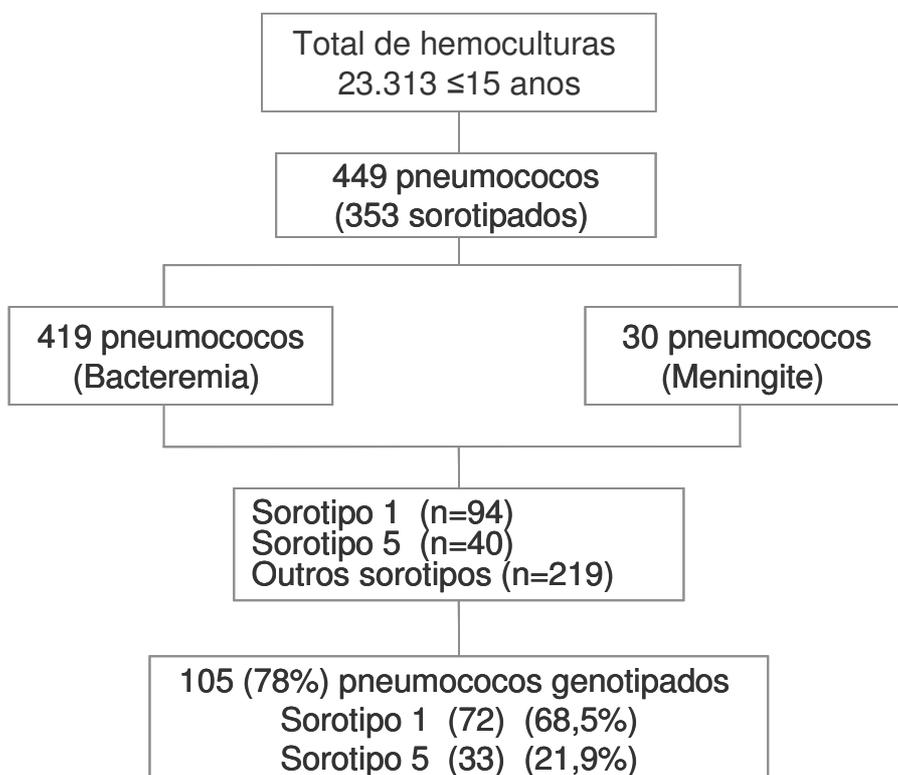
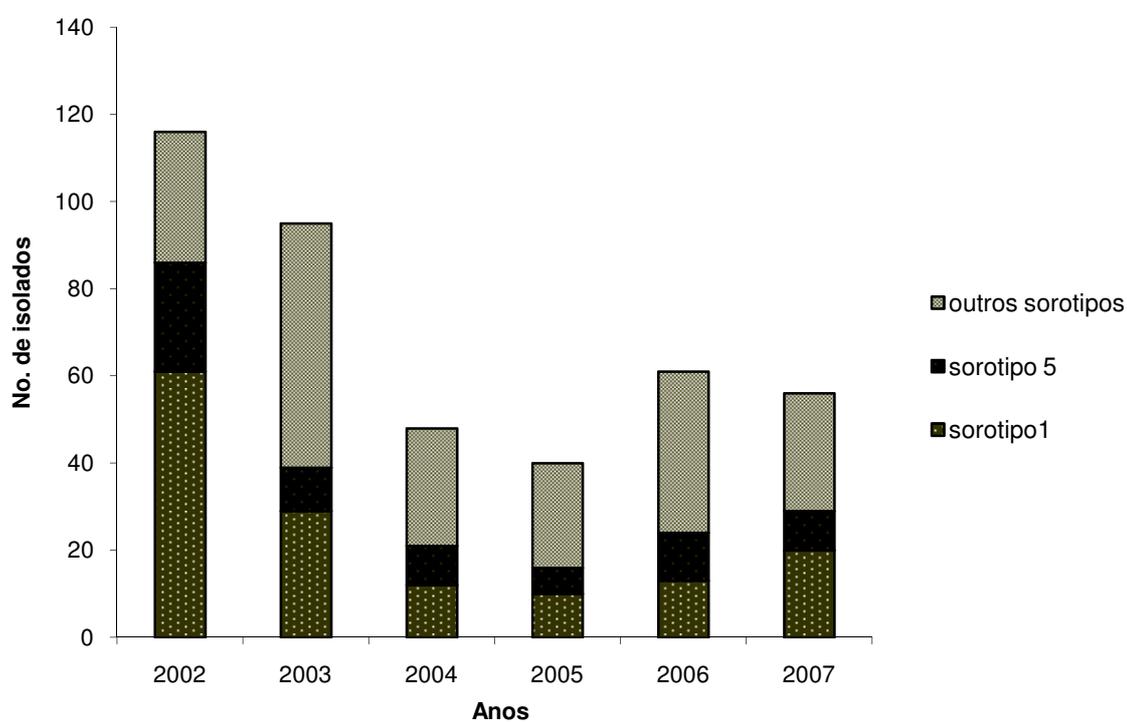


Figura 11: Fluxograma do estudo

A distribuição dos principais sorotipos e a respectiva frequência dos isolados foi a seguinte: 1 (94), 5 (40), 14 (36), 23F (19), 6A/B (64), 4 (12), 9V (11), 19A(12), 29 (5), 10F (4), 19F (7), 24F (4), 22F (3), 2 (3), 9L (3), 19B (3), 12F (3). O número de isolados e a distribuição dos sorotipos estão apresentados no gráfico 1.

Gráfico 1: Distribuição de sorotipos de *S. pneumoniae* isolados de DPI no período de 2002 a 2007



8.2 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com DPI

As principais características clínicas e epidemiológicas das crianças internadas por DPI, e o respectivo valor da probabilidade (p) encontrado, estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Características clínicas e epidemiológicas das crianças com DPI internadas no Hospital Distrital de Manhica entre Janeiro de 2002 a Dezembro de 2007

Características	Sorotipos 1 e 5 N=134		Outros sorotipos N=219		p-valor
	n	(%)	n	(%)	
Idade (meses)					
< 12	22	(23,7)	100	(47,7)	<0,001
12 – 23	16	(17,2)	66	(30,1)	
24 – 59	28	(30,1)	41	(18,1)	
≥ 59	27	(29,0)	12	(5,5)	
Gênero					
Masculino	73	(54,5)	132	(60,3)	0,284
Feminino	61	(45,5)	87	(39,7)	
Apresentação clínica					
Bacteremia	122	(91,0)	203	(92,7)	0,578
Meningite	12	(9,0)	16	(7,3)	
Pneumonia					
Grave	90	(67,2)	108	(49,3)	0,001
Não grave	44	(32,8)	111	(50,7)	
Anemia					
Não anémicas	52	(38,8)	45	(20,5)	0,001
Anemia moderada	76	(56,7)	155	(70,8)	
Anemia grave (<15%)	6	(4,5)	19	(8,7)	
Desnutrição grave*					
Sim ($Z \leq -3$)	21	(16,7)	45	(24,9)	0,092
Não	105	(83,3)	136	(75,1)	
Desfecho clínico					
Alta	105	(78,4)	162	(74,0)	0,605
Óbito	14	(10,4)	30	(13,7)	
Outros**	15	(11,2)	27	(12,3)	

*Informação não disponível (não foi coletada) em alguns pacientes

**inclui transferências e abandono do Hospital; P calculado pelo Teste exato de Fisher

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação ao gênero ($p=0,284$), síndrome clínica ($p=0,578$) embora a bacteremia tenha sido a síndrome mais comum que a meningite, nem para a variável desfecho clínico ($p=0,65$), desnutrição ($p=0,092$) e idade das crianças estudadas ($p=0,162$). Porém, quando analisado os dois grupos (sorotipo 1 e 5 *versus* outros sorotipos) em relação à pneumonia clínica, observamos que as crianças acometidas por sorotipo 1 e 5 apresentaram maior gravidade da doença em relação a outras crianças ($p= 0,001$). Observamos também que 56,7% e 70,8% dos pacientes que adoeceram por sorotipos 1 e 5 e demais sorotipos respectivamente, apresentaram um quadro de anemia moderada, enquanto que 4,5% e 8,7% apresentaram anemia grave ($p= 0,001$).

Quando analisamos as diferenças entre os sorotipos 1 e 5 genotipados e não genotipados, observamos que não há diferenças estatísticas significativas entre as variáveis testadas, idade ($p=0,163$), gênero ($p=0,708$), apresentação clínica ($p=0,110$), anemia ($p=0,369$), desnutrição ($p=0,092$) e desfecho clínico ($p=0,948$). Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Em relação a co-morbidade entre DPI e malária (por *P. falciparum*), encontramos que do total dos pacientes com sorotipos 1 e 5, 26 (28,6%) das crianças foi confirmada a presença do formas assexuadas do parasita no diagnóstico de malária, enquanto que 63 (69,4%), apresentaram lâminas negativas para este diagnóstico.

Tabela 6. Características clínicas e epidemiológicas das crianças com DPI por sorotipo 1 e 5 genotipados e não genotipados, internadas no Hospital Distrital de Manhiça entre Janeiro de 2002 a Dezembro de 2007

Características	Sorotipos 1 e 5 genotipados		Sorotipos 1 e 5 não genotipados		p-valor
	(n)	(%)	(n)	(%)	
Idade (meses)					
< 12	21	(23,0)	12	(29,3)	0,163
12 – 23	16	(17,6)	13	(31,7)	
24 – 59	28	(30,8)	8	(19,5)	
≥ 59	26	(28,6)	8	(19,5)	
Gênero					
Masculino	53	(55,8)	21	(51,2)	0,708
Feminino	42	(44,2)	20	(48,8)	
Apresentação clínica					
Bacteremia	89	(93,7)	6	(14,6)	0,110
Meningite	6	(6,3)	35	(85,4)	
Anemia					
Não anemicas	38	(41,8)	13	(31,7)	0,369
Anemia moderada	50	(54,9)	25	(61,0)	
Anemia grave(<15%)	3	(3,3)	3	(7,3)	
Desnutrição grave					
Sim ($Z \leq -3$)	17	(18,7)	4	(9,8)	0,092
Não	70	(76,9)	33	(80,4)	
Desfecho clínico					
Alta	74	(77,9)	32	(78,0)	0,948
Óbito	10	(10,5)	5	(12,2)	
Outros**	11	(11,6)	4	(9,8)	

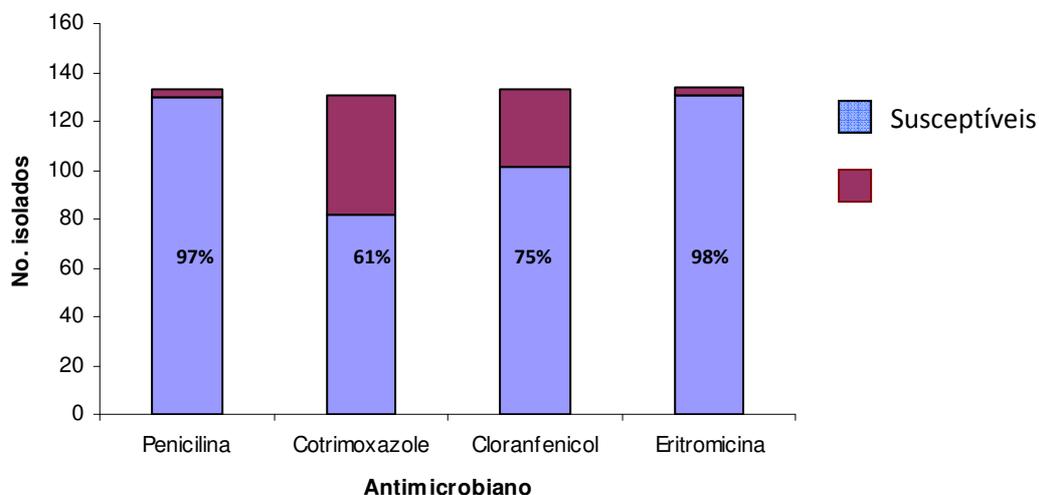
**inclui transferências e abandono do Hospital,
P calculado pelo Teste exato de Fisher

8.3 Perfil de Susceptibilidade dos sorotipos 1 e 5 isolados de DPI

De forma geral a susceptibilidade aos antimicrobianos testados foi alta. A percentagem de não susceptibilidade à penicilina (para isolados resistentes a oxacilina pelo método de disco difusão) para pneumococos isolados de casos de meningite (e também de bacteremia), foi de 3%, e tiveram um MIC \geq 0.125 μ g/mL, de acordo com *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2008) para *Streptococcus pneumoniae* isolados de líquido cefalorraquideo.

Contrariamente, encontramos uma taxa de não susceptibilidade à cotrimoxazole de 39%. Para eritromicina, 98% dos isolados foram susceptíveis enquanto que 25% dos nosso isolados foram resistentes à cloranfenicol, os resultados estão apresentados no gráfico 2. Quando comparamos o perfil de susceptibilidade em relação ao sorotipo, observamos que do total dos isolados testados, 51% foram não susceptíveis. Desse total 37% (49 isolados) são do sorotipo 1, e 14% (19 isolados) são do sorotipo 5.

Gráfico 2: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *S. pneumoniae* sorotipos 1 e 5 pelo método de disco difusão em agar (n=134)



8.4 Análise do perfil clonal do sorotipo 5

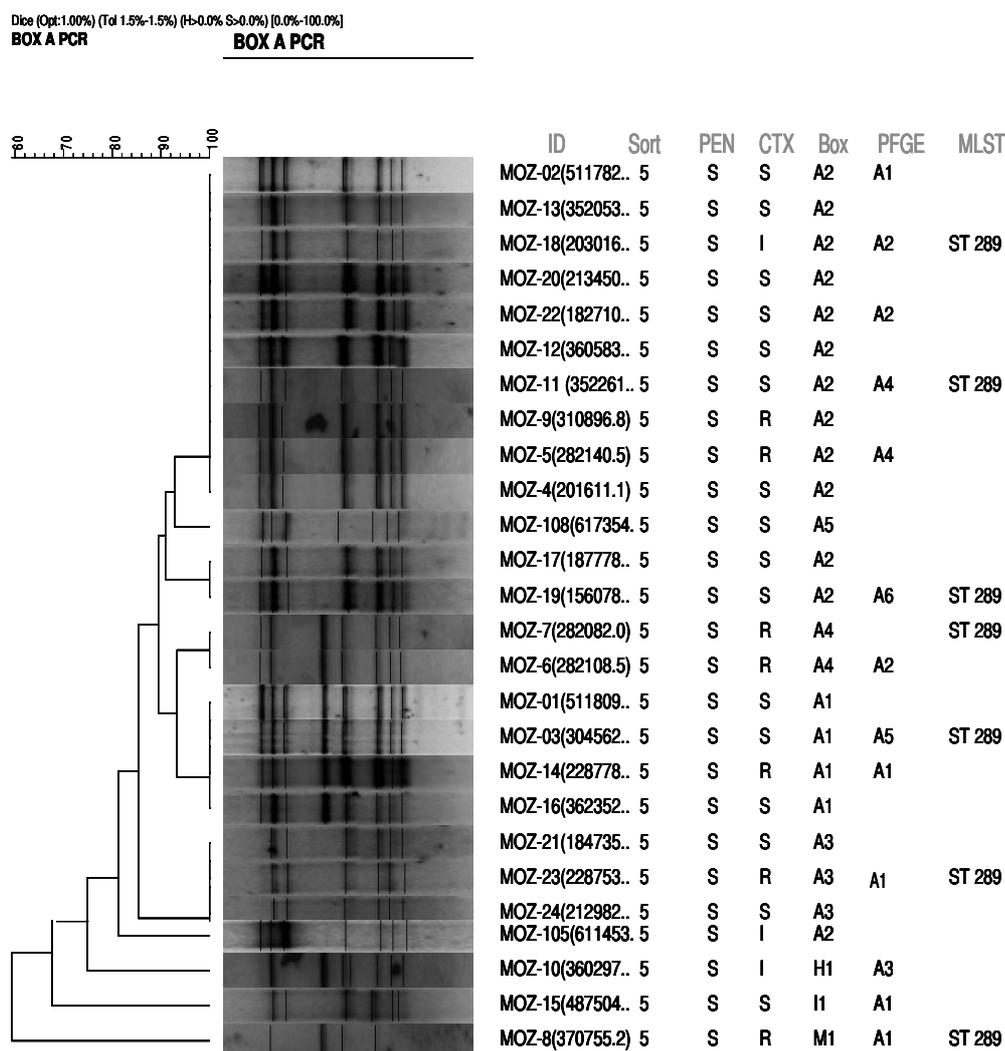
8.4.1 Box-PCR

Um total de 105 amostras (72 isolados de sorotipo 1 e 33 de sorotipo 5) foram submetidas a esta técnica e obtivemos os seguintes resultados: Para o sorotipo 5, identificamos um padrão clonal, denominado clone A com três subtipos; sendo A1 (4 isolados), A2 (13 isolados), A3 (3 isolados), quatro isolados foram definidos como não clonais (A5, H1, I1, M1) (Figura 12).

8.4.2 PFGE

Dos 33 isolados testados por BOX-PCR, 13 isolados representantes de cada um dos padrões identificados foram selecionados e genotipados por PFGE. Todos os isolados do sorotipo 5 foram agrupados em um mesmo clone (clone A) (Figura 12).

Figura 13. Dendrograma dos padrões do sorotipo 1 por Box-PCR, PFGE e MLST



8.5 Análise do perfil clonal do sorotipo 1

8.5.1 Box-PCR

Dos 105 isolados testados por BOX-PCR, os isolados do sorotipo 1 foram agrupados em 3 padrões clonais, sendo predominante o padrão B (58 isolados), padrão C e N com dois isolados cada. Um total de onze isolados foram não clonais, o clone B apresentou 20 sub-tipos, sendo o mais frequente o sub-tipo B1 com 20 amostras idênticas, seguido por B2, B6, B7 com 5 amostras idênticas cada um (Figura 13).

8.5.2 PFGE

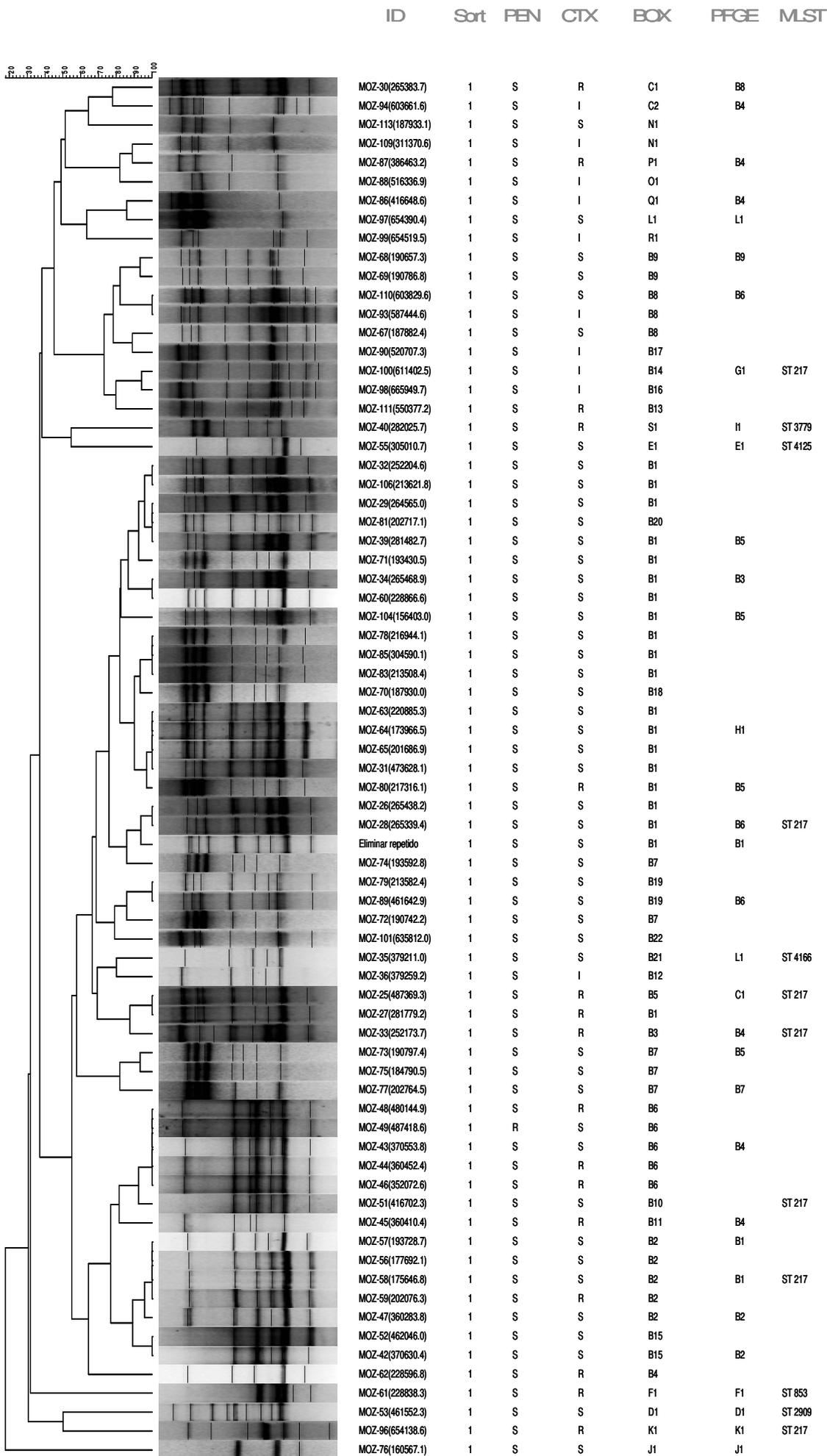
Um total de 33 isolados representantes de cada um dos padrões identificados por Box-PCR, foram submetidos a PFGE. Sendo que o clone B, 18 amostras confirmaram ser do mesmo perfil clonal, enquanto que 12 amostras demonstraram ser não clonais pelo PFGE. Das 11 amostras não clonais pelo Box-PCR, seis confirmaram ser não clonais, enquanto que duas amostras (P1 e Q1) apresentaram o mesmo perfil do clone B (sub-tipo B4), Figura 13.

Dist (Cpt:1.00% (Tot:1.5%-1.5%) (It:0.0% S:0.0%) (0.0%-100.0%))

BOX A PCR

BOX A PCR

Figura 14. Dendrograma dos padrões do sorotipo 1 por Box-PCR, PFGE e MLST



8.6 Análise do perfil clonal por MLST

Um total de 19 isolados, correspondente aos diferentes perfis identificados por BOX-PCR e PFGE foram selecionados e submetidos ao MLST. Desse total foram identificados sete tipos de sequências (ST). Sendo que o sorotipo 5 foi o mais homogêneo, sendo formado por um único ST, ST 289 (7 isolados). Enquanto que para o sorotipo 1 foram identificados seis ST diferentes, sendo: ST 217 (7 isolados) e ST853 (1 isolado) previamente descritos em outras regiões, e 4 novos STs (3779, 2909, 4125 e 4166) (Tabela 7). Foram identificados novos alelos neste trabalho para os genes *ddl* (1 isolado), *xpt* (2 isolado), e *gdh* (1 isolado).

Tabela 7: Distribuição do perfil alélico e ST dos sorotipos 1 e 5 identificados por MLST (n=19)

CLUSTER (PFGE)	Sorotipos	ST	Perfil alélico dos genes							PMNE	
			<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>Gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>		
			Nº								
A	5	289	16	12	9	1	41	33	33	7	Columbia ⁵ -19
B	1	217	10	18	4	1	7	19	9	7	Sweden ¹ -27
F	1	853	16	13	4	18	6	108	14	1	
B	1	4166 ⁺	12	8	5	1	11	14	168	1	
S	1	3779 ⁺	2	5	4	12	17	142	14	1	
E	1	2909 ⁺	2	62	1	25	6	20	6	1	
D	1	4125 ⁺	2	9	54	5	6	288	1	1	

+: Novos ST.

9. DISCUSSÃO

Neste trabalho apresentamos a distribuição anual dos casos de DPI entre as crianças internadas no hospital distrital de Manhiça (Sul de Moçambique), a distribuição dos sorotipos e a caracterização molecular (genotípica) de *S. pneumoniae* de sorotipos 1 e 5 isolados durante seis anos de vigilância bacteriana invasiva entre Janeiro de 2002 a Dezembro de 2007. Os resultados apresentados mostram altas taxas da DPI em Moçambique causada principalmente pelos sorotipos 1 e 5. Resultados similares foram encontrados anteriormente em Moçambique por Valles *et al.*, 2006 e Roca, 2010 (comunicação oral). Os resultados deste trabalho são também similares aos já descritos em outros países africanos (Mudhune S & Wamae M, 2009; Cutts *et al.*, 2005, Bogaerts *et al.*, 1993), e em outras partes como em Israel e na América Latina (Porat *et al.*, 2001; Gamboa *et al.*, 2002). A diminuição desses sorotipos em 2003, pode ser atribuída a flutuação da ocorrência dos sorotipos, uma vez que a partir de 2004 à 2007, os sorotipos 1 e 5 voltaram a aumentar.

Nesta casuística podemos observar que 34% e 58% das crianças são menores de 1 e 2 anos de idade respectivamente, estes achados são similares aos descritos em Moçambique (Roca *et al.*, 2006) e outras regiões africanas (O'Denpsey *et al.*, 2006, Barkley *et al.*, 2005) onde apresentam taxas elevadas de DPI em crianças menores de 5 anos de idade, além de que essa faixa etária um fator de risco para aquisição de DPI. A frequência de DPI causada por outros sorotipos (não 1 e 5), pode dever-se ao fato de exposição desse sorotipos (por colonização), uma vez que os sorotipos 1 e 5 são raramente encontrados em eventos de colonização, causando apenas doença invasiva (Brueggemann *et al.*, 2003).

Em relação as formas da doença pneumocócica (meningite, ou bacteremia), bem como os sorotipos envolvido em cada uma das formas de apresentação da DPI, nossos resultados mostram que crianças acometidas por sorotipos 1 e 5, tendem a evoluir para pneumonia grave ($p < 0.001$). Este achados assemelham-se aos descritos por outros pesquisadores (Johnson *et al.*, 2010; McIntosh ED & Reinert RR, 2011). Apesar de a bacteremia ter sido mais frequente que a meningite, os poucos casos dessa doença registrados

neste trabalho podem ser devido ao fato de que a coleta de LCR não era realizado rotineiramente antes de 2006, o que pode ter subestimado os casos de meningites, com tudo esta síndrome sendo causada por sorotipos 1 e 5, já foram descritos na África (Traore *et al.*, 2009).

Neste trabalho a anemia foi comum entre os pacientes adoecidos por outros sorotipos ($p=0.001$). Um estudo realizado previamente em Moçambique demonstrou que pneumococo é o agente bacteriano mais frequente em crianças com diferentes graus de anemia (Bassat *et al.*, 2009), resultados similares foram também encontrados em outra parte da África (Were *et al.*, 2011), embora em ambos estudos não tenha sido referenciado os sorotipos de pneumococo envolvidos.

A taxa de desnutrição nesta população mostrou não estar correlacionada com o perfil de sorotipo da doença ($p=0.092$), este resultado contrasta com os achados desta região previamente publicados por Roca *et al.*, 2006 onde as crianças apresentavam um Z-score ≤ -3 ($p=0.019$). No seu trabalho Roca analisou o total de internamentos (DPI e outras bacteremias) o que de certa forma aumentara o seu tamanho amostral, enquanto que nós comparamos pacientes com DPI por sorotipo 1 e 5 *versus* outros sorotipos. Resultados similares ao de Roca foram também observados por Were *et al.*, 2011 mostrando que crianças com bacteremia apresentavam um índice de desnutrição elevado (Z-score de < -2).

Dos pacientes que adoeceram por sorotipos 1 e 5, cerca de 28,6% tinham malária, contra 69,4% que não tinham. A co-infecção entre malária e bacteremia é comum em países africanos endêmicos para malária. Dados sobre co-infecção entre bacteremia e *P. falciparum* publicados em Moçambique mostraram que cerca de 19% de crianças com pneumonia grave e 27% com pneumonia confirmada radiologicamente, apresentam malária clínica (Sigauque *et al.*, 2009), porém em ambas as crianças apresentavam uma baixa densidade parasitária. Um outro estudo mostrou que dentre os agentes etiológicos bacterianos identificados, *Streptococcus pneumoniae* foi o mais frequente nos pacientes com malária (Bassat *et al.*, 2009). Dados similares aos descritos por Sigauque *et al.* 2009, foram também encontrados em crianças atendidas com

malária num hospital em Kenia (Were *et al.*, 2011). Embora não se conheçam especificamente a relação entre essa co-infecção nem a sua patofisiologia, certo é que esses casos apresentam dificuldades no diagnóstico (por sobreposição dos sintomas), acarreta custos no tratamento (antimaláricos + antimicrobianos), dificuldade no manejo da doença e morbidade elevada.

A prevalência dos casos de *S. pneumoniae* susceptíveis à penicilina foi elevada (97%), dados semelhantes aos nossos foram previamente descritos em Moçambique por Valles *e col.*, 2006 e também no Mali (Campbell *et al.*, 2004). Porém estes resultados contrastam com os descritos na África do Sul onde isolados de pneumococo apresentam taxas elevadas de resistência à penicilina e cotrimoxazole (Liebowitz *et al.*, 2003), apesar deste ser vizinho de Moçambique e com intensa movimentação de pessoas entre os dois países (Nhacolo *et al.*, 2008). Nossos achados também diferem dos registrados na América Latina, na Argentina, México, Uruguai e Colômbia, a taxa de resistência à penicilina é de 16%, 20%, 21% e 25% respectivamente (Camargos *et al.*, 2006), e no Japão onde a taxa de resistência à penicilina foi de 22,8% (MIC \geq 2 μ g/mL) e 35% dos casos tiveram resistência intermediária a este antibiótico (Qin *et al.*, 2006). Normalmente taxas elevadas de resistência têm sido associadas ao consumo indiscriminado de antibióticos, principalmente nos países desenvolvidos na Europa e nos Estados Unidos (Linares *et al.*, 2010).

Em Moçambique a taxa de resistência à penicilina para pneumococo é considerada moderada (14%) (Roca *et al.*, 2006). Esta resistência muito provavelmente é atribuída a outros sorotipos, porque nos sorotipos 1 e 5 aqui estudados a resistência à penicilina foi identificada em apenas 3% dos isolados. Mandomando *e col.* 2010, descreveram a taxa de resistência de *S. pneumoniae* à cotrimoxazole de 50%. Nos isolados estudados encontramos uma alta resistência à cotrimoxazole (39%), o que nos leva a concluir que a taxa de resistência à este antibiótico está disseminada entre todos os sorotipo de pneumococo. Este antibiótico é comumente utilizado para tratamento de doença bacteriana não invasiva em pacientes não internados em Moçambique, fato que pode explicar este resultado.

Atualmente não está disponível nenhuma vacina pneumocócica em Moçambique. De acordo com dados produzidos anteriormente, mostrando elevada prevalência dos sorotipos 1 e 5, formulação de vacina contendo estes sorotipos seriam as mais recomendadas, dados obtidos de sorotipos mostram que 63% são cobertos pela PCV-decavalente enquanto 83% pela PCV-tridecavalente (Sigauque, 2012, comunicação oral). A PCV-tridecavalente será introduzida este ano em Moçambique. Contudo, vigilância após a introdução da vacina é necessário para monitorar possíveis fenômenos (substituição de sorotipos, surgimento e expansão de novos clones) que normalmente acontecem após a introdução dessas vacinas pneumocócicas (Hanage *et al.*, 2010; Brueggemann *et al.*, 2007).

Informações prévias sobre vigilância bacteriana, distribuição dos sorotipos e de clones circulantes, gerados ao longo do tempo antes e após a introdução das PCVs, são importantes, pois permitirão selecionar a melhor formulação da vacina para o local de estudo, e avaliar futuramente o impacto da vacina na estrutura genética da população bacteriana. Na África são escassos os estudos sobre a composição clonal dos isolados de *S. pneumoniae*, no advento da introdução de PCVs, faz-se necessário e indispensável a descrição prévia da composição clonal dos isolados de pneumoco.

O propósito deste trabalho foi de descrever a composição genética dos isolados invasivos de *S. pneumoniae* (sorotipos 1 e 5) em Moçambique antes da introdução e do uso massivo das PCVs nos programas rotineiros de imunização, utilizando BOX-PCR, PFGE e MLST como técnicas de tipagem recomendadas pela PMEN. A análise molecular dos isolados 1 e 5, mostraram maior variação por BOX-PCR, porém o perfil clonal por PFGE e MLST foi mais relacionado. Observações idênticas a esta, já foram descritas por vários autores (Hermans *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 2007; Obert *et al.*, 2007).

Entre os complexos clonais identificados neste trabalho, O complexo clonal ST 217 (sorotipo 1) e complexo clonal ST 289 (sorotipo 5), foram os mais predominantes em Moçambique. O ST 217 foi descrito em outros estudos, na África, Europa e Israel ((Burgemann *et al.*, 2003) sendo o de maior ocorrência (prevalente) e apontado como pertencente a uma linhagem de complexos

clonais hipervirulentos (dada as suas características de causar doença e letalidade), em ambos estudos este ST foi representado pelo sorotipo 1 e isolado de doença invasiva. O ST 217 esteve relacionado a surtos de meningites descritos na região do cinturão de meningite na África, o qual apresentou altíssima letalidade (Burgemann *et al.*, 2003, Leimkugel *et al.*, 2005).

Outro ST predominante entre nossos isolados foi o ST 289 (sorotipo 5). cepas de sorotipo 5 expressando este genótipos foram descritos previamente na Gâmbia (Antonio *et al.*, 2007), Egito, Niger, Brasil, Colômbia, Suíça e Polônia (www.mlst.net). O sorotipo 5 é um dos sorotipos prevalentes e invariavelmente invasivo na África. Embora não haja ainda relato de surtos por este sorotipo em países africano, surtos por este sorotipo são comum no Canadá (Romney *et al.*, 2008). Recentemente um surto causado por sorotipo 5 expressando o genótipo ST 289, foi descrito no Canadá (Vanderkooi *et al.*, 2011) tendo afectado a populações desabrigadas ou vivendo em condições precárias.

O perfil alélico dos ST 217 e 289 identificados neste estudo é similar ao descrito em outros locais (possuem a mesma composição alélica). E quando classificamos os nossos isolados segundo os complexos clonais descritos pelo PMNE, dos 43 clones atualmente identificados, o ST 217, expressando a cápsula do sorotipo 1, pertence ao clone Sweden¹-27 (ST 217), e o ST 289 (sorotipo 5), pertence ao clone Columbia⁵-19 (ST289) circulando na América Latina desde de 1994. Entretanto, esta é a primeira vez que descrevemos a composição clonal dos isolados de pneumococo em Moçambique, ambos ST frequentemente identificados ST 217 e ST 289, foram identificados em amostras do período de 2002 a 2007, sugerindo que estes clones já circulam e estão bem estabelecidos neste país.

Os sorotipos 1 e 5 apresentaram maior taxa de susceptibilidade à penicilina, entretanto o sorotipo 1 apresentou maior diversidade clonal quando comparado ao sorotipo 5 pelos três métodos de tipagem utilizados. Segundo alguns autores, isolados susceptíveis à penicilina tendem a ser não clonais em comparação com isolados não susceptíveis (MacGee *et al.*, 2001; Tomasz *et al.*, 1998), o que pode explicar a diversidade clonal encontrada para o sorotipo 1.

Porém essa hipótese não se aplica ao sorotipo 5, que apresentou o mesmo perfil de susceptibilidade, todavia revelou menor diversidade clonal (apenas um único ST, o ST 289). Com base nesses dados, presumimos que a variabilidade clonal pode estar relacionada com a propriedade intrínseca do sorotipo, premissa também sugerida por outros autores (Serrano *et al.*, 2005).

De forma geral, o sorotipo 1 apresentou maior taxa de resistência a outros antimicrobianos testados em relação ao sorotipo 5 (49 amostras vs 19), além de maior diversidade clonal. Resultados similares foram descritos em Portugal, onde isolados resistentes a antibióticos apresentavam maior diversidade clonal (Serrano *et al.*, 2004). Não foi encontrada nenhuma diferença entre o perfil de susceptibilidade e padrão eletroforético dos isolados.

Os sorotipo invasivos 1, 4, 7F, 9V, são clonalmente mais relacionados, enquanto que isolados não invasivos 6A, 6B, 14, 19F são normalmente mais diversos (Sandgren *et al.*, 2004). Este achados são contrários aos nossos resultados, que demonstraram maior diversidade clonal entre isolados de sorotipo 1 que do sorotipo 5 (apenas único ST) apesar de ambos serem isolados invasivos.

Neste trabalho identificamos quatro novos STs entre os isolados do sorotipo 1 respectivamente ST 3779, ST 4125, ST 6932 e ST 4166. O ST 3779 apresentou resistência à penicilina e cotrimoxazole, enquanto o ST 4125 somente a cotrimoxazole, por outro lado os STs 6932 e 4166 foram susceptíveis à todos antimicrobianos testados. Uma vez que o surgimento e a disseminação clonal de pneumococo tem sido associada a resistência antibiótica (Klugman *et al.*, 2002), estes genótipos encontrados podem ter surgido em resposta a este tipo de pressão selectiva. Contudo, variações na prevalência de sorotipos e genótipos podem surgir naturalmente sem que no entanto haja alguma pressão selectiva (antibiótica ou vacinal).

Neste trabalho identificamos dois novos alelos, o 142 e 288 no *locus xpt*. Um estudo publicado por Hanage *e col.* 2011, identificou um novo alelo (324) neste gene contendo uma longa sequência de inserção, medindo aproximadamente 1,7kb. Segundo o mesmo autor, estudos já demonstraram que fenômenos como inserção e ou deleção são frequentes neste *locus*,

sugerindo então que mutações possam ocorrer neste *locus* sem porém causar consequência para a sobrevivência da bactéria, todavia esse fenômeno nunca foi descrito em outros *locus*.

Nesse estudo identificamos os clones de dois sorotipos mais predominantes em Moçambique, entretanto já descritos na África, Europa e América. Essa informação é útil para avaliar o impacto da PCV futuramente. Embora não haja evidências de transformação capsular entre os isolados analisados no nosso estudo (isso pode dever-se a limitação dos sorotipos selecionados para este trabalho, porém o monitoramento deste fenômeno, tanto em isolados invasivos como nos de colonização antes de introdução da vacina) é de suma importância para identificar possíveis alterações genéticas que possam surgir após a implementação da vacina.

10. CONCLUSÃO

Segundo resultados encontrados neste trabalho poderemos concluir que:

1. A DPI por sorotipos 1 e 5 não difere da DPI de outros sorotipos quanto a idade, sexo, estado nutricional, co-infecção com malária e desfecho clínico da doença.
2. Crianças com pneumonia por sorotipos 1 e 5, tendem a desenvolver o quadro grave da doença quando comparado com outros sorotipos.
3. Os sorotipos 1 e 5 apresentam maior resistência a cotrimoxazole (39%), e elevada susceptibilidade à penicilina (97%) e eritromicina (98%).
4. O sorotipo 1 apresentou maior diversidade que o sorotipo 5, foram identificados 3 clones, sendo 79% dos isolados agrupados num único clone (B), 15% dos isolados foram não clonais por Box-PCR, 18% por PFGE, e por MLST as amostras foram agrupadas em 6 STs
5. Um total de 61% dos isolados do sorotipo 5 foram agrupado em um único clonal por Box-PCR, os quais foram posteriormente agrupados em um único clone por PFGE e MLST (ST 289).
6. Identificamos quatro novos STs (3779, 4125, 4166 e 2909) entre os isolados de sorotipo 1 analisados, correspondente aos anos 2003, 2004, 2005 e 2006 respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

ANTONIO, M. et al. Molecular epidemiology of pneumococci obtained from Gambian children aged 2-29 months with invasive pneumococcal disease during a trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine. **BMC Infect Dis**, v. 8, n. 81. p. 1471-1481. Jun 2008

APPLEBAUM, PC Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An Overview. **Clin Infect Dis**, v. 15, n.1, p. 77-83. 1992

AUSTRIAN, ROBERT. The Gram Stain and the Etiology Of Lobar Pneumonia, An Historical Note. **Bacteriol. Rev.** v. 24, n. 3, p. 261-65. Set 1960. Downloaded from <http://mibr.asm.org>

AUSTRIAN, ROBERT. The Pneumococcus at the Millennium: Not Down, Not Out. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 179, Suppl 2, p.338–41. 1999 Downloaded from <http://jid.oxfordjournals.org>

AUSTRIAN, ROBERT. A brief history of pneumococcal vaccines. **Drugs Aging 1999**; v. 15, Suppl 1, p.1-10. 1999

AYIEKO P.; ENGLISH M. Case management of childhood pneumonia in developing countries. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, n. 5, p. 432–40. Maio 2007

BASSAT, Q. et al. Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital. **Trop. Med. and International Health** v. 14, n. 9, p. 1011–1019, Jun. 2009

BAROCCHI, MA. et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 8, n. 103, p. 2857-2862. Fev. 2006

BERKLEY, JA. et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. **N Engl J Med** , v. 352, n. 1, p. 39-47. Jan. 2005

BLACK, RE. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, n. 9730, p. 1969-1987. Jan. 2010

BLACK, S. et al. Postlicensure surveillance for pneumococcal invasive disease after use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Northern California Kaiser Permanente. *Pediatr Infect Dis J*, v. 23, n.6, p. 485-489. Jun 2004.

BRATCHER, PE. et al. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology*, v. 156, (pt.2), p. 555-560. Fev. 2010

BRICKS, LF.; BEREZIN, EITAN. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases *Jornal de Pediatria Sociedade Brasileira de Pediatria* 0021-7557/06/82-03-Suppl/S67. Review. Jul. 2006

BRILES, DE. et al. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug Resist.* v. 3, n. 4, p. 401-408. 1997.

BRUEGGEMANN, AB. et al. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect. Dis*, v. 187, n.9, p. 1424-1432. Mai. 2003

BRUEGGEMANN, AB. et al. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* v. 3, n. 11, p. 11-168. Nov. 2007

CALIX, JJ. et al. A New Pneumococcal Serotype, 11E, Has a Variably Inactivated *wcjE* Gene. *J Infect Dis*.v. 202, n. 1, p. 29-38. Jul. 2010

CAMARGOS, P. et al. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America *paediatric respiratory reviews*.v. 7, n. 3, p. 209–214. Set. 2006

CAMPBELL, JD. et al. Invasive pneumococcal infections among hospitalized children in Bamako, Mali. *Pediatr Infect Dis J*, v. 23, n. 7, p. 642-649. Jul. 2004

Cherry, Feigin, Demmber, and Kaplan. Pneumococcal infection. *Pneumococcal Infection* 2004:1204-1258(5th,) 2004.

COFFEY, TJ. et al. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 73-83. Jan 1998

CORLESS, CE. et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*, v. 39, n. 4, p. 1553-1558. Abr. 2001

CUTTS, FT. et al. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* v. 365, n. 9479, p. 1139-1146. Jul. 2005

DAGAN, R. Antibiotic resistance and the potential impact of pneumococcal conjugate vaccines. *Commun. Dis Intell*, v. 27 Suppl S134-S142. 2003

ENRIGHT, MC.; SPRATT, BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, v. 144 (Pt 11), p. 3049-3060.

ESKOLA, J. et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med*, v. 344, n. 6, p. 403-409. Fev. 2001

ESKOLA, J, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children in Finland. *JAMA*, v. 268, n.16, p. 3323-3327. Dez. 1992.

FELMINGHAM, D. et al. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. *J Infect*, v. 55, n. 2, p. 111-8. 2007

FERRANDIZ, MJ. et al. Horizontal Transfer of *parC* and *gyrA* in Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 44, n. 4, p. 840-847. Abr. 2000

GAMBOA, L. et al. Dissemination of *Streptococcus pneumoniae* Clone Colombia¹⁹ 5- in Latin America. *J Clin Mic* v. 40, n.11, p. 3942-3950. Nov. 2002 .

GIANFALDONI, C. et al. *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infect Immun*, v. 75, n. 2, p. 1059-1062. Fev. 2007

GUINOVART, C. et al. Malaria in rural Mozambique. Part I: Children attending the outpatient clinic. *Malaria Journal*, v.7, n. 36. Fev. 2008

HAKENBECK, R. et al. Penicillin-Binding Proteins of Penicillin-Susceptible and Resistant Pneumococci: Immunological Relatedness of Altered Proteins and Changes in Peptides Carrying the 3-Lactam Binding Site. ***Antimicrobial Agents And Chemotherapy***, v. 30, n. 4, p. 553-558. Out. 1986

HALL, LC. Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*, ***J Clin Pathol***, v. 51, n. 4, p. 270-274. Abr. 1998

HANSMAN, D,; BULLEN, MM. A Resistant pneumococ. ***Lancet*** 1967:264-265

HANAGE, WP. et al. Evidence that pneumococcal serotype replacement in Massachusetts following conjugate vaccination is now complete. ***Epidemics***, v. 2, n. 2, p. 80-84. Jun. 2010

HANAGE, WP. et al. Clonal replacement among 19A *Streptococcus pneumoniae* in Massachusetts prior to 13 valent conjugate vaccination. ***Vaccine***, v. 29, n. 48, p. 8877– 8881. Nov. 2011

HARRINGTON, SM. et al. Genotypic analysis of invasive *Streptococcus pneumoniae* from Mali, Africa, by semiautomated repetitive-element PCR and pulsed-field gel electrophoresis. ***J Clin Microbiol***, v. 45, n.3, p. 707-714. Mar. 2007

HAUSDORFF, WP. et al. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. ***Clin.Infect.Dis***, v. 30, n.1, p. 122-140. Jan. 2000a

HAUSDORFF, WP. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. ***Clin.Infect.Dis***, v. 30, n. 1, p. 100-121. Jan. 2000b

HAUSDORFF, WP.; FEIKIN, DR.; KLUGMAN, KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. ***Lancet Infect Dis***, v. 5, n. 2, p. 83-93. Fev. 2005

HAUSDORFF, WP.; SIBER, G.; PARADISO, PR. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. ***Lancet*** , v. 357, n. 9260, p. 950-952. Mar. 2001.

HERMANS, PWM. et al., Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. ***J Clin Microbiol*** , v. 33, n.6 , p. 1606-12. Jun. 1995

HICKS, LA. et al. (2007). Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis.* v. 196, n. 9, p. 1346-54. Out. 2007

HILL, PC. et al. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in rural Gambian villages: a longitudinal study. *Clin Infect Dis*, v. 50, n. 11, p. 1468-1476. Jun 2010

IMOHL, M.; RALF RENE REINERT; MARK VAN DER LINDEN. Temporal Variations among Invasive Pneumococcal Disease Serotypes in Children and Adults in Germany (1992–2008) *International Journal of Microbiology*, v. 2010, 2010; Article ID 874189 .

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE) 2009 (<http://www.ine.gov.mz>) (acessado em 2010).

JACOBS, MR. et al. Emergence of Multiply Resistant Pneumococci. *N Engl J Med*; v. 299, n. 14, p. 735-740. Out. 1978

JOHNSON, HL. et al. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Med*, v. 7, n. 10, Out. 2010

JOKINEN, C. et. Incidence of community-acquired pneumonia in the population of four municipalities in eastern Finland. *Am. J Epidemiol.* v. 137, n. 9, p. 977-988. Mai. 1993

KELLNER, JD. et al. Progress in the prevention of pneumococcal infection. *CMAJ.* v. 173, n. 10, p. 1149-1151. Nov. 2005

KLUGMAN, KP. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, Suppl. S2, p. 1–5. Dez. 2002

KLUGMAN, KP. (2004) Vaccination: a novel approach to reduce antibiotic resistance. *Clin Infect Dis*, v. 39, n.5, p. 649-651. Set. 2004

KLUGMAN, KP. et al. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med*, v. 349, n. 14, p. 1341-1348. Out. 2003.

KO, AI. et al. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. ***Clin Infect.Dis.*** v. 30, n.1, p. 78-86. Jan. 2000

LEIMKUGEL, J. et al. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. ***J.Infect.Dis.***, v. 192, n.2, p, 192-199. Jul. 2005

LINARE, J. et al. Antibiotic Resistance and Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from Patients with Community-Acquired Pneumococcal Disease. ***Antimicrobial agents and chemotherapy***, v. 23, n. 4, p. 545-547. Abr. 1983

LINARES, J. et al. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. ***Clin Microbiol Infect***, v. 16, n. 5, p. 402-410. Mai. 2010.

MANDOMANDO, I. et al. Antimicrobial Drug Resistance Trends of Bacteremia Isolates in a Rural Hospital in Southern Mozambique. ***Am. J. Trop. Med. Hyg.*** v. 83, n. 1, p. 152–157. Fev. 2010

McCONNOCHIE, KM.; HALL, CB.; BARKER, WH. Lower respiratory tract illness in the first two years of life: epidemiologic patterns and costs in a suburban pediatric practice. ***Am. J Public Health***, v. 78, n. 1, p. 34-39. Jan. 1998

McGEE L. et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. ***J Clin Microbiol*** , v. 39, n.7, p. 2565-2571. Jul.2001

McINTOSH ED.; REINERT, RR. Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes. ***Expert Rev Vaccines***, v. 10, n. 1, p. 109-29. Jan 2011

MADHI SA. et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 on the disease spectrum of *Streptococcus pneumoniae* in South African children. ***Pediatr Infect Dis J*** , v. 19, n. 12, p. 1141-1147. Dez 2000

MAIDEN MC. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. ***Proc. Natl .Acad. Sci.U.S.A.***, v. 95, n. 6, p. 3140-3145. Mar. 1998

MANTESE, OC. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. *J Pediatr (Rio J)*. v. 85. n.1, p. 495-502. Jan. 2010

MINISTÉRIO DE ADMINISTRAÇÃO ESTATAL (MAE) 2005, Direção Nacional de Administração Local (<http://www.govnet.mz>) (Acessado em 2010)

MORAIS, L. et al. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 56, (pt. 9), p. 1181-1184. Set. 2010

MUDHUNE, S.; WAMAE, M. Report on invasive disease and meningitis due to *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* from the Network for Surveillance of Pneumococcal Disease in the East African Region. *Clin Infect Dis* 48 Suppl 2, S147-S152. Mar. 2002

MURRAY, PR et al, **Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY**: 9THed. pp.412-425. 2007

NHACOLO, AQ. et al. Levels and trends of demographic indices in southern rural Mozambique: evidence from demographic surveillance in Manhica district. *Bmc Public Health*, v. 6, n. 291. 1186/1471-2458-6-291. Nov 2006

OBARO, S. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccines for developing countries. *Expert. Rev. Vaccines*. v. 8, n.8, p. 1051-1061. Ago. 2009.

OBERT, CA et al. Assessment of molecular typing methods to determine invasiveness and to differentiate clones of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* v. 7, n.6, p. 708-716. Dez. 2007

O'BRIEN, KL. et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* , v. 374, n. 9693, p. 893-902. Set. 2009

O'DEMPSEY, TJ. et al. Pneumococcal disease among children in a rural area of west Africa. *Pediatr Infect Dis J*, v. 15, n. 5, p. 431-437. Mai. 1996

O Menezes, AP. et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine*. v. 29, n. 6, p. 1139-44. Fev. 2011

OOSTERHUIS-KAFEJA, F.; BEUTELS, P.; VAN DAMME, P. Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (1998-2006). *Vaccine* v. 25, n. 12, p. 2194-2212. Mar. 2007

PAI, R.; GERTZ, RE.; BEALL, B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* v. 44, n. 1, p. 124-131. Jan. 2006

PAI, R et al. Post vaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J. Infect. Dis.* v. 192, n. 11, p. 1988-1995. Dez. 2005

PARK, IH. et al. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, n. 4, p. 1225-1233. Abr. 2007

PELTON, SI. et al. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant *Pneumococcus* in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*, v.26, n. 6, p. 468-472. Jun. 2007

PMEN-Pneumococcal Molecular Epidemiology Network Criteria for Clones and Nomenclature (http://www.sph.emory.edu/PMEN/pmen_criteria.html)

PORAT, N.; TREFLER, R.; DAGAN, R. Persistence of two invasive *Streptococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in southern Israel. *J Clin Microbiol*, v. 39, n. 5, p. 1827-1832. Mai. 2001

PUUMALAINEN, T et al. Clinical case review: a method to improve identification of true clinical and radiographic pneumonia in children meeting the World Health Organization definition for pneumonia. *BMC Infect Dis*, v. 8, n. 95, Jul. 2008

QIN, L. et al. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F strains in Japan. *Epidemiol. Infect* , v. 134, n. 6, p. 1188-1194. Dez. 2006

REIS, JN. et al. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an urban slum community. *J Infect*, v. 57, n.3, p. 204-213. Set 2008

ROCA, A. et al. Surveillance of acute bacterial meningitis among children admitted to a district hospital in rural Mozambique. *Clin Infect Dis*, v. 48, Suppl 2, S172-S180. Mar. 2009

ROCA, A. et al. Invasive pneumococcal disease in children under 5 years of age in rural Mozambique. *Trop. Med Int. Health*, v. 11, n. 9, p. 1422-1431. Set. 2009

ROCA A. et al. Estimating the vaccine-preventable burden of hospitalized pneumonia among young Mozambican children. *Vaccine*, v. 28, n. 30, p. 4851-4857. Jul. 2010

ROMNEY, MG. et al. Large community outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 invasive infection in an impoverished, urban population. *Clin. Infect. Dis*, v. 47, n. 6, p. 768-774. Set. 2008

RUDAN, I. et al. Global estimate of the incidence of clinical pneumonia among children under five years of age. *Bull. World Health Organ*, v. 82, n. 12, p. 895-903. Dez. 2004

RUVISKY, RO. et al. Surveillance of invasive in *Streptococcus pneumoniae* in Argentina 1994–2007: Changes in serotype distribution, serotype coverage of pneumococcal conjugate vaccines and antibiotic resistance. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, v. 5, (2010) p. 263-269.

SACARLAL, J. et al. A 10 year study of the cause of death in children under 15 years in Manhica, Mozambique. *BMC Public Health*, v. 9, n. 67. doi:10.1186/1471-2458-9-67

SANDGREN, A. et al. Effect of Clonal and Serotype- Specific Properties on the Invasive Capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 189., n. 5, p. 189:785–96 Dez. 2004

SCOTT, JA. et al. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clin Infect Dis*, v. 22, n. 6, p. 973-981. Jun. 1996

SCOTT, JA. et al. Serotype distribution and prevalence of resistance to benzylpenicillin in three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. *Clin Infect Dis*, v. 27, n. 6, p. 1442-1450. Dez. 1998

SERRANO, I. et al. Characterization of the Genetic Lineages Responsible for Pneumococcal Invasive Disease in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 43, n. 4, p. 1706–1715. Abr. 2005

SIDIKOU, F. et al. Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas, Niger. *Emerg. Infect Dis*, v. 9, n. 11, p. 1486-1488. Nov. 2003

SIGAUQUE, B. et al. Severe pneumonia in Mozambican young children: clinical and radiological characteristics and risk factors. *J. Trop. Pediatr*, v. 55, n. 6, p. 379-387. Dez. 2009

SIGAUQUE, B. et al. Acute bacterial meningitis among children, in Manhica, a rural area in Southern Mozambique. *Acta Trop*, v. 105, n. 1, p. 21-27. Jan 2008

SMITH, AM.; KLUGMAN, KP. Alterations in PBP 1A essential-for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 42, n. 6, p. 1329-1333. Jan. 1998

STANHOPE, MJ. et al. Molecular Evolution Perspectives on Intraspecific Lateral DNA Transfer of Topoisomerase and Gyrase Loci in *Streptococcus pneumoniae*, with Implications for Fluoroquinolone Resistance Development and Spread. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 49, n. 10, p. 4315–4326. 2005

Tai, SS. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit Rev. Microbiol*, v. 32, n. 3, p. 139-153. 2006

TAMAYO, M. et al. Dissemination of a chloramphenicol- and tetracycline-resistant but penicillin-susceptible invasive clone of serotype 5 *Streptococcus pneumoniae* in Colombia. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 7, p. 2337-2342. Jul. 1999

TENOVER, FC. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 9, p. 2233-2239. Set. 1999

THIPENG, M. et al. Bacterial Meningitis in the United States, 1998–2007. *N Engl J Med*, v. 364, n. 21, p. 2016-25. Mai. 2011

TOMASZ, A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 24 *Suppl 1*, S85-S88.

TRAORE, Y. et al. Incidence, Seasonality, Age Distribution, and Mortality of Pneumococcal Meningitis in Burkina Faso and Togo. *Clinical Infectious Diseases* v. 48, n. supp. 2:S181–9. Mar. 2009

TUOMANEN, E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr.Opin.Microbiol*, v. 2, n.1, p. 35-39. Fev. 1999

ULLOA-GUTIERREZ, R. et al. Invasive pneumococcal disease in Costa Rican children: a seven year survey. *Pediatr Infect Dis J*, v. 22, n. 12, p. 1069-1074. Dez. 2003

USEN, S. et al. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the Western Region, The Gambia. *Pediatr Infect Dis J*, v. 17, n. 1, p. 23-28. Jan. 1998

VALLES, X. et al. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive and nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* among children in rural Mozambique. *Trop.Med.Int.Health*, v. 11, n. 3, p. 358-366.Mar. 2006

VAN BELKUM, A. et al. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol*, v. 34, n. 5, p. 1176-9.Mai. 1996

VANDERKOOI, OG. et al. Community-Based Outbreaks in Vulnerable Populations of Invasive Infections Caused by *Streptococcus pneumoniae* Serotypes 5 and 8 in Calgary, Canada. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12. 28547. doi:10.1371/journal.pone.0028547

WASFY, MO. et al. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis in Egypt, 1998-200. *J Antimicrob.Chemother*, v.55, n. 6, p. 958-964. Jun. 2005

WERE, T. et al. Bacteremia in Kenyan Children Presenting with Malaria. *J. Clin. Microbiol*, v. 49, n. 2, p. 671-676. Feb. 2011

WHITNEY, CG. et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl*, 1, 348 (18): 1737-46. Mai 2003

WHO. World Health Organization (2007) Weekly epidemiological report. www.who.int/wer, 23 Março 2007. No. 12, 2007, 82, 93-104. (Acessado em 2008).

WHO (1999) Clinical prediction of serious bacterial infections in young infants in developing countries. The WHO Young Infants Study Group. *et al.*, ***Pediatr Infect Dis J.* (1999) 18:S23–S31**

WILLIAMS, BG. *et al.* Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. ***Lancet Infect.Dis.*** v. 2, n. 1, p. 25-32. Jan 2002

WINN, W JR. *et al.* **Koneman's. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology.** 6Th, pp. 689-693. 2006.

WWW.mlst.net (<http://www.mlst.net>) (Acessado em 2010)

WWW.unaids.org (2005)/UNAIDS/WHO/AIDS (Acessado em 2010)

YARO, S. *et al.* Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. ***Clin.Infect.Dis.***, v. 43, n. 6, p. 693-700. Set. 2006

YOSHIOKA, CR. *et al.* Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. ***J Pediatr (Rio J)***, v.87, n. 1, p. 70-75, Jan-Feb. 2011

YOTHER, J. *et al.* Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. ***J Bacteriol***, v. 180, n. 8, p. 2093-2101. Abr. 1998

ZAR, HJ. Global paediatric pulmonology: out of Africa. ***Paediatr. Respir. Rev.*** 7 Suppl 1, S226-S228. 2006

ANEXO

ANEXO I: Inquérito de colecta de datos no OPD



DADOS DE INQUÉRITO

1. Lugar de consulta
2. Data do inquérito (dd/mm/aa) / /
3. Referido de outra triagem CISM (1=Sim, 2=Não)
Se Sim, número de inquérito de Triagem de referencia

DADOS DA CRIANÇA

4. Número de Estudo
5. Número de Identificação da criança (perm_id) --
6. Nome da Criança
7. Data de nascimento (dd/mm/aa) / /
8. Sexo (1=homem, 2=mulher)
9. Nome da Mãe
10. Nome do pai
11. Chefe agregado
12. Bairro/Povoação/Acampamento

MEDIDAS

13. Frequência respiratória (1 minuto)
14. Peso (Kg)
15. Temperatura axilar (° C)
16. Refere febre nas últimas 24 horas? (1=Sim, 2 =Não)

AMOSTRAS DE SANGUE

17. Tomou amostra de sangue (capilar e as duas lamínas) (1=Sim 2=Não)
18. Se Sim, colar NIDA e preencher a folha de amostras
19. Se Não colhida. (1=Sem criterios, 2=Resultados prévios < 24h, 3=Recusou, 4=Outro)
20. Se já tem resultados prévios, copiar o NIDA

DADOS CLÍNICOS DA DOENÇA ACTUAL

21. Febre (1=Sim, 2=Não. Nº de dias) •
22. Tosse (1=Sim, 2=Não. Nº de dias) •
23. Dificuldade ao respirar (1=Sim, 2=Não. Nº de dias) •
24. Diarreia (1=Sim, 2=Não. Nº de dias) •
25. Se Diarreia, Nº Fezes nas ultimas 24 horas
26. Se Diarreia, Características Fezes (1=Aquosas, 2= com sangue)
27. Vômitos (1=Sim, 2=Não. Nº de dias) •
28. Convulsões (1=Sim, 2=Não)

ANEXO II: Inquérito de colecta de dados no INPD



cism
centro de
investigação
em saúde de
manhiça

Centro de Investigação em Saúde de Manhiça
Inquérito De Internamento Pediátrico
SOP_HO_004_A03_v02_PT

1. Número de Estudo -
2. Número de identificação da criança (Perm ID.) - -
3. Data de hospitalização (dia/mês/ano) / /
4. Número de hospitalização
5. Número de Inquérito de Triagem

DADOS DA CRIANÇA.

6. Nome criança
7. Data Nascimento (dia/mês/ano) / /
8. Sexo (1=homem, 2=mulher)
9. Nome da mãe
10. Nome do pai
11. Nome chefe agregado
12. Bairro / Povoação / Acampamento

DADOS CLÍNICOS NO MOMENTO DA HOSPITALIZAÇÃO.

13. Febre (1=Sim, 2=Não, N° de dias) .
 14. Tosse (1=Sim, 2=Não, N° de dias) .
 15. Dificuldade respiratória (1=Sim, 2=Não)
 16. Diarreia (1=Sim, 2=Não, N° de dias) .
- *Se **Sim**, continuar com a pergunta 17, se **Não** passe para a pergunta 19.
17. N° fezes nas últimas 24 horas
 18. Características das fezes (1=Fezes aquosas, 2=Fezes com sangue)
 19. Vômitos (1=Sim, 2=Não, N° de dias) .
 20. A criança está fazendo o aleitamento materno? (1=Sim, 2=Não)
 21. Parou de chupar ou beber? (1=Sim, 2=Não)
 22. Parou de comer? (1=Sim, 2=Não, 3=N/A)
 23. Tem sangue na urina? (1=Sim, 2=Não, N° de dias) .
 24. Convulsões (1=Sim, 2=Não, N.º ataques últimas 24 h) .
 25. Outro(s) sintoma(s)

26. A criança foi anteriormente observada/tratada por esta doença?(1=Sim,2=Não)
- Se **Sim**, onde? (1=Triagem Pediatria com sistema de OPD do CISM, 2=B.Socorros do C.S.M, 3=Posto de Saúde, 4=Enfermeiro, 5=Vendedor ambulante, 6= Curandeiro, 7=Em casa, 8=Outro).

EXAME FÍSICO

27. Peso (Kg)
28. Temperatura axilar (°C)
29. Frequência respiratória (avaliar num minuto)
30. Frequência cardíaca (avaliar num minuto)
31. Fontanela (1=Normal, 2=Deprimida, 3=Tensa, 4=N/A)
32. Prega cutânea (1=Sim, 2= Não)
33. Desidratação (1=Não,2=Leve,3=Moderada,4=Grave)
34. Palidez (1=Sim, 2=Não)
35. Icterícia (1=Sim, 2=Não)
36. Edema (1=Sim, 2=Não)
37. Se sim localização (1=face, 2=Membros inferiores, 3=Generalizados, 4=outras)
38. Pele descamada (1=Sim, 2=Não)
39. Cabelo despigmentado / avermelhado (1=Sim, 2=Não)
40. Candidíase oral (1=Sim, 2=Não)
41. Linfonodos (1=Sim, 2=Não)
42. Se sim localização (1=cervical,2=Supraclavicular,3=axilar,4=inguinal, 5=outras)
43. Conjuntivite (1=Sim, 2=Não)
44. Ouvido supurativo (1=Sim, 2=Não)
45. Tiragem (1=Sim, 2=Não)
- *Se **Sim**, continuar com a pergunta 46, se **Não** passe para a pergunta 47.
46. Indicar tipo Tiragem (1=Intercostal, 2=Subcostal, 3=Ambos)
47. Adejo nasal (1=Sim, 2=Não)
48. Respiração profunda (1=Sim, 2=Não)
49. Crepitações / Sopros tubárico (1=Sim, 2=Não)
50. Sibilos / Roncos (1=Sim, 2=Não)
51. Galope (1=Sim, 2=Não)
52. Fígado palpável (1=Sim, 2=Não)
53. Baço palpável (1=Sim, 2=Não)
54. Rigidez da nuca (1=Sim, 2=Não)

EXAME NEUROLÓGICO

55. Geral (1=desperto, 2=sonolento, **3=agitado,4=inconsciente**)
56. Posição (**1=Decorticada, 2=Descerebrada**, 3=Normal)
57. Opistótonos (**1=Sim**, 2 =Não)
58. Resposta a dor(1=localiza dor, **2=reage e não localiza 3=sem resposta**)
59. Choro ou resposta verbal (1=normal, **2=anormal, 3=sem resposta**)
60. Movimentos dos olhos (1=dirigidos, **2=não dirigidos**)
61. A criança pode sentar? (1=Sim, **2=Não**, 3=N/A)
62. A criança busca o mamilo da mãe? (1=Sim, **2=Não**, 3=N/A)
63. Assinatura e CÓDIGO da pessoa a preencher o INQUÉRITO _____

EXAMES LABORATORIAIS E OUTRAS PROVAS COMPLEMENTARES.

* Colher 2 lâminas de **HTZ** e 1 **Capilar** se não colhidas previamente na Triagem, colher sangue para 1 "microtainer", para **glicémia** e **hemocultura** se tiver critérios.

64. Colhidas **as lâminas de sangue e capilar no ICD?**(1=Sim, 2=Não)

*Identificar as lâminas escrevendo o NIDA.

65. Se **Não** colhidas no ICD, razão: 1= Recusou
- 2= Colhidas na Triagem- NIDA
- 3= Outro. Especificar

66. Colhido o **microtainer?** (1=Sim, 2=Não)

67. Se **Não** colhido, razão: 1= Recusou,2= Outro. Especificar

Colher sangue para hemocultura em todas crianças que ficam internadas com: <24 Meses de idade ; ou com Alterações neurológicas; ou com temperatura axilar $\geq 39^{\circ}\text{c}$.

68. Colhido sangue para **Hemocultura?** (1=Sim, 2=Não)

69. Se **Não** colhido, razão: 1= Recusou, 2=Outro. Especificar

70. Número de NIDA (de Microtainer, hemocultura e Laminas) Colocar NIDA aqui) _____

Se colher outras amostras como LCR, urina, Fezes, Líquidos de paracentese, Toracocentese, articular, de abscessos, exsudado cervical ou amniótico, no momento de internamento ou na enfermaria, Favor de preencher a requisição própria e colar o 4 NIDAS: um na requisição, um na folha de controle, dois no frasco da amostra e enviar ao Laboratório.

71. Assinatura, código da pessoa a colher a mostras de internamento _____

A COMPLETAR NO MOMENTO DA ALTA

72. Comprimento / Altura (cm) |_|_|_|.|_|

RESULTADOS DE EXAMES COMPLEMENTARES

73. Parasitemia (0= NSE, 1=+, 2=++, 3=+++, 4=++++, 5=+++++, 6=Não feito) |_|

74. Hematócrito (%) |_|_|

75. Glicemia |_|_|_|.|_|

76. Unidades da glicemia (1=mg/dl, 2=mmol/l) |_|

77. Rx de tórax (1=Sim, 2=Não) |_|

78. Feito o teste de HIV? (1=Sim, 2=Não) |_|

79. Feita Punção Lombar? (1=Sim, 2=Não) |_|

80. Feita outras provas complementares (1=Sim, 2=Não) |_|

81. Feito Transfusão de Sangue? (1=Sim, 2=Não) |_|

82. Data de transfusão (dia/mês/ano) |_|/|_|/|_|

83. Motivo da transfusão 1=HTO<12 o Hb<5; 2=anemia descompensada/IC; 3=ambos |_|

84. Feito Tratamento Antimalarico? (1=Sim, 2=Não) |_|

85. Cloroquina (1=Sim, 2=Não) |_|

86. Fansidar (1=Sim, 2=Não) |_|

87. Amodiaquina (1=Sim, 2=Não) |_|

88. Quinina (1=Sim, 2=Não) |_|

89. Derivados de Artemisinina (1=Sim, 2=Não) |_|

90. Feito Tratamento Antibiótico? (1=Sim, 2=Não) |_|

91. Penicilina (1=Sim, 2=Não) |_|

92. Cotrimoxazol (1=Sim, 2=Não) |_|

93. Cloranfenicol (1=Sim, 2=Não) |_|

94. Aminoglicosídeos(ex/ gentamicina, kanamicina) (1=Sim, 2=Não) |_|

95. Ampicilinas /Amoxicilina (1=Sim, 2=Não) |_|

96. Macrolídeos (ex. Eritromicina) (1=Sim, 2=Não) |_|

97. Acido Nalidixico (1=Sim, 2=Não) |_|

98. Cefalosporinas (1=Sim, 2=Não) |_|

DADOS DA ALTA HOSPITALAR.

99. Diagnóstico Final 1----- |_|_|_|_|

100. Diagnóstico Final 2 ----- |_|_|_|_|

101. Diagnóstico Final 3 ----- |_|_|_|_|

102. Diagnóstico Final 4----- |_|_|_|_|

103. Resultado (1=Vivo, 2=Obito, 3=Abandono, 4=Transferido) |_|

104. Código, Assinatura e Data da Alta |_|_|_| _____ |_|_|/|_|_|/|_|_|

ANEXO III: Aprovação do comitê de bioética



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE

Ex^{mos} Senhores
Centro de Investigação
em Saúde da Manhica

Ref: 006/CNBS/02

Data: 03 de Março de 2003

Assunto: Parecer do Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) sobre o protocolo referente a carga de pneumonia.

Reunido no dia 27 de Fevereiro 2003 o Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou o protocolo com o seguinte título "**protocolo para determinação da carga de pneumonia e doença pneumocócica em crianças dos 0 a 23 meses no distrito de Manhica, Moçambique**" e, sobre o mesmo, somos a informar que não existe nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo. Assim, o CNBS dá a devida autorização para a sua realização.

Recomendamos que os investigadores mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.

Sem mais assunto de momento os nossos melhores cumprimentos.



Dr. João Manuel de Carvalho Fumane