



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CLONAL DOS *Streptococcus
pneumoniae* NÃO SUSCEPTÍVEIS A PENICILINA EM CASOS DE
MENINGITE**

MILENA SOARES DOS SANTOS

Salvador-Bahia-Brasil

2010

MILENA SOARES DOS SANTOS

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CLONAL DOS *Streptococcus pneumoniae* NÃO SUSCEPTÍVEIS A PENICILINA EM CASOS DE MENINGITE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, FIOCRUZ-BA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Joice Neves Reis Pedreira

Salvador
2010

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237a Santos, Milena Soares dos
Análise da composição clonal dos *streptococcus pneumoniae* não
susceptíveis a penicilina em casos de meningite [manuscrito] / Milena Soares
dos Santos. - 2010.
84f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2010.
Orientador: Prof. Dra. Joice Neves Reis Pedreira, Laboratório de ...

1. *Streptococcus Pneumoniae*. 2. Meningite. 3. Penicilina. 4. Clones.
I.Título.

CDU 616.981.21:577.182.22

Dedico este trabalho a meus pais, irmãos, amigos e familiares que me incentivaram e apoiaram durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ter me dado saúde, força e coragem durante toda a minha caminhada.
- À minha orientadora Dra. Joice Neves Reis Pedreira, pela participação na minha formação científica, pela oportunidade e por acreditar no meu potencial.
- A Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pela disponibilidade de equipamentos, espaço físico e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.
- A Dr. Albert Icsang Ko, pelo apoio e pela visão científica.
- À Dra. Leila Carvalho Campos, pela competência, apoio nos experimentos e trabalhos e em especial pela amizade conquistada.
- Aos amigos da equipe meningite Soraia Cordeiro, Jailton Azevedo, Mariela Leite, Diego Rodrigo, Vivian Galvão, Sara Lacerda, André Sylvani, Lorena Galvão, Tainara Queiroz e Renan Cardoso pela compreensão e colaboração durante todos os momentos.
- A minha amiga e companheira de todas as horas, Ana Paula de Oliveira Menezes, por tudo que me ensinou desde que ingressei no mundo científico, pela competência, dedicação e paciência que lhe são peculiares.
- Aos amigos que fizeram parte da equipe de meningite, Dra. Josilene Lima Borges e Diêgo Madureira, que deixaram marcados seus trabalhos e sua amizade.
- Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, que vivenciaram os momentos difíceis e vitoriosos, em especial Daniele Takahashi, Silvana Paz e Fernanda Albuquerque pelo auxílio durante os experimentos de seqüenciamento.
- À equipe do Hospital Couto Maia, em especial à Neide Oliveira, microbiologista do laboratório de análises clínicas, pelos anos de dedicação e colaboração que permitiram que este trabalho pudesse ser desenvolvido.
- Aos pacientes, que sem dúvida, sem esta cooperação, este estudo não poderia ser concretizado.
- À minha família, especialmente aos meus pais e irmãos, mestres da paciência e da vida.
- Às bibliotecárias do CPqGM, em especial Ana Maria Fiscina pelo apoio na organização e consultas bibliográficas.
- Ao Curso de Pós-Graduação pela disponibilidade e colaboração.
- Ao CPqGM pela estrutura física e pelos recursos que permitiram a realização deste trabalho.

"Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer o que quero. Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte, tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas, elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos."

(Clarice Lispector)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS	16
1.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS ENTRE <i>S.pneumoniae</i> DE DOENÇA INVASIVA	20
1.3 VACINAS PNEUMOCÓCICAS	21
1.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i> : ASPECTOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS	24
1.4.1 Fatores de Virulência	26
1.5 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 VIGILÂNCIA HOSPITALAR ATIVA	33
4.2 PERÍODO E LOCAL DO ESTUDO	33
4.3 COMITÊ DE ÉTICA	33
4.4 SELEÇÃO DOS PACIENTES/CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	34
4.5 COLETA DE DADOS	34
4.6 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA	34

4.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA	34
4.8 SOROTIPAGEM E TIPAGEM MOLECULAR POR BOX A PCR <i>FINGERPRINTING</i>	35
4.9 INTERPRETAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO A PARTIR DO BOX A PCR	36
4.10 ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSÁTIL (PFGE)	37
4.11 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)	37
4.12 CRITÉRIOS PARA DEFINIÇÃO E INCLUSÃO DOS ISOLADOS COMO CLONES GLOBAIS	38
4.13 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>PILI</i>	39
4.14 ANÁLISE DOS DADOS	39
5 RESULTADOS	42
5.1 VIGILÂNCIA ATIVA LABORATORIAL	42
5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS	43
5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DISTRIBUIÇÃO DE SOROTIPOS	46
5.4 TIPAGEM MOLECULAR	48
5.5 DETECÇÃO DE <i>pili</i>	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	65
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ANEXOS

I. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL COUTO MAIA	74
II. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CPQGM/FIOCRUZ	75
III. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	76
IV. CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA <i>S.pneumoniae</i>	80
V. VALORES ACEITÁVEIS PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA NO TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE CIM PARA <i>S.pneumoniae</i>	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Active Bacterial Core Surveillance
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CRIES	Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo b
HCM	Hospital Couto Maia
IPD	Invasive Pneumococcal Disease
MLST	Multilocus Sequence Typing
OMA	Otite Média Aguda
PCV-7	Pneumococcal Conjugant Vaccine 7- Valent
PCV-10	Pneumococcal Conjugant Vaccine 10- Valent
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PNSP	Pneumococo Não-Susceptível a Penicilina
PSP	Pneumococo Susceptível a Penicilina
PPV	Polissacharide Pneumococcal Vaccine (23-valente)
SIREVA	Sistema Regional de vacinas
SLV	Single Locus Variant
ST	<i>Sequence Type</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coloração de Gram de secreção respiratória, mostrando diplococos Gram positivos característicos de pneumococos e células polimorfonucleares (PMN).

Figura 2. Morfologia do *Streptococcus pneumoniae* em meio de Agar sangue, exibindo α -hemólise.

Figura 3: Microscopia Eletrônica do *Streptococcus pneumoniae* mostrando a Cápsula polissacarídica.

Figura 4. Microscopia eletrônica de pneumococo apresentando *pili*

Figura 5. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone A - ST66 (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

Figura 6. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone AV – ST177, 750 (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

Figura 7. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone GA – ST338 (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

Figura 8. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone FE– ST338 (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

Figura 9. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone N – ST741, 748, 750 (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

Figura 10. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina ST156 (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição anual dos casos de meningite pneumocócica com cultura de LCR positiva identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007, de acordo com susceptibilidade a penicilina do isolado (n=709)

Gráfico 2. Prevalência dos casos de meningite pneumocócica não-susceptíveis à penicilina por faixa etária identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007(n=135)

Gráfico 3. Incidência dos casos de meningite pneumocócica não-susceptíveis à penicilina (PNSP) identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007 (n=135)

Gráfico 4. Distribuição dos sorotipos dos casos de meningite pneumocócica não-susceptíveis à penicilina (PNSP) identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007 estratificados por faixa etária (n=135)

Gráfico 5. Distribuição Clonal dos sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* isolados de casos de meningite não-susceptíveis à penicilina em Salvador, Bahia (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência dos nucleotídeos utilizados no estudo para detecção de *pili*

Tabela 2. Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos casos de meningite pneumocócica não sensível e sensível a penicilina identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007

RESUMO

O *Streptococcus pneumoniae* permanece como principal causa de doenças infecciosas que conduzem a elevada morbi-mortalidade em todas as faixas etárias, principalmente nas crianças. Desde a década de 1990, a resistência antimicrobiana deste microrganismo tem aumentado mundialmente, representando mais de 30% de resistência à penicilina em todos os isolados de doença pneumocócica invasiva em algumas áreas geográficas. Neste estudo, relatamos os casos identificados através de uma vigilância ativa para a meningite bacteriana em Salvador, Bahia, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2007. Para avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados dos pacientes com meningite por *S.pneumoniae*, utilizamos a microdiluição em caldo e isolados com CIM de penicilina \geq 0.125 μ g/mL foram considerados como não-susceptíveis à penicilina (PNSP). A diversidade clonal foi estudada por Box-A PCR, PFGE e MLST e a distribuição de *pili* foi investigada em 133 amostras, selecionadas de forma aleatória em cada grupo clonal, através das técnicas de PCR e seqüenciamento do gene *rtrA*. Um total de 748 pacientes com meningite por *S.pneumoniae* foi identificado durante os 12 anos de vigilância. Foram encontrados 135 (19%) isolados de *S. pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina sendo que destes, 85 (63%) eram crianças <5 anos de idade e 28 (20,7%) dos pacientes apresentavam alguma doença precedendo a meningite. A incidência média anual de PNSP foi estimada em 2,47 por 100.000 habitantes para todas as faixas etárias, 1,69 casos/100.000 habitantes para crianças menores de 5 anos e 1,37 casos/100.000 habitantes para crianças menores de 1 ano. A taxa de letalidade obtida para todas as idades foi de 39,2%. Os sorotipos mais prevalentes entre os isolados de PNSP foram: 14 (46,7%; 63/135) 23F (17,8%; 24/135), 6B (14,8%; 20/135), 19F (8,1%; 11/135) e 19A (4,4%; 6 / 135). Os isolados do sorotipo 14 foram identificados como o grupo clonal predominante 32,6% (44/135) e foram caracterizados como ST66 e como ST156 com alta resistência à ceftriaxona. Os outros sorotipos apresentaram maior diversidade clonal e novos STs foram encontrados, entre outros sorogrupos. Foram detectados 22% (29/133) de isolados portadores de *pili*, independente de composição clonal ou perfil de resistência. Baseada na vacina pneumocócica conjugada 10-valente, prevista para ser implementada no Brasil este ano, esperamos 89% de proteção contra PNSP em crianças menores de 5 anos de idade. As alterações previstas na população pneumocócica, ao longo dos anos após a implementação desta vacina, ressaltam a importância do monitoramento através de vigilância ativa.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; meningite; não-susceptibilidade à penicilina; clones.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae remains an important cause of infectious diseases leading to high morbidity and mortality in all age groups, especially in children. Since the 1990s, resistance of this organism to penicillin has emerged worldwide accounting for >30% of all invasive pneumococcal isolates in some geographic areas. In this study, active surveillance for bacterial meningitis was performed from January 1996 to December 2007. Antimicrobial susceptibility testing used broth microdilution and isolates with penicillin MIC \geq 0.125 μ g/mL were considered penicillin non-susceptible. Clonal diversity was studied by Box-A PCR, PFGE and MLST and *pili* detection was determined by PCR and sequencing of *rlrA* gene. A total of 748 patients with pneumococcal meningitis were identified during 12 years of surveillance. We found 135 (19%) *S. pneumoniae* isolates to be penicillin-nonsusceptible, which 85 (63%) were children < 5 years age and 28 (20.7%) patients had previous acute illness. The annual incidence of PNSP was estimated to 2.47 per 100,000 for all age groups, 1.69 cases/100.000 population for children younger than 5 years, and 1.37 cases/100.000 inhabitants for children under 1 year. The case-fatality rate obtained for all ages was 39.2%. The most prevalent serotypes PNSP isolates were among the 14 (46.7%; 63/135), 23F (17.8%; 24/135), 6B (14.8%; 20/135), 19F (8.1%; 11/135) and 19A (4.4%; 6/135). Serotype 14 isolates were identified as the predominant clonal group [32.6% (44/135)] and were characterized as ST66 and as ST156 with high resistance to ceftriaxone. The other serotypes were more diverse and new ST's were found among others serogroups. We detected 22% (29/133) of *pili* positive among the isolates, independently of clonal patterns or susceptibility profile. Based on 10-valent pneumococcal vaccine, which will be implemented in Brazil in 2010, we expect 89% protection against PNSP in children < 5 years of age. Changes in the pneumococcal population over the coming years following implementation of this vaccine should be monitoring throughout active surveillance.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; meningitis; non susceptibility to penicillin; clones.

INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS

O *Streptococcus pneumoniae*, freqüentemente referido como pneumococo, encontrado como um patógeno comensal do trato respiratório superior permanece como uma importante causa de morbi-mortalidade em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento (ORTQVIST *et al.*, 2005; BAROCCHI *et al.*, 2006; BRICKS, *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006).

Esta bactéria foi descoberta por dois pesquisadores quase que simultaneamente, Sternberg em setembro de 1880 nos Estados Unidos e Pasteur em dezembro do mesmo ano na França, através do isolamento do microorganismo em ratos inoculados com saliva humana. Foi inicialmente nomeado como "*Micrococcus Pasteuri*, Sternberg". Após alguns anos, passou a ser chamado de *Streptococcus pneumoniae*, "*Streptococcus*" por apresentar pelo método do Gram a mesma estrutura dos estreptococos e "*pneumoniae*" por ser considerado agente etiológico da pneumonia. Foi relacionado com pneumonia, por Carl Friedländer em 1882 quando examinava cortes histológicos de pulmões de oito pacientes e logo depois outros pesquisadores relacionaram esse patógeno com outras patologias como meningite, artrite, bacteremia e sinusite (AUSTRIAN, 1985).

O pneumococo pode ser encontrado no trato respiratório superior de 15% dos adultos saudáveis e entre crianças que freqüentam creche, mais de 65% são colonizadas. Embora a colonização pneumocócica possa conduzir a doenças invasivas (por exemplo, meningite ou bacteremia). As principais

manifestações clínicas da infecção pneumocócica são infecções das mucosas aéreas, como a otite média aguda (OMA) (CDC, MMWR, 2000).

Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou 1,6 milhões de óbitos por ano devido à doença pneumocócica, incluindo de 0,7-1 milhão de crianças com menos de 5 anos de idade, sendo a maioria procedentes de países em desenvolvimento. A magnitude da doença em idosos nestes países é indefinida. Em países desenvolvidos, crianças <2 anos e idosos são os principais grupos acometidos por esta doença (WHO, 2007).

Além de ser o principal microrganismo responsável por causar pneumonia, o pneumococo é também o agente etiológico mais frequentemente envolvido em meningite bacteriana, doença pulmonar obstrutiva crônica e sepse (OBERT, *et al.*, 2007; BRAIDO *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos, a cada ano ocorrem milhares de casos de meningite, pneumonia, bacteremia e OMA. O número de casos de OMA em menores que 5 anos corresponde a 3.100.000 casos/ano, seguida de pneumonia (106.000-175.000 casos/ano), bacteremia (8.000 casos/ano) e meningite (2.000 casos/ano). Aproximadamente 12% do total de pacientes com doença pneumocócica invasiva (IPD) vão a óbito, mas, a taxa de letalidade é maior em idosos e pacientes com doenças precedentes (PLETZ *et al.*, 2008; CDC, MMWR, 2000).

Em populações americanas nativas, como a população Navajo, é comum encontrar altas taxas de doença respiratória aguda e em particular a doença pneumocócica. Estudos de vigilância realizada nesta população no período pré-vacinal revelam 7,7% (54/706) de casos de meningite entre crianças e adolescentes com idade até 18 anos. A maior taxa de incidência de

IPD foi observada entre crianças com idade de 6-11 meses (727 casos/100.000 habitantes) e a taxa de letalidade entre todos os casos foi de 1% (7/706), sendo 2 óbitos em crianças com meningite (O'BRIEN *et al.*, 2004).

Na Inglaterra, a incidência anual de meningite pneumocócica era de 0.92 casos/100.000 habitantes entre 1998 e 2002, aumentando para 1,04 casos/100.000 habitantes entre 2003 e 2005, representando um discreto aumento com tendência estatisticamente significativa. Quando estratificado por faixa etária, a doença foi mais comum em menores que 5 anos, com elevada incidência em crianças com idade de 2 a 11 meses (34,0 casos/100.000 habitantes). A taxa de letalidade foi de 12,6% para todas as idades e 25% para menores que 5 anos (JOHNSON *et al.*, 2007).

Em países como a Polônia, este agente é responsável por 20,9% dos casos reportados de meningite bacteriana, sendo a situação agravada pelo aparecimento e dispersão de cepas com resistência adquirida as várias classes de antimicrobianos (SKOCZYNSKA *et al.*, 2000; APPELBAUM, 2002).

Entre os países da América latina, dados da vigilância de base laboratorial estabelecida pelo Sistema Regional de Vacinas (SIREVA), revelam a pneumonia como patologia mais frequente (36,4%), seguida de meningite (35,7%), sepse/bacteremia (24%) e outras - incluindo artrite séptica, peritonite, celulite, osteomielite, abscesso - (3,9%) (CASTAÑEDA *et al.*, 2009).

No Brasil, é estimado que o pneumococo seja o principal agente de pneumonia em todas as faixas etárias. A alta taxa de incidência da meningite pneumocócica tem sido registrada em crianças menores que 1 ano e a resistência bacteriana tem aumentado progressivamente. Entre 1983 e 2003, o

número de casos de meningite causada por pneumococo foi 29.600 com 8.554 óbitos (BRICKS *et al.*, 2006; BRICKS *et al.*, 2002; Brasil, Ministério da Saúde).

Desde 1999, com a introdução da vacina conjugada para *Haemophilus influenzae* sorotipo b (Hib) no calendário vacinal do Brasil, o pneumococo persistiu como a segunda causa mais comum de meningite, com uma taxa de incidência de 10 casos/100.000 habitantes em crianças com mais de 1 ano de idade e com taxa de letalidade de 27,5% para a população total (BRANDILEONE *et al.*, 2003).

Em Salvador, a taxa de colonização corresponde a 36% dos indivíduos, sendo que crianças < 5 anos e aquelas em idade escolar tem risco maior de serem colonizadas. A prevalência de colonização diminui significativamente com o aumento da idade. A taxa de colonização para crianças <5 anos, indivíduos com 5 a 17 e maiores que 17 anos é de 66,6%; 45,3% e 16,2% respectivamente (REIS *et al.*, 2008). Um estudo de vigilância populacional, desenvolvido na mesma cidade, conduzido no período de 1995 a 1999, identificou uma incidência anual para meningite pneumocócica de 1,6 e 24,7 casos/100.000 pessoas-ano para todas as faixas etárias e crianças <5 anos respectivamente. A taxa de mortalidade foi de 42% para todos os pacientes e 60% para os menores que 5 anos (REIS *et al.*, 2002).

1.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS ENTRE *S.pneumoniae* DE DOENÇA INVASIVA

A meningite pneumocócica foi associada com taxas de mortalidade de 80-100% no período pré-antimicrobiano. Com a introdução da penicilina, estas

taxas reduziram para 30%. Contudo, nos últimos 40 anos o aumento da resistência à penicilina em *S. pneumoniae* tem sido reportado em muitas regiões do mundo ameaçando os avanços alcançados durante o período pós-antimicrobiano (TOMASZ, 1997; HEFRON, 1979; BREIMAN *et al.*, 1990; APPELBAUM, 1992).

O aumento da resistência pneumocócica se deve principalmente a dispersão de clones multirresistentes do patógeno (KLUNGMAN, 2002). A resistência à penicilina e a outros antibióticos β - lactâmicos está associada com modificações nos genes que codificam proteínas ligadoras de penicilina e enzimas envolvidas na síntese de peptidoglicano, que são moléculas alvo para os β -lactâmicos (BERGMANN *et al.*, 2004). Acredita-se que a aquisição destes determinantes de resistência por alguns clones ocorra por pressão seletiva devido ao consumo indiscriminado e extensivo de antibióticos (SADOWY *et al.*, 2007).

Na Itália, a taxa de resistência aos macrolídeos (30 a 40%) é uma das mais elevadas da região quando comparado com os países do sul europeu, havendo uma discrepância entre a taxa de resistência à penicilina, a qual é moderada, cerca de 10 a 12% (MARCHESE *et al.*, 2005; MONACO *et al.*, 2005). No Brasil, a resistência à penicilina emergiu rapidamente desde o surgimento do primeiro caso reportado em 1988 (de Souza Marques *et al.*, 1988). Estudos retrospectivos de coleção de cepas e vigilância de laboratórios de referência nacional demonstram um aumento de quase três vezes na freqüência de não-susceptibilidade à penicilina dos isolados clínicos testados. De 1993 a 2004, a freqüência de PNSP aumentou de 10,2 para 27,8%. Um significativo aumento foi observado em 1999 tanto para o nível intermediário

(12,4 a 22,0%) como para resistente (2,4 para 5,9%) (TEIXEIRA *et al.*, 1997; BRANDILEONE *et al.*, 2006; KERTESZ *et al.*, 1998). Em Salvador, a taxa de não susceptibilidade a penicilina para isolados de pacientes com meningite entre 1995 e 1999, era de 15%, com total susceptibilidade a cefotaxima. Resistência elevada foi encontrada para sulfametoxazol-trimetoprim (35%) e tetraciclina (28%) - considerando susceptibilidade intermediária e resistente - para os pacientes de todas as faixas etárias (REIS *et al.*, 2002).

1.3 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

São reconhecidos 92 sorotipos capsulares de pneumococos, desde o reconhecimento do sorotipo 6D em 2010 (BRATCHER *et al.*, 2009). Os vários sorotipos diferem em virulência, invasibilidade e habilidade para adquirir resistência às drogas e sua distribuição na população difere entre as faixas etárias (ROBINSON *et al.*, 2001).

Os principais sorotipos identificados em doença invasiva nos Estados Unidos, especialmente na população pediátrica, são os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, por isso, estes sorotipos foram selecionados para serem incluídos na vacina conjugada heptavalente (PLETZ *et al.*, 2008). Um limitado espectro de sorotipos parece ser responsável por causar doença pneumocócica invasiva nos países da América Latina, sendo mais frequentes os sorotipos 14 (28,9%), 6B (9,2%), 1 (7,5%), 5 (6,9%) e 18C e 19F (ambos 6,0%), todos presentes na vacina conjugada 10-valente (CASTAÑEDA *et al.*, 2009).

A vacina polissacarídica pneumocócica (PPV) compreende 23 dos sorotipos mais frequentes de *S.pneumoniae* e está disponível desde 1983 nos Estados Unidos. As recomendações desta vacina são para indivíduos > 2 anos que apresentem alguma doença de base e todos os indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos. A cobertura esperada para esta vacina era de 90% em indivíduos com 65 anos ou mais de idade e 60% para pessoas entre 18 e 64 anos. Em 2003, a cobertura alcançada foi de 64% para pessoas com 65 anos ou mais e somente 37% para aqueles com 18 a 64 anos com diabetes, um grupo com risco elevado para doença pneumocócica. Algumas medidas de reforço foram tomadas para melhorar a implementação da vacina (CDC, MMWR 1997).

No Brasil, foi implementada para os mesmos grupos, com proteção estimada em 86,2% para a população alvo (BRASIL, Ministério da Saúde, 2006). Em Salvador, a proteção oferecida pela vacina foi estimada em 85% entre os casos de meningite que foram causadas por sorotipos vacinais (REIS *et al*, 2002).

Em 2000, foi licenciada nos Estados Unidos, a vacina pneumocócica conjugada heptavalente (PCV-7), recomendada para crianças menores de dois anos, contendo sete sorotipos que são responsáveis por doença invasiva em crianças (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), incluindo os cinco sorotipos freqüentemente encontrados por serem altamente resistente às drogas ou à múltiplas drogas. A cobertura vacinal alcançou uma imunidade em rebanho entre 70 a 80%. Dados do - *Active Bacterial Core Surveillance* (ABC) permitem estimar os efeitos diretos da PCV-7 a partir da comparação entre os períodos pré-e pós-implementação da vacina. A incidência da IPD em 2004 reduziu 77%

em crianças <1 ano, 83% em crianças com 1 ano e 73% em crianças com 2 anos de idade. Estes dados demonstram a rápida redução de IPD na população alvo. A imunidade em rebanho também exibe benefícios para subgrupos com risco aumentado de IPD. Dados dos Estados Unidos revelam que a incidência de IPD em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) não vacinados obteve uma redução de 37% dos casos após a introdução da PCV-7 (JACOBS *et al.*, 2008; PLETZ *et al.*, 2008).

No Brasil, esta vacina foi introduzida em 2000 na rede de saúde privada. Em 2003, tornou-se disponível gratuitamente apenas para grupos especiais, não estando disponível no programa de imunizações vacinal do governo. Dados do SIREVA estimam a proteção vacinal para os casos de meningite em crianças com idade igual ou superior a 2 anos de 68,5% e para as vacinas 10-valente (acréscimo dos sorotipos 1,5 e 7F + PCV-7) e 13-valente (3, 6A e 19A + PCV-10) de 77,6% e 86 % de cobertura respectivamente (CASTAÑEDA *et al.*, 2009).

1.4 *Streptococcus pneumoniae*: ASPECTOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS

O *Streptococcus pneumoniae* é uma espécie constituída por cocos Gram positivos encapsulados com um diâmetro de 0,5-1,25 μm , que se dispõem aos pares ou em cadeias curtas. Quando se apresentam aos pares, as bordas adjacentes são achatadas e as externas lanceoladas, em formato de chama de vela (Figura 1).

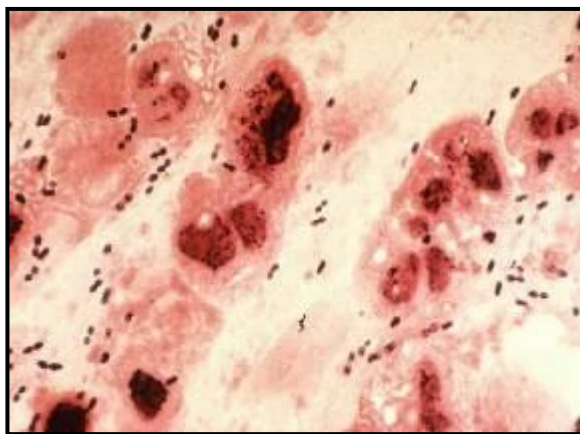


Figura 1. Coloração de Gram de secreção respiratória, mostrando diplococos Gram positivos característicos de pneumococos e células polimorfonucleares (PMN).

Fonte: www.bact.wisc.edu/.../S.pneumoniae1.jpg

Como as demais espécies do gênero *Streptococcus*, os pneumococos são anaeróbios facultativos, não produzem catalase, crescem bem em ágar sangue e as colônias são α -hemolíticas (Figura 2) (MURRAY *et al.*, 2007; BRAIDO *et al.*, 2008). A estrutura dos pneumococos é caracterizada por uma membrana celular com dupla camada lipídica coberta por uma parede bacteriana que consiste de peptidoglicano associado ao polissacarídeo C; este polissacarídeo é idêntico em todos os sorotipos da bactéria, induz anticorpos não-protetores e foi originalmente utilizado para identificar a proteína C-reativa no soro humano (TRABULSI e cols., 2008).

Os pneumococos são revestidos por uma cápsula polissacarídica que contribui para a virulência do patógeno e protege a bactéria da fagocitose (BRAIDO *et al.*, 2008).

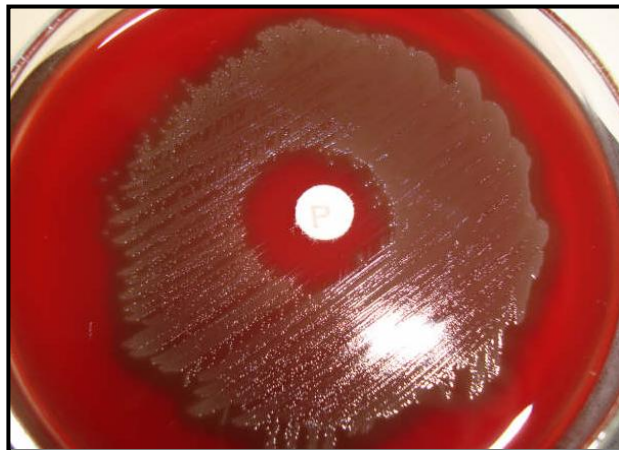


Figura 2. Morfologia do *Streptococcus pneumoniae* em meio de Agar sangue, exibindo α -hemólise.

Pneumococos não-encapsulados são considerados não-patogênicos (PLETZ *et al*, 2008). Desde o reconhecimento de um novo sorogrupo 6 sorotipo 6C, existem até o momento, 48 sorogrupos compreendendo 91 diferentes tipos de polissacarídeos capsulares identificando diferentes sorotipos (PARK *et al.*, 2007).

O pneumococo reside na mucosa do trato respiratório. Pode ser facilmente cultivado da nasofaringe de humanos. Embora a colonização possa ser assintomática, se o microorganismo obtém acesso para sítios normalmente estéreis das vias aéreas, pode evoluir para causar doença. A maioria das manifestações da doença pneumocócica inclui otite média aguda, que envolve infecção do ouvido médio e pneumonia que afeta as vias aéreas terminais. A bacteremia, associada com elevada morbidade e mortalidade, tipicamente ocorre como complicação de pneumonia ou menos freqüentemente, se o microorganismo se desloca diretamente do seu nicho na faringe. A transmissão ocorre entre humanos através do contato direto com as secreções ou dispersão de aerossóis por pessoas infectadas; ambos os indivíduos afetados pela

doença pneumocócica e portadores assintomáticos são contagiosos. Na maioria dos casos, uma vez adquirido, o contágio leva à colonização nasofaringeana que pode durar de semanas a meses (KADIOGLU *et al.*, 2008; BRAIDO *et al.*, 2008).

O padrão epidemiológico das infecções pneumocócicas é influenciado por vários fatores de risco importantes. Alguns são representados por déficit do sistema imune: congênitos ou adquiridos. Estes incluem anemia falciforme, HIV, neoplasia, asplenia, extremos de idade, imunodepressão ou terapias antiproliferativas. Muitas são patologias crônico-degenerativas, tais como, *diabetes mellitus*, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, doença pulmonar obstrutiva crônica, e outras patologias pulmonares e cardiovasculares, hepatopatias crônicas e todas as condições que causem danos à integridade da anatomia do trato respiratório, com redução da habilidade para remover secreções e agentes inalados (GARCIA *et al.*, 2006). Além disso, alguns fatores sócio-econômicos devem ser levados em consideração, tais como, ambientes lotados, desnutrição, condições sanitárias escassas e também outros fatores como história de alcoolismo e uso de drogas (BRAIDO *et al.*, 2008).

1.4.1 Fatores de Virulência

Uma série de fatores de virulência está envolvida nos mecanismos de patogênese das infecções causadas pelos pneumococos. A cápsula polissacarídica, a parede celular e várias proteínas localizadas na superfície da célula ou do citoplasma. Algumas destas estruturas estão representadas nas figuras 3 e 4.

Cápsula

É um polímero de alto peso molecular, composto de subunidades oligossacarídicas repetitivas, cada uma contendo de duas a oito moléculas. Tem a função de proteger a célula bacteriana da fagocitose e é considerada como o seu principal fator de virulência.

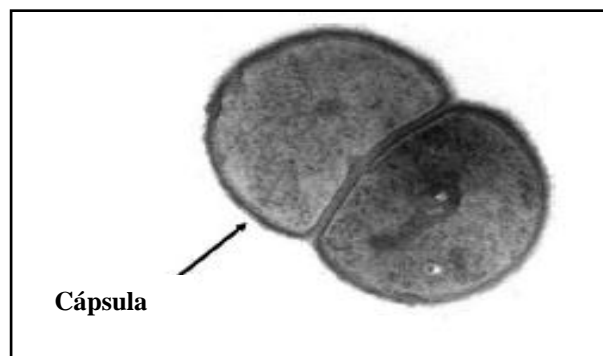


Figura 3: Microscopia Eletrônica do *Streptococcus pneumoniae* mostrando a cápsula polissacarídica.

Fonte: PLETZ MW *et al.*, 2008

Devido a sua diversidade antigênica estrutural, além de fator de virulência primário, é explorada como principal alvo nas reações sorológicas para a identificação e diferenciação dos sorotipos por meio de reações com anti-soros específicos. Uma das técnicas mais utilizadas é a de intumescimento capsular ou reação de *Quellung*. O polissacarídeo capsular de pneumococos é altamente imunogênico e é utilizado no preparo de vacinas, pois induz o desenvolvimento de anticorpos, que conferem proteção contra as infecções pneumocócicas invasivas (PLETZ *et al.*, 2008).

Pili

São longas organelas que se estendem através da cápsula polissacarídica, presente em algumas cepas de *S.pneumoniae* (Figura 4).

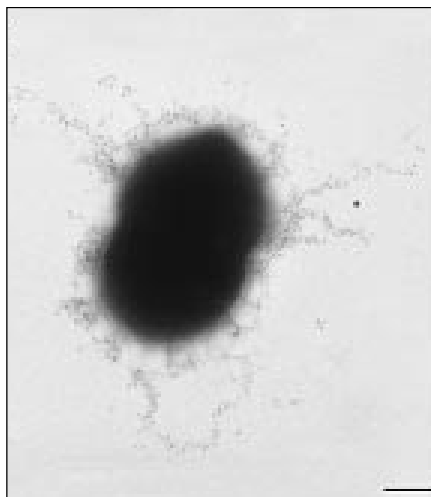


Figura 4: Microscopia eletrônica de pneumococo apresentando *pili*.
Fonte: BAROCCHI *et al.*, 2006.

Em modelo murino de infecção, o *pili* apresentou um importante papel na aderência do patógeno às células epiteliais do pulmão bem como no evento da colonização. Pneumococos piliados apresentaram maior virulência em comparação com não-piliados no desenvolvimento de infecção sistêmica, sugerindo que o *pilus* do pneumococo não somente contribui para aderência e virulência, mas também estimula a resposta inflamatória do hospedeiro (BAROCCHI *et al.*, 2006).

As estruturas que compõem o *pili* são elementos cromossômicos codificados pelo gene *rtrA*, definidos como uma “ilha” de patogenicidade (HEMSLEY *et al.*, 2003). Estudo desenvolvido a partir de uma coleção de isolados de *S.pneumoniae*, representados por diversidade capsular e genética, observaram a prevalência de *pili* em múltiplos isolados de diversas partes do mundo (30,6%; 130/424), associação entre isolados *pili* positivo e não susceptibilidade a penicilina e eritromicina (prevalência de 51% e 53%, respectivamente; $p < 0,001$) e variabilidade genética do pilus *rtrA*, sugerindo que este poderia se tornar um dos componentes para uma nova vacina conjugada

protéica contra o *S.pneumoniae*, conferindo proteção independente do sorotipo capsular (MOSCHIONI *et al.*, 2008)

1.5 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae*

As informações geradas através dos estudos de epidemiologia molecular dos *S.pneumoniae* são importantes, uma vez que permitem conhecer os tipos e subtipos genéticos circulantes, bem como identificar a presença de clones em uma determinada região em um período de tempo. Nas últimas décadas ocorreu a disseminação internacional de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina. O conhecimento de técnicas de tipagem molecular alcançado nos últimos anos tem permitido uma análise aprofundada dos mecanismos que levaram a este fenômeno, tornando-se importante estudar a estrutura populacional desta bactéria. O desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular possibilita elucidar diferentes aspectos da epidemiologia molecular dos pneumococos, com particular ênfase nos isolados resistentes aos agentes antimicrobianos. Para tal, são utilizadas várias estratégias recorrendo a um conjunto comum de técnicas de tipagem: sorotipagem, susceptibilidade a agentes antimicrobianos, eletroforese em campo pulsado (PFGE) e sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST). O conhecimento sobre as características moleculares das cepas circulantes bem como a sua frequência, diversidade e eventual substituição são fundamentais para o monitoramento das doenças pneumocócicas (BRANDILEONE *et al.* 1998, SÁ-LEAO *et al.* 2000, BRUEGGEMANN *et al.*, 2003)

2 JUSTIFICATIVA

Compreender as características epidemiológicas da doença pneumocócica dentro de uma população é importante para o desenho e avaliação de estratégias de prevenção. De particular importância, na era das vacinas conjugadas protéicas, é a distribuição dos sorotipos de pneumococos que causam doença e a distribuição na faixa etária da população afetada com doença pneumocócica (O'BRIEN, *et al*, 2004).

A dinâmica de sorotipos de pneumococos é particularmente importante hoje, devido às vacinas conjugadas disponíveis (heptavalente - PCV-7, que contempla os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) para crianças menores que 2 anos, que tem afetado dramaticamente a epidemiologia das doenças pneumocócicas nos Estados Unidos, onde ela é extensivamente utilizada (GHERARDI G, *et al*, 2007). De acordo com dados do Ministério da Saúde, a previsão para o nosso país é a implementação da vacina pneumocócica conjugada 10-valente, que inclui proteção contra os sorotipos 1, 5 e 7F (além dos sorotipos da PCV-7). A expectativa é que a vacina alcance cerca de 80% dos casos de doença pneumocócica. A análise do perfil genético dos isolados de pneumococos permite avaliar se há um padrão clonal circulando predominante ou se há diversidade molecular em uma população em um determinado período do tempo e se está relacionado com um sorotipo específico.

A emergência global de *S.pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos parece estar relacionada com um número limitado de clones e sorotipos, o que sugerem questões como: a predominância destes clones se deve à resistência

aos antimicrobianos através de pressão seletiva? Ou clones emergem devido a características intrínsecas de virulência, como a presença de *pili* e habilidade do patógeno em colonizar e induzir doença invasiva?

Nós propomos medir o impacto da meningite pneumocócica e determinar a composição clonal de cepas de *S.pneumoniae* isoladas de pacientes com meningite bacteriana, identificadas através do sistema de vigilância ativa das meningites implementado desde 1996, utilizando técnicas de referência para caracterização molecular investigando se clonalidade está associada aos fatores de virulência como sorotipo e *pili*.

3 OBJETIVOS

Geral:

Caracterizar através de ferramentas de epidemiologia molecular os casos de meningite pneumocócica não susceptível a penicilina identificados no Hospital Couto Maia no período de 1996 a 2007.

Específicos:

- Determinar a prevalência de *S. pneumoniae* resistente aos antimicrobianos de uso comunitário;
- Determinar a incidência de meningite pneumocócica para os casos de cepas não susceptíveis a penicilina;
- Identificar as características clínicas e demográficas dos casos de meningite pneumocócica não susceptível a penicilina identificados no estudo;
- Identificar os sorotipos associados à resistência antimicrobiana;
- Determinar a composição clonal do *S. pneumoniae* não susceptível a penicilina através dos métodos baseados em PFGE e MLST;
- Determinar a prevalência de *pili* nos principais grupos clonais causadores de meningite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 VIGILÂNCIA HOSPITALAR ATIVA

O sistema de vigilância ativa foi estabelecido em um hospital de referência para doenças infecciosas, Hospital Couto Maia (HCM), na cidade de Salvador, Bahia, responsável por mais de 95% dos casos notificados de meningite da região metropolitana de Salvador (Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, dados não publicados).

4.2 PERÍODO E LOCAL DO ESTUDO

Foram incluídos no estudo todos os casos de meningite pneumocócica com cultura de líquido positiva identificados no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2007. Os procedimentos microbiológicos de confirmação da identificação e tipagem molecular foram realizados nos Laboratórios de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) e de Biologia Molecular e Bioestatística (LEMB) localizados no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ).

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa do Hospital Couto Maia e do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Anexos I e II).

4.4 SELEÇÃO DOS PACIENTES/CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo todos os pacientes com meningite pneumocócica confirmada com cultura de LCR positiva para *S. pneumoniae* identificados pela

equipe do laboratório do HCM e que aceitaram participar do estudo através do termo de consentimento livre e esclarecido. (Anexo III).

4.5 COLETA DE DADOS

As informações clínicas e demográficas e evolução clínica foram obtidas através de entrevista e revisão de prontuários médicos realizadas por estudantes de iniciação científica treinados previamente.

4.6 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Os isolados identificados no HCM foram submetidos à confirmação da identificação após cultivo em meio ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro e incubados 18-24h em estufa com CO₂, através de teste de coloração de Gram, susceptibilidade à optoquina (cloridrato de etilhidrocupreína (BD – BBL Sensi-Disco Becton-Dickinson and Company, USA) e bile-solubilidade (Desoxicolato de sódio 10% - Sigma-Aldrich, Germany).

4.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

O método de Microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) capaz de inibir o crescimento bacteriano e avaliar o perfil de susceptibilidade de acordo com as recomendações do CLSI, 2008 (*Clinical Laboratory Standards Institute*) para dez antimicrobianos: penicilina, cefotaxima, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, vancomicina, rifampicina, ofloxacina e cloranfenicol. Isolados que apresentaram resistência intermediária à penicilina (CIM de 0,12-1,0 µg/mL) ou completa resistência à penicilina (CIM ≥ 2 µg/mL)

foram considerados como não susceptíveis à penicilina. Os critérios de interpretação de susceptibilidade para concentração inibitória mínima (CIM) para *S.pneumoniae* e os valores para teste de controle de qualidade utilizados durante o estudo, estão nos anexos IV e V.

4.8 SOROTIPAGEM E TIPAGEM MOLECULAR POR BOX A PCR FINGERPRINTING

As amostras foram sorotipadas através da reação de polimerase em cadeia multiplex (PCR), conforme descrito previamente (<http://www.cdc/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>), quando não foi possível concluir a sorotipagem as amostras foram enviadas ao CDC para tipagem com antisoros específicos através da reação de intumescimento capsular (Reação de *Quellung*). A análise de elementos repetitivos por BOX PCR é um método rápido e barato para tipagem molecular e tem sido previamente utilizado em investigações de surtos e colonização pneumocócica (HERMANS *et al.*, 1995; VAN BELKUN *et al.*, 1996; ERTUGRUL *et al.*, 1997; RODRIGUEZ-BARRADAS *et al.*, 1997; LALITHA *et al.*, 1999). Para a tipagem dos isolados por BOX A PCR, colônias com crescimento de 24h foram subcultivadas em meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA) suplementado com 5% de sangue de carneiro em estufa bacteriológica com 5% de CO₂ foram re-suspendidas e lavadas em PBS e reconstituídas em tampão de lise (Tris-HCl 10mM; 50mM de cloreto de potássio; 1,5mM MgCl₂ ; 0,01% gelatina; 0,01% polisorbato 20 e 0,5mg proteinase K/mL). A suspensão foi incubada a 55°C por 20 minutos, fervida por 15 minutos e centrifugada. Um volume de 50µL de mix para PCR foi preparado contendo: 5 µL do sobrenadante, 1µM de *primer* BOX A (5'-ATA CTC TTC GAA

AAT CTC TTC AAA C-3'), 200 μ M de cada dNTP, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2U de *Taq* DNA polimerase nativa em tampão próprio. As condições de amplificação do PCR foram: aquecimento 95°C por 7 minutos seguidos de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C 1 minuto, anelamento a 53°C 1 minuto e extensão a 65°C 16 minutos. A etapa de extensão final foi realizada a 65°C por 16 minutos. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (Tris- Acetato-EDTA) a 80 V por 2 horas. A visualização das bandas foi obtida a partir de coloração do gel com brometo de etídio e digitalizada sob luz ultravioleta e armazenada em arquivo do tipo *tiff*.

4.9 INTERPRETAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO A PARTIR DO BOX A PCR

O número de bandas idênticas e não-idênticas obtidas a partir da mobilidade eletroforética, foi comparado. Para cepas contendo número de bandas ≥ 7 , um padrão foi definido como clone (idêntico) se a análise do BOX A PCR de um número maior ou igual a 2 isolados, produziram o mesmo número de bandas com idêntica mobilidade eletroforética, sendo identificadas por uma letra. Foram definidas como relacionadas, as cepas que apresentaram até 3 bandas de diferença, e aqueles isolados que apresentaram 3 ou mais bandas de diferença foram definidos como um outro padrão avaliado através do perfil eletroforético, recebendo uma outra letra para sua identificação. Dentro de um grupo de padrões relacionados e não-idênticos, as cepas foram identificadas por um código alfa-numérico.

4.10 ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSÁTIL (PFGE)

A confirmação dos padrões clonais identificados por BOX A PCR foi realizada através de eletroforese em campo pulsátil - Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), onde fragmentos de DNA cromossômicos, gerados após digestão com a enzima *Sma*I, foram preparados e analisados como descrito previamente (LEFEVRE *et al.*, 1993). Para realização da eletroforese, utilizamos o equipamento CHEF DR II (Bio Rad). A interpretação dos isolados geneticamente relacionados foi realizada seguindo os critérios de Tenover (TENOVER *et al.*, 1995). Uma amostragem de cada clone identificado pelo PFGE foi submetida à técnica de tipagem por MLST.

4.11 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

Multilocus Sequence Typing (MLST) foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Enright *et al.*, 1998, com cepas representativas de cada grupo clonal definido por BOX A PCR e PFGE. As seqüências obtidas pelo MLST são determinadas com base na seqüência dos sete genes *house-keeping* (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*) do DNA cromossômico obtido dos isolados. As seqüências são submetidas *on line* para o banco de dados utilizando os softwares disponíveis no *site da web* para pneumococos (<http://www.mlst.net>). O perfil dos alelos dos isolados foi comparado com cepas de referências depositadas no banco de dados do MLST de pneumococos para identificação clonal com grupos que se disseminaram de outras áreas geográficas. Os clones foram estratificados e analisados conjuntamente com os dados clínicos e epidemiológicos para identificar fatores relacionados à clonalidade das cepas.

4.12 CRITÉRIOS PARA DEFINIÇÃO E INCLUSÃO DOS ISOLADOS COMO CLONES GLOBAIS

De acordo com os critérios estabelecidos pelo Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN), criado em 1997, com o objetivo de vigilância global de *Streptococcus pneumoniae* resistentes aos antibióticos e padronização de nomenclatura e classificação dos clones resistentes, um clone para ser determinado como novo e ser admitido na rede de vigilância deve preencher alguns critérios como:

- a) O clone deve ter ampla distribuição geográfica (isolado pelo menos em dois continentes);
- b) 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;
- c) Dados sobre o clone precisam ser publicados na imprensa, antes, da ratificação pela rede;
- d) Novos clones para serem considerados pela rede, precisam ser propostos na reunião anual do PMEN;
- e) Os clones devem ser disponibilizados à rede para análise e confirmação antes da aceitação para a rede;
- f) O clone deve ser disponibilizado para o depósito na coleção ATCC de clones e também estará disponível através do Laboratório de Referência *Streptococcus* na Alemanha e na Universidade Emory, em EUA (<http://www.sph.emory.edu/PMEN/index.html>).

4.13 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE *PILI*

A distribuição de *pili* foi investigada em 133 amostras, selecionadas aleatoriamente, entre um e sete isolados de cada grupo clonal, definido pelos métodos de BOX-A PCR e PFGE. A detecção do gene *rlr A*, foi realizada conforme protocolo descrito por Moschioni M *et al.*, 2008. O DNA cromossômico foi extraído e a reação de polimerase em cadeia foi realizada utilizando *primers* (Tabela 1) para detectar a presença e localização do operon nos isolados. A localização do operon genômico foi determinada simultaneamente por 4 reações de PCR: primeiro usando os primers 459 *forward* e 470 *reverse* marcando regiões dentro do operon; o segundo com os primers 459 *forward* e 1 *reverse*, marcando dentro da *islet*; a terceira e a quarta amplificação foram realizadas em regiões conservadas do operon (MOSCHIONI *et al.*, 2008).

4.14 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados clínicos, demográficos e epidemiológicos foram armazenados e analisados em um banco de dados criado utilizando EpiInfo Windows versão 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Uma amostragem dos isolados de pneumococos foram submetidos à análise de MLST, através de estudo alélico utilizando o site www.mlst.net (Imperial College and Wellcome Trust) como banco de dados para identificação dos *SequenceTypes* (STs). O banco de dados gerado foi então analisado quanto à distribuição de frequência das variáveis de interesse e à tabulação das principais comparações. Medidas de tendência central (média, mediana e moda) foram estimadas conforme a situação. A significância estatística das

diferenças entre duas ou mais proporções foi avaliada através do teste do Qui-quadrado. Foram considerados significativos estatisticamente aqueles resultados com $p < 0,05$ (bi-caudal).

Tabela 1. Seqüência dos nucleotídeos utilizados no estudo para detecção de *pili* em pneumococos.

Primer “for”	Seqüência 5'→3”	Primer “rev”	Seqüência 5'→3”	Objetivo
459 for	AACTGAATTGACACAACGTGTCTT	470 rev	GCCACACAAGATGTTGATGCTTTT	Detecção rlrA
459 for	AACTGAATTGACACAACGTGTCTT	P01 rev	AGCGACAAGCCACTGTATCATAT	Detecção rlrA
P01 for	ACTTTCTAATGAGTTGTTTAGGCG	P01 rev	AGCGACAAGCCACTGTATCATAT	Sequenciamento rlrA
P02 for	CTGGTCGATAACTCCTTCAATCTT	P02 rev	GTACGACAAAAGTGTGGCTTGTT	Detecção e sequenciamento rlrA
P03 for	GAATGCGATATTCAGGACCAACTA	P03 rev	ATCTCACTGAGTTAATCCGTTTAC	Sequenciamento rlrA
P04 for	TGTATACAAGTGTGTCATTGCCAG	P04 ver	CATCTTCACCTGTTCTCACATTTT	Sequenciamento rlrA
P05 for	GCGGTCTTTAGTCTTCAAAAACA	P05 ver	CAAGAGAAAAACACAGAGCCAT	Sequenciamento rlrA
P06 for	TTGCTTAAGTAAGAGAGAAAGGAGC	P06 rev	CAGGAGTATAGTGTCCGCTTTCTT	Sequenciamento rlrA
P07 for	GGCAATGTTGACTTTATGAAGGTG	P07 rev	TATCAGCATCCCTTTATCTTCAAA	Sequenciamento rlrA
P08 for	TGAGATTTTCTCGTTTCTCTTAGC	P08 rev	AATAGACGATGGGTATTGATCAT	Detecção e sequenciamento rlrA
P09 for	CCGACGAACTTTGATGATTTATTG	P09 rev	ACCAACAGACGATGACTGTTAAT	Sequenciamento rlrA
P10 for	AATGACTTTGAGCCTGTCTTGAT	P10 rev	TTCTACAATTTCTGGCCATTATC	Sequenciamento rlrA
P11 for	GCCATTTGGATCAGCTAAAAGTT	P11 rev	TTTTTCAACCCACTACAGTTGACA	Sequenciamento rlrA

(Adaptado de MOSCHIONI *et al.*, 2008).

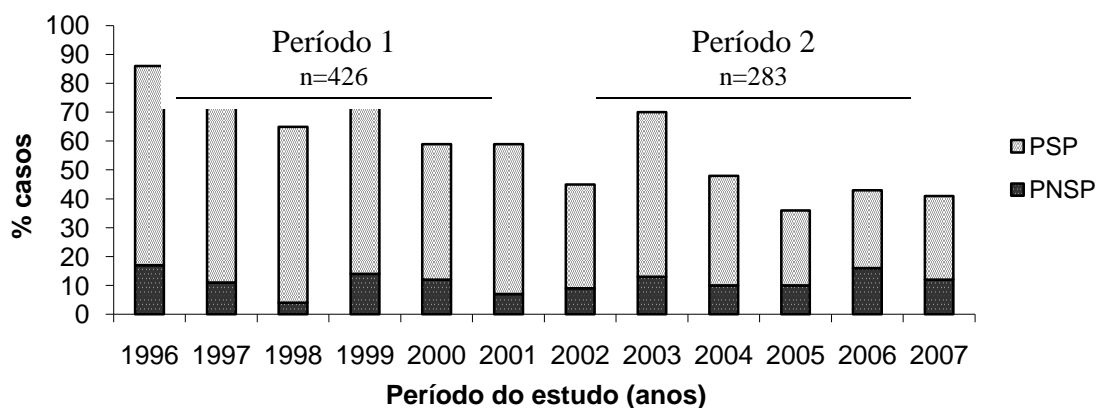
5 RESULTADOS

5.1 VIGILÂNCIA ATIVA LABORATORIAL

Durante os doze anos de vigilância hospitalar ativa para as meningites bacterianas, estabelecida no Hospital Couto Maia, em Salvador, entre janeiro de 1996 a dezembro de 2007, ocorreram 748 casos de meningite pneumocócica representando 28,8% (748/2592) de todos os casos de meningite bacteriana, cultura positiva, identificados neste período. Destes, 709 (95%) casos foram cultura de LCR positiva e os isolados estavam viáveis para avaliação microbiológica e genotipagem.

Foram identificados, entre o total de pacientes, 19% (135/709) de casos de meningite causados por pneumococos não susceptíveis à penicilina (PNSP) (CIM \geq 0.125 μ g/mL). Estratificamos a análise em dois períodos, de 1996 a 2001, período pré-vacinal (quando foi disponibilizada nos CRIEs e na rede privada a vacina conjugada pneumocócica heptavalente) e de 2002 a 2007, período pós-vacinal. Nos primeiros seis anos de vigilância, entre 1996 e 2001 (período1) identificamos 426 casos de meningite pneumocócica, dos quais 15,3% (65/426) correspondiam a casos de PNSP. Nos anos subsequentes, de 2002 a 2007 (período 2), identificamos 283 casos de meningite, sendo 24,7% (70/283) de casos PNSP. Quando comparamos os dois períodos, observamos um declínio na prevalência dos casos de meningite por cepas sensíveis (PSP) (84,7% para 75,3%), com aumento de 9,4% na frequência dos casos de PNSP ($p < 0,001$; OR=0,55; IC= 0,37-0,80) (Gráfico 1).

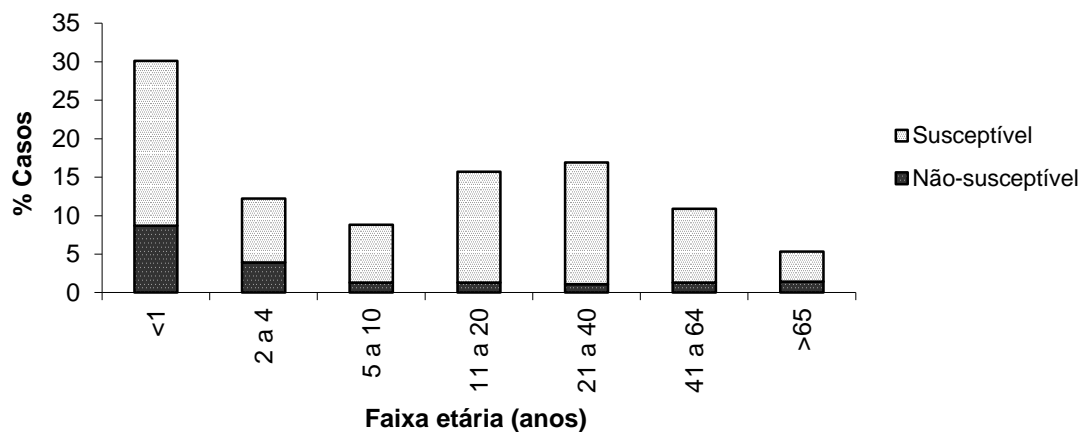
Gráfico 1. Distribuição anual dos casos de meningite pneumocócica com cultura de LCR positiva identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007, de acordo com susceptibilidade a penicilina do isolado (n=709)



.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

A análise das características clínicas e epidemiológicas revela que os casos foram mais frequentes em pacientes do sexo masculino 98/135 (73%) e dados da procedência revelam que 77/135 (57%) foram das cidades de Salvador e região metropolitana. Quando analisamos a distribuição por faixa etária, observamos prevalência de 63% (85/135) dos casos em crianças menores que 5 anos de idade (Gráfico 2).

Gráfico 2. Prevalência dos casos de meningite pneumocócica não-susceptíveis à penicilina por faixa etária identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007(n=709)



Entre crianças menores que 5 anos, comparado com as crianças com 5 anos ou mais, observamos maior mediana de dias apresentando sintomas da meningite (3;1-14 dias); maior frequência entre os pacientes que apresentaram alguma condição neurológica (coma ou estado mental alterado) na admissão (56,7%; 30/53) e entre os que apresentaram convulsões durante a hospitalização (84%; 42/50). Do total de pacientes, foi possível obter informações sobre infecções antecedendo a meningite de 28/135 (20,7%), dos quais 19/28 (67,9%) apresentaram alguma doença precedendo a meningite. Entre estas, a doença mais freqüente foi infecção das vias aéreas superiores, representando 28,6% (8/28) dos casos, seguida de pneumonia (4/28) e otite média (4/28), ambas relatadas por 14,3% dos pacientes. A mediana de dias de internamento entre os pacientes que foram a óbito foi de 1 dia (0-14 dias) para crianças menores que 5 anos e de 7 dias (0-19 dias) para pacientes com idade superior a 5 anos; 9,6% (13/135) dos pacientes ficaram internados por mais que 30 dias. Um total de 41,4% (34/82) dos pacientes apresentou seqüela

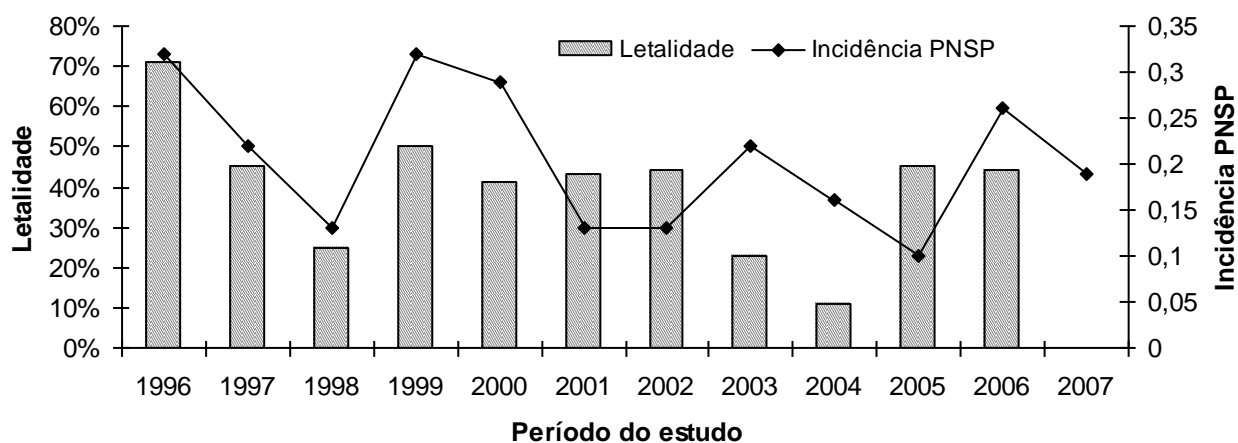
neurológica no desfecho e 60,7% (82/135) evoluíram com cura. A taxa de letalidade obtida para todas as idades foi de 39,2% (53/135), sendo que em crianças menores que 5 anos de idade foi de 50,6% (43/85). Quando comparamos os dados demográficos dos isolados dos pacientes com meningite causada por pneumococo sensível e não sensível à penicilina, observamos que pacientes do sexo masculino, crianças com idade menor que 5 anos, pacientes residentes de Salvador e região metropolitana apresentaram maior risco de desenvolver a doença pelo isolado não sensível à penicilina (Tabela 2).

Tabela 2. Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos casos de meningite pneumocócica não sensível e sensível a penicilina identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007

Características	PSP	PNSP	OR (IC=95%)
Casos	574	135	-
Sexo Masculino	353	98	1,66 (1,08-2,56)
Idade			
<5 anos	201	85	3,15 (2,10-4,74)
>5anos	373	50	
Região Metropolitana de Salvador	243	77	1,81 (1,22-2,69)
Dias de sintomas- Mediana	2[0-20]	2[0,5-14]	-
Condição neurológica na admissão (alterado/coma)	213	41	0,74 (0,48-1,13)
Convulsões durante hospitalização	185	48	1,16 (0,77-1,75)
Dias de UTI - Mediana	1[0-100]	1[0-25]	-
Dias de Hospitalização - Mediana	13[0-108]	15[1-59]	-
Seqüela neurológica no desfecho	81	16	0,82(0,44-1,50)
Letalidade	31,0%	39,2%	-

A incidência de PNSP foi estimada para 2,47/100.000 para todos os grupos de idade; 1,69 casos/100.000 habitantes para crianças menores que 5 anos, e 1,37 casos/100.000 habitantes para crianças menores de 1 ano (Gráfico 3).

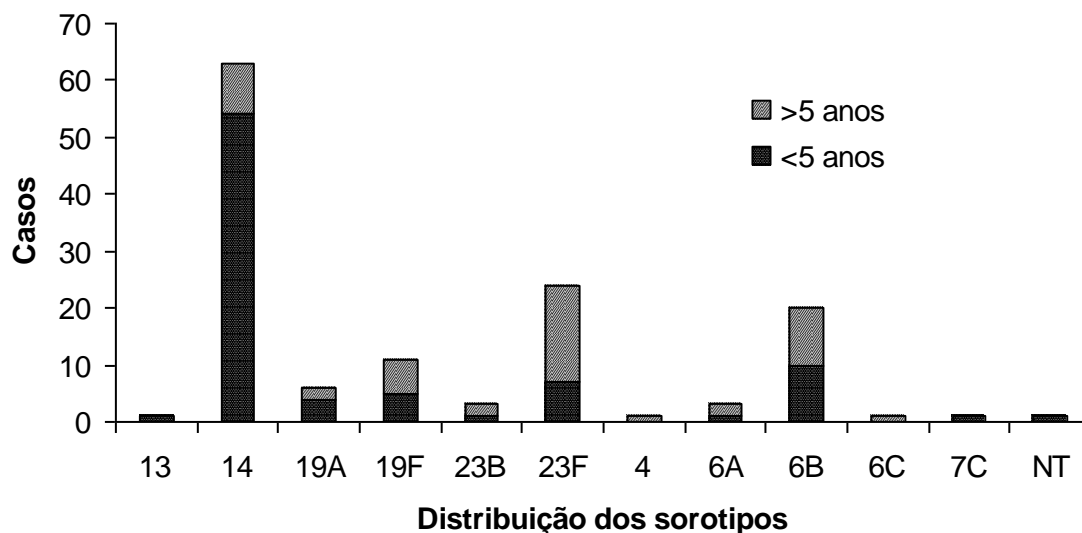
Gráfico 3. Incidência e letalidade dos casos de meningite pneumocócica não susceptível a penicilina identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007 (n=135)



5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DISTRIBUIÇÃO DE SOROTIPOS

Os isolados PNSP também apresentaram taxa de não susceptibilidade antimicrobiana ao sulfametoxazol/trimetoprim 107/135 (79,3%), à tetraciclina 24/135 (17,8 %), cefotaxima 4/135 (3%) e ofloxacina 3/135 (2,2%). Foram identificados 11 sorotipos distintos e um isolado não-tipável entre os isolados de PNSP durante a vigilância. Os sorotipos mais frequentes foram 14 (46,7%; 63/135), 23F (17,8%; 24/135), 6B (14,8%; 20/135), 19F (8,1%; 11/135) e 19A (4,4%; 6/135) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Distribuição dos sorotipos dos casos de meningite pneumocócica NSP identificados no HCM durante vigilância ativa entre 1996-2007 estratificados por faixa etária (n=135)



Sorotipos da vacina 7-valente: 4, 9V, 14, 19F, 23F, 18C e 6B.

Sorotipos da vacina pneumocócica 10-valente: 7-V +1, 5 e 7F.

Sorotipos da vacina pneumocócica 13-valente: 10-V + 3, 6A e 19A

Os sorotipos 14 e 6B foram responsáveis por 62,7% (47/75) e 12% (9/75) dos casos em menores que 2 anos e 63,5% (54/85) e 11,8% (10/85) em menores que 5 anos, respectivamente. Os sorotipos mais frequentes entre os pacientes que foram a óbito foram: 14 (47,2% [25/53]; OR=1,03 [IC 0,49-2,19]), 6B (22,6% [12/53]; OR=2,71 [IC 0,93-7,99]) e 23F (7,5% [4/53]; OR=0,25 [IC 0,07-0,86]). Considerando os sorotipos identificados entre os PNSP, estimamos que 89% dos casos em crianças menores que 5 anos poderiam ser preveníveis através do uso das vacinas conjugadas 7-valente e 10-valente (PCV-10) e de 95% para a vacina conjugada 13-valente (PCV-13).

5.4 TIPAGEM MOLECULAR

Todos os 135 isolados de PNSP foram submetidos à análise por BOX PCR e PFGE, sendo identificados 35 grupos clonais que variam em número de isolados de 2 a 47. Um total de 20 isolados foi classificado com perfil eletroforético único, sendo não clonais. A distribuição dos maiores grupos clonais (compostos por 6 isolados ou mais) está apresentada no gráfico 5. Dentre estes, destaca-se o clone A, com o maior número de isolados (47/135; 34,8%) formado principalmente pelo sorotipo 14 (44/47), 6A, 19A e 19F, um isolado de cada, respectivamente. Foi observada significância estatística entre pacientes que foram a óbito que tiveram a meningite causada por isolado do clone A e não clone A (OR= 0,41; IC= 0,17-0,97). O segundo maior grupo clonal foi o padrão AV, composto por 9,6% (13/135) dos isolados, sendo representado principalmente pelos sorotipos 6B (9/13), 19F (2/13), 6A e 23F, um isolado de cada, respectivamente. O terceiro grupo foi o padrão clonal GA representando 8,1% (11/135) dos isolados e composto principalmente pelo sorotipo 23F (9/11), 6B e 7C, um isolado de cada, respectivamente. O quarto grupo foi o padrão clonal FE, representando 6,7% (9/135) dos isolados, composto pelos sorotipos 14 (7/9) e 23F (2/9). O quinto grupo foi o padrão clonal N representando 5,9% (8/135) dos isolados, composto pelos sorotipos 6B (7/8) e 19A (1/8). O sexto grupo foi o padrão clonal GK, representando 4,4% (6/135) dos isolados, caracterizado com elevado nível de não susceptibilidade à penicilina (83,3%; 5/6; CIM \geq 2 μ g/mL) e cefotaxima (66,7%; 4/6; CIM \geq 1 μ g/mL), composto principalmente pelo sorotipo 14 (5/6) e pelo sorotipo 19F (1/6).

Quanto à classificação pelo MLST, foram selecionados alguns isolados dos principais padrões clonais e submetidos a esta técnica de tipagem. Dos 44 isolados do sorotipo 14, grupo clonal A, 4 foram caracterizados como ST66 e os sorotipos 6A, 19A e 19F estão sendo analisados (Figura 5). Entre os 13 isolados do grupo clonal AV, um foi identificado como ST750 (sorotipo 6B) e um ST177 (sorotipo 19F), outros dois isolados sorotipo 6B estão sendo analisados (Figura 6). Entre os 11 isolados do padrão clonal GA, identificamos ST338, sorotipo 23F e o isolado sorotipo 7C, que está sendo analisado (Figura 7). Entre os 9 isolados do padrão clonal FE, identificamos um ST338, sorotipo 23F e estão em análise dois outros isolados, um sorotipo 14 e um sorotipo 23F (Figura 8). Entre os 8 isolados do padrão clonal N, identificamos ST741, 748 e 751 (todos do sorotipo 6B) e estamos analisando um isolado sorotipo 19A (Figura 9). Entre os 6 isolados do padrão clonal GK, identificamos ST156, 4 isolados do sorotipo 14 e um isolado também sorotipo 14 com diferença em apenas um alelo - *xpt* (SLV - *Single Locus Variant*); o outro isolado pertence ao mesmo padrão clonal, sorotipo 19F, está sendo analisado (Figura 10).

Os outros isolados apresentaram maior diversidade quanto ao padrão clonal identificado por PFGE e confirmado pelo MLST.

Gráfico 5. Distribuição Clonal dos sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* isolados de casos de meningite não-susceptíveis à penicilina em Salvador, Bahia. (BOX A-PCR, PFGE e MLST)

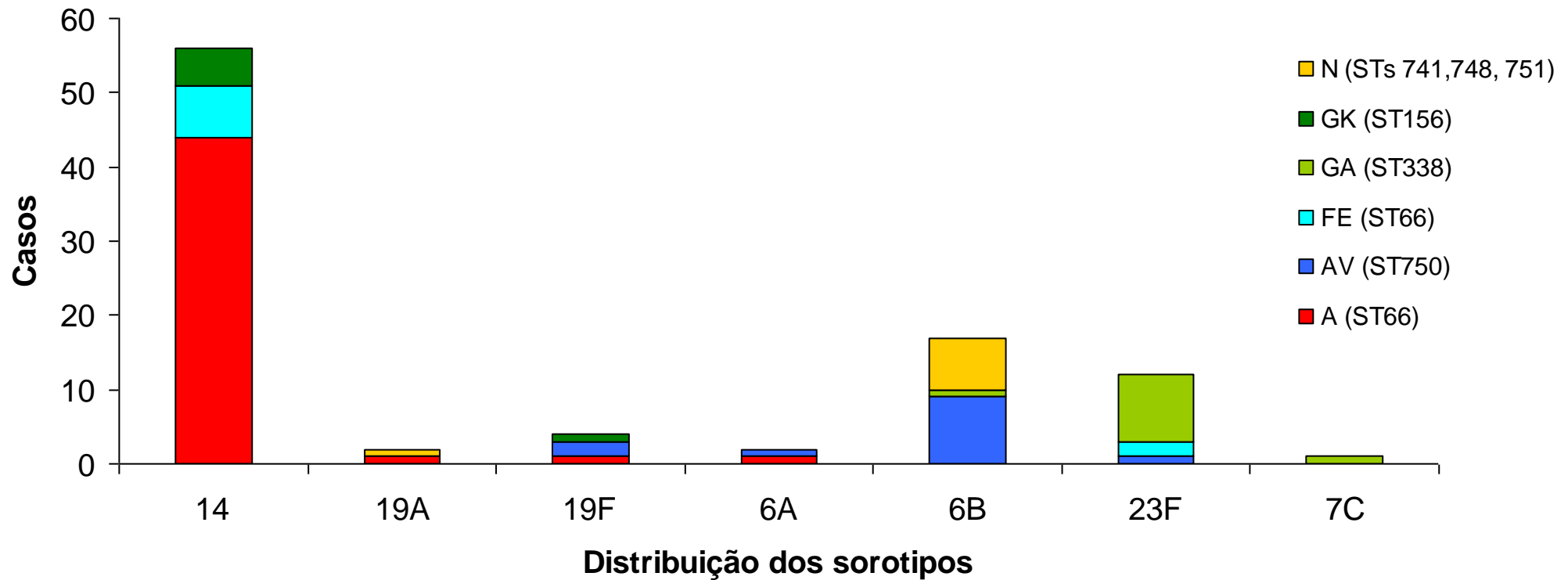
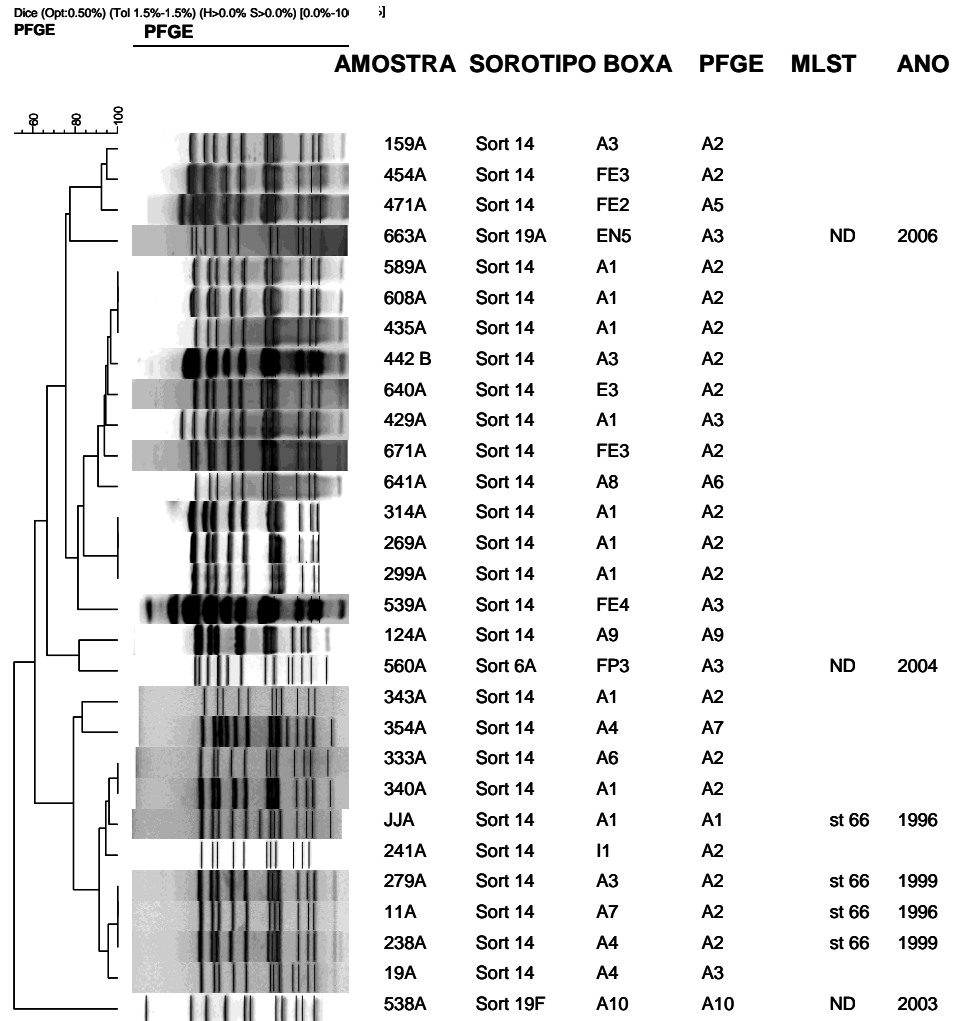
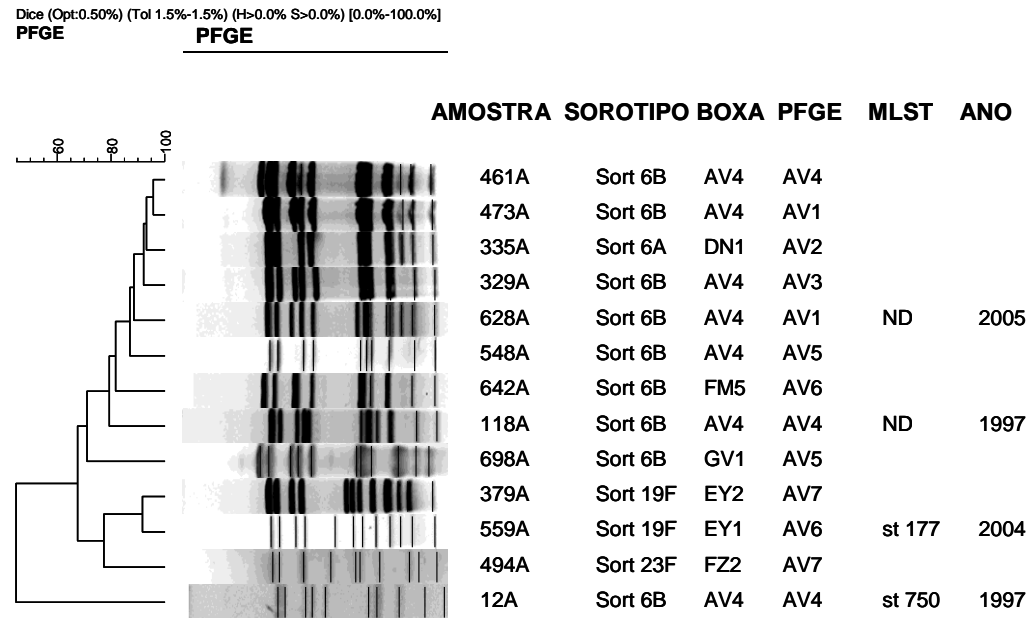


Figura 5. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone A - ST66 (BOX A-PCR, PFGE e MLST) (n=29/47)



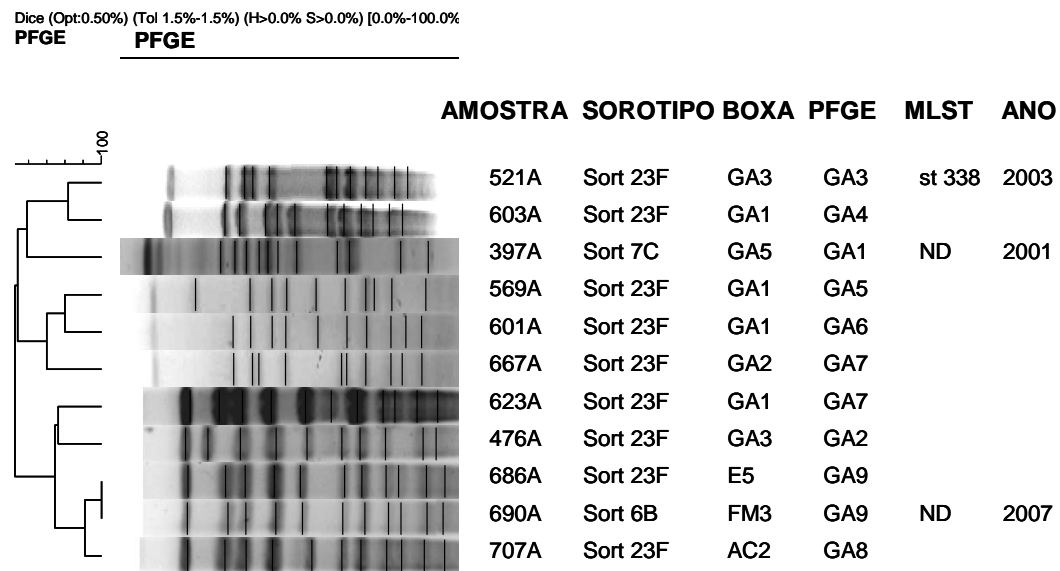
ND= Não determinado.

Figura 6. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone AV – ST177, 750 (BOX A-PCR, PFGE e MLST) (n=13)



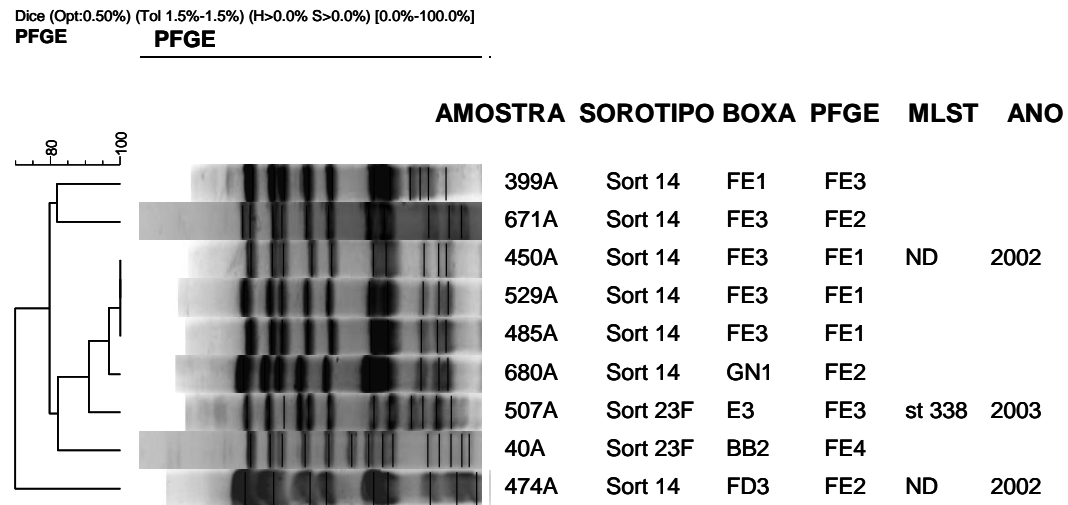
ND= Não determinado.

Figura 7. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone GA – ST338 (BOX A-PCR, PFGE e MLST) (n=11)



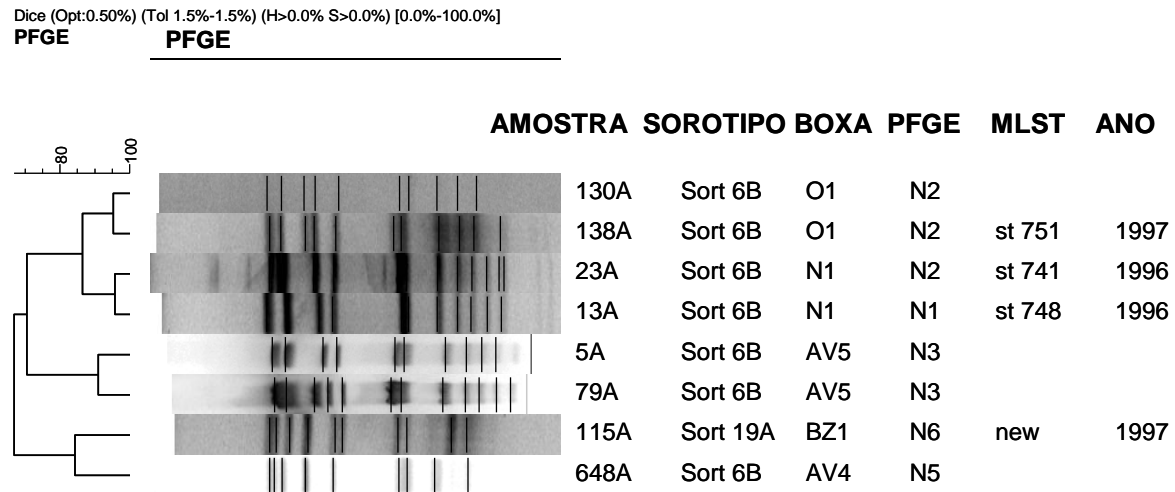
ND= Não determinado.

Figura 8. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone FE– ST338 (BOX A-PCR, PFGE e MLST) (n=9)



ND= Não determinado.

Figura 9. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone N – ST741, 748, 750 (BOX A-PCR, PFGE e MLST) (n=8)



New = ST novo.

Figura 10. Dendrograma dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* não-susceptíveis à penicilina Clone GK– ST156 (BOX A-PCR, PFGE e MLST) (n=6)



ND= Não determinado.

SLV = *Single Locus Variant*

5.5 DETECÇÃO DE *PILI*

Para identificação de *pili* foram selecionados, entre o total de pacientes identificados com meningite pneumocócica admitidos no HCM, um ou mais (1 a 7) isolados de cada padrão clonal identificado por BOX A PCR e confirmado por PFGE. Foram então, submetidas à detecção do gene *rliA*, 133 amostras selecionadas entre o total de 709 pacientes. Destas, 29 (22%) foram positivas. A maior frequência de *pili* positivo ocorreu em amostras dos sorotipos 14 (5/133; 3,8%), 19F (4/133; 3%) e 9V (4/133; 3%). Quanto à susceptibilidade à penicilina e ao sulfametoxazol/trimetoprim, foram identificados como não susceptíveis 24,1% e 55,2% dos isolados, respectivamente. A análise da composição clonal revela diversidade de perfis eletroforéticos, não sendo encontrado um padrão clonal predominante. Do total de pacientes com resultado de *pili* positivo, 41,4% (12/29) dos pacientes foram a óbito, entre os quais 75% (9/12) eram crianças menores que 1 ano. Não encontramos associação estatística significativa entre os isolados *pili* positivo e letalidade (OR=1,26; IC= 0,49-3,28).

6 DISCUSSÃO

No período do estudo entre janeiro de 1996 a dezembro de 2007 foram identificados 709 casos de meningite pneumocócica na cidade de Salvador e região metropolitana. Foram identificados 19% (135/709) de isolados não susceptíveis a penicilina, sendo a maioria dos casos registrados no HCM procedentes de Salvador e região metropolitana do estado (57%), do sexo masculino (73%) e na faixa etária de crianças menores que 5 anos de idade (63%). Resultados similares foram encontrados nos estudos realizados por REIS JN, *et al* (2002) em Salvador e por BEDRAN *et al* (2005) na cidade de Belo Horizonte (MG) em estudo de doenças invasivas causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

No presente estudo, a letalidade da meningite causada por PNSP foi de 39,2% para todos os pacientes e de 50,6% para as crianças menores de cinco anos de idade atendidos no HCM. De acordo com REIS, *et al* (2002), no período de dezembro de 1995 a novembro de 1999, a letalidade para meningite pneumocócica era 42% para todos os pacientes e de 60% para as crianças menores de cinco anos de idade na cidade de Salvador, maior do que a encontrada neste estudo.

A incidência ao longo desses anos decaiu de 2,63 em 1996 para 1,31 casos por 100.000 mil habitantes em 2007, para a população geral e a incidência entre os isolados não susceptíveis diminuiu de 0,32 em 1996 para 0,19 casos por 100.000 mil habitantes em 2007 por 100.000 habitantes. Estudo realizado por REIS, *et al* (2002) no período de 1996 a 1999 na cidade de Salvador com meningite pneumocócica observou uma incidência de 1,60 para cada 100.000 habitantes e 24,70 para cada 100.000 habitantes com cinco

anos. Embora tenha ocorrido uma diminuição no número de casos da meningite pneumocócica, esta ainda é uma das principais causas de morbimortalidade mundial, especialmente em crianças menores de 5 anos de idade e a resistência aos antimicrobianos tem sido progressiva.

A prevalência dos casos *S. pneumoniae* não susceptíveis à penicilina (PNSP), pelo método de microdiluição em caldo, foi de 19% (135/709), sendo 6 isolados (4,4%; 6/135) com elevado nível de resistência (MIC $\geq 2\mu\text{g/mL}$). Estas cepas com elevado nível de resistência à penicilina apresentaram também resistência a cefotaxima (3%; 4/135; MIC $\geq 1\mu\text{g/mL}$). Um estudo de vigilância realizado também em Salvador por Reis JN *et al* (2002), em pacientes com meningite pneumocócica no período de 1996 a 1999, encontrou não susceptibilidade à penicilina de 15%, mais baixa do que a encontrada no presente estudo, mas não encontrou resistência a cefotaxima. No Brasil, no período de 1993 a 2004, verificou-se um aumento da não susceptibilidade à penicilina de 10,2% em 1993 para 27,8% em 2004, onde 5,9% dos isolados apresentaram alto nível de resistência. De acordo com BRANDILEONE, *et al.* (2006), há diferença em relação à PNSP nas regiões do país. Entre 2000 a 2005, PNSP no nordeste era de 20,5% (Intermediário – 18,8% e Resistência – 1,7%) dos isolados. As regiões sudeste, sul e centro-oeste são as regiões que apresentaram maior percentual de isolados PNSP; 28,1% (Intermediário – 20,4% e Resistência – 7,7), 27,7% (Intermediário – 22,5% e Resistência – 5,2%) e 20,5% (Intermediário – 18,8% e Resistência – 1,7%) respectivamente. No norte do país a taxa de PNSP foi de 7,9% e ainda não foi identificado isolado com alto nível de resistência à penicilina nesta região (BRANDILEONE MCC *et al.*, 2006).

A resistência à penicilina em outros países da América Latina é maior do que a encontrada no Brasil. Na Argentina e no Chile a resistência à penicilina é de 16%, enquanto que no México, no Uruguai e na Colômbia a resistência é de 20%, 21% e 25% respectivamente (CAMARGOS *et al.*, 2006).

Estudos realizados em outros países como a Itália, encontraram prevalência de 38,1% de PNSP entre isolados de doença invasiva, obtidos entre 2001 e 2003 através de vigilância e no Japão elevada frequência de PNSP (76,6%) e multirresistência a outras drogas (77,8%; eritromicina, clindamicina e minociclina) foram observadas entre isolados de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade entre 2003 e 2004 (GHERARDI *et al.*, 2007; IMAI *et al.*, 2009).

Em nosso meio, não encontramos taxas elevadas de não susceptibilidade a fluorquinolonas, droga recomendada pelo seu espectro de ação, para adultos com infecções do trato respiratório; em países como Tailândia, onde a prevalência de não-susceptibilidade aos beta-lactâmicos e aos macrolídeos é elevada, foi observada também não-susceptibilidade a levofloxacina, com aumentos progressivos de 1,2% a 4,2% entre 2001 e 2007 (Hsieh *et al.*, 2009).

Nas duas últimas décadas, o aumento do uso de antibióticos tem sido a mais importante pressão seletiva para o aparecimento e circulação de novos clones pneumocócicos (ALBRICH *et al.*, 2004; BOCCIA *et al.*, 2004). Atualmente, a epidemiologia da doença causada pelo *S.pneumoniae* sofre mudanças profundas em países onde a vacina conjugada heptavalente (PCV7) foi amplamente introduzida, na população pediátrica alvo e em indivíduos idosos (WHITNEY *et al.*, 2003).

Nossos achados da distribuição de sorotipos estão de acordo com os dados reportados pela vigilância de base laboratorial nacional, indicando que um limitado espectro de sorotipos é responsável por causar a doença pneumocócica invasiva. Contudo, o padrão de sorotipos predominante observado neste estudo difere daqueles reportados em outras regiões do Brasil e outros países da América Latina (BRANDILEONE *et al.*, 2006; CAMARGOS *et al.*, 2006). Enquanto os sorotipos 1 e 5 são encontrados entre 8 a 12% dos isolados de pacientes pediátricos em outras cidades brasileiras e em outros países como Chile, Colômbia e Uruguai, estes sorotipos não foram encontrados entre os casos de PNSP identificados neste estudo. Estas diferenças podem ser em parte, devido a diferenças geográficas na prevalência dos sorotipos, mas podem refletir diferenças nas vigilâncias estabelecidas e na amostragem dos pacientes (BRANDILEONE *et al.*, 1997; CASTAÑEDA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2002). Entre todos os sorotipos, o 14 (46%) e o 23F (17,8%) foram os mais freqüentes, estando o sorotipo 14 mais relacionado com PNSP isolados de crianças menores de cinco anos e o sorotipo 23F isolado de indivíduos com idade maior ou igual a cinco anos. Estes sorotipos estão incluídos nas vacinas conjugadas (PCV7 e PCV10) que tem sido efetiva na redução de colonização e de doença invasiva (CDC, VPD Surveillance manual 2008).

De acordo com os dados obtidos no nosso estudo, a implementação das vacinas conjugadas protéicas trariam uma redução efetiva das taxas de colonização e conseqüentemente de doença pneumocócica invasiva entre a população, especialmente no público alvo, que são as crianças menores que 2 anos. Com a implementação da PCV-10 no calendário vacinal no nosso país,

esperamos uma cobertura de 52% para todas as faixas etárias entre os todos os casos de meningite pneumocócica, de 71% em crianças < 5 anos e uma proteção de 89% entre os casos de PNSP em crianças < 5 anos.

A análise molecular dos PNSP mostrou limitados padrões clonais, entre os quais o ST66 é predominantemente representado (BRANDILEONE *et al.*, 1998). Neste trabalho encontramos frequência de 37,8% de ST66, maior do que a relatada em estudo de colonização na mesma cidade (22%) no período de 2000 a 2001 (REIS *et al.*, 2008). Entre os casos de meningite pneumocócica com alto nível de resistência a penicilina, encontramos ST156 (4,4%), definido como clone Spain^{9V} – 3; sendo que os nossos isolados, foram caracterizados pelo sorotipo14. Em estudo realizado na Noruega, a partir de isolados não susceptíveis, obtidos de infecções sistêmicas (mais de 80%) e infecções não-invasivas encaminhadas de diferentes laboratórios do país, entre 1995 e 2001, o ST predominante também foi o ST156, representado pelos sorotipos 14 e 9V, mostrando a habilidade do patógeno em realizar a substituição capsular e a expansão deste clone no mundo (SOGSTAD *et al.*, 2006). Entre os outros isolados, observamos diversidade clonal, também relatada em outros trabalhos comparando colonização e doença invasiva, onde diferentes complexos clonais tem diferentes potenciais para causar doença invasiva (REIS *et al.*, 2008).

Flutuações na prevalência de sorotipos e genótipos podem ocorrer naturalmente nas populações pneumocócicas na ausência de pressão exercida pelas vacinas conjugadas. Nos Estados Unidos, a expansão clonal (aumento do número de clones previamente raros expressando sorotipos não-vacinais) tem sido documentada desde a introdução da vacina conjugada heptavalente (PCV-7). Sorotipos não-vacinais têm sido reportados em muitos estudos

realizados nos países onde a vacina foi implementada. Ainda não está bem estabelecido se tais mudanças agem diretamente pela pressão exercida pela vacina ou se são devido a flutuações naturais que ocorrem entre as espécies. Estudo realizado na Escócia, no período pré-vacinal, através de vigilância para pneumococos entre 2001 e 2006, observaram consideráveis e significantes mudanças na distribuição dos sorogrupos ao longo do tempo, com elevada frequência dos sorogrupos 1, 4 e 6 e diminuição dos sorogrupos 14, 19 e 23, apresentando expansão clonal do sorotipo 1 clone ST306 e diminuição do sorotipo 14 (ST124) em um período de 5 anos antes da introdução da PCV-7, mostrando as possíveis variações que podem ocorrer mesmo no período pré-vacinal (BEALL *et al.*, 2006; HICKS *et al.*, 2007; JEFFERIES, *et al.*, 2009).

Em nosso estudo encontramos 29% de *pili* positivo entre os isolados dos grupos clonais identificados durante todo o período de vigilância, sendo 24,1% PNSP. Entre nossos isolados, não encontramos associação entre letalidade e presença de *pili*, considerando a habilidade deste fator de virulência em causar doença invasiva. Em estudo realizado em Portugal entre 1999 a 2002, revelou presença de *pili* em uma minoria dos isolados recuperados de pacientes com infecções invasivas (27%), mostrando que o *pili* não é um fator essencial nestas infecções (RAMIREZ *et al.*, 2008). Em outro trabalho, realizado no Japão, a presença do gene *rlrA* foi correlacionada a complexos clonais (CCs) definidos pelo PMEN – CC's 180, 271, 242, 138, sugerindo que este gene confere uma vantagem para disseminação entre colonização e isolados multi-resistentes às drogas (IMAI *et al.*, 2009).

7 CONCLUSÃO

- Entre os casos de meningite pneumocócica, obtivemos uma prevalência de 19% de não susceptibilidade à penicilina;
- Observamos a persistência de poucos padrões clonais entre estes isolados ao longo dos anos;
- Identificamos o clone ST66 caracterizado pelo sorotipo 14, como predominante, ocorrendo em 36,3% dos casos;
- Detectamos a emergência do clone ST156 com elevado nível de resistência a penicilina e cefotaxima;
- Estimamos alcançar 89% de proteção contra PNSP em crianças < 5 anos de idade com a implementação da vacina pneumocócica conjugada protéica 10-valente, prevista para ser implementada no Brasil este ano;
- Os dados obtidos com este trabalho reforçam a importância da vigilância ativa contínua no monitoramento da meningite pneumocócica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRICH W.D., MONNET D., HARBARTH S. Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis*, 10:514-517, 2004;

APPELBAUM P.C. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Di*, 15:77–83,1992;

APPELBAUM PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: implications for drug selection. *Clin Infect Dis*, 34:1613-1620, 2002;

AUSTRIAN, R. Life With the Pneumococcus. University of Pennsylvania Press.Philadelphia: 1985.

BAROCHI M.A., RIES J., ZOGAJ X., HEMSLEY C., ALBINGER B., KANTH A., DAHLBERG S., FERNEBRO J., MOSCHIONI M., MASIGNANI V., HULTENBY K., TADDEI A.R., BEITER K., WARTHA F., VON EULER A., COVACCI A., HOLDEN D.W., NORMARK S., RAPPUOLI R., HENRIQUES-NORMARK B. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *PNAS*, 103(8):2857-2862, 2006;

BEALL B., MCELLISTREAM M.C., GERTZ R.E., WEDEL S., BOXRUD D.J., GONZALEZ A.L., MEDINA M.J., PAI R., THOMPSON T.A., HARRISON L.H., MCGEE L., WITHNEY C.G. Pre and post vaccination clonal composition of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United states in 1999, 2001 and 2002. *J Clin Microbiol*, 44:999-1017, 2006.

BEDRAN M.B., CAMARGOS P.A., *et al.* Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin in the state of Minas Gerais, Brazil from 1997-2004. *Braz J Infect Dis*, v.9, n.5, Oct, p.390-7, 2005.

BELKUM A. van, SLUIJUTER M., DE GROOT R., VERBRUGH H., HERMANS P.W. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol*, 34:1176–9, 1996.

BEREZIN E.N., CARVALHO E.S., CASAGRANDE S., BRANDILEONE M.C., MIMICA I.M., FARHAT C.K. *Streptococcus pneumoniae* penicillin-nonsusceptible strains in invasive infections in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*, 15:1051–3, 1996.

BEREZIN E.N., CARVALHO L.H., LOPES C.R., SANAJOTTA A.T., BRANDILEONE M.C.C., MENEGATTI S., *et al.* Meningite pneumocócica em crianças: achados clínicos, sorotipos mais frequentes e prognóstico. *J Pediatr*, 78:19-23, 2002.

BERGMANN C., CHI F., RASHID S., HAKENBECK. Mechanisms for penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins, gene transfer, and cell wall metabolism. 2004. *In* E.I.Tuomanen, T.J. Mitchell, DA

Morrison and B. G. Sprat (ed.), The pneumococcus. ASM press, Washington, DC, 339-349, 2004.

BRAIDO F., BELLOTTI M., DE MARIA A., CAZZOLA M., CANONICA G.W. The role of Pneumococcal vaccine. *Pulm Pharmacol Ther*, doi: 10.1016/j.pupt.2008.04.001. 2008;

BRANDILEONE M.C.C., VIEIRA V.S., CASAGRANDE S.T., ZANELLA R.C., GUERRA M.L.S, BOKERMANN J.C., DE MORAES J.C., BALDACCI E.R., CHAMONE C.B., OLIVEIRA M.A., MATOS DE D.G., ARRUDA T.M., COELHO M.F., D'AVILA S.M., SANTOS A.R., DI FABIO J.L. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Brazilian children with invasive infections. Pneumococcal Study Group in Brazil for the SIREVA Project. Regional System for vaccines in Latin America. *Microb Drug Resist*, 3:141-146, 1997.

BRANDILEONE M.C.C., DI FABIO J.L., VIEIRA V.S., ZANELLA R.C., CASAGRANDE S.T., PIGATARI A.C. *et al.* Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist*, 4:209-217, 1998.

BRANDILEONE M.C.C., CASAGRANDE S.T., GUERRA M.L.S., ZANELLA R.C., ANDRADE A.L.S.S., DI FABIO J.L. Increase in numbers of β -lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of

conjugate vaccine coverage. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 567-574, 2006.

Brasil, Ministério da Saúde. Data-Sus Brasil. <http://www.saude.gov.br>.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais. Brasília: Ministério da Saúde, 3ª edição, 188 p. 2006.

BRATCHER PE, KIM KH, KANG JH, HONG JY, NAHM MH. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology*. 2010, 156(Pt 2):555-60, 2009.

BREIMAN R.F., SPIKA J.S., NAVARRO V.J., DARDEN P.M., DARBY C.P.. Pneumococcal bacteremia in Charleston County, South Carolina: a decade later. *Arch Intern Med*,150:1401–5, 1990.

BRICKS L.F., BEREZIN E.N., SILVEIRA L. Uso de antibióticos em IRA e resistência bacteriana. *In*: BRICKS LF, CERVI MC, organizadoras. Atualidades em doenças infecciosas: manejo e prevenção. São Paulo: Atheneu, p. 197-214. 2002.

BRICKS L.F., BEREZIN E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. *Jornal de Pediatria*, 82(3):67-74, 2006.

BRUEGGEMANN A.B., GRIFFITHS D.T., MEATS E., CROOK D.W. SPRATT B.G. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis*, 187:1424-32, 2003.

BOCCIA D., ALEGIANI S.S., PANTOSTI A., MORO M.L., TRAVERSA G. The geographic relationship between the use of antimicrobial drugs and the pattern of resistance for *Streptococcus pneumoniae* in Italy. *Eur J Pharmacol*, 60:115-119, 2004.

CAMARGOS P., FISCHER G. B., MOCELIN H., DIAS C. E., RUVINSKY R. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. *Paediatric Respiratory Reviews*, 7, 209–214, 2006.

CASTAÑEDA E., AGUDELO C.I., REGUEIRA M., CORSO A., BRANDILEONE M.C., BRANDÃO A.P., MALDONADO A., HORMAZABAL J.C., MARTINEZ I.T., LLANES R., SÁNCHEZ J., FERIS J., ECHANIZ-AVILES G., CARNALLAS-BARAIAS M.N., TERRAZAS M.G.V, MONROY I.H., CHAMORRO G., WEILER N., CAMOU T., GABARROT G.G., SPADOLA E., PAYARES D., GABASTOU J.M., DI FABIO J.L., LA HOZ and the SIREVA II Group. Laboratory Based Surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries. *The Pediatr Infect Dis J*, 28 (9): 265-270, 2009.

CDC. Prevention of pneumococcal disease. *MMWR*, 46 (No. RR-8): 1-20, 1997.
CDC. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*, 49 (No. RR-9): 1-35, 2000.

CDC, VPD Surveillance manual, 4th edition. Pneumococcal disease chapter 11;12 p. 2008.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. In: 17th Informational Supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: NCCLS; 2008.

DE SOUSA MARQUES H.H., YAMAMOTO M., SAKANE P.T., CAIAFFA-FILHO H.H., FIGUEIREDO MENDES C.M. Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. *Pediatr Infect Dis J*, 7:433–4, 1988.

ENRIGHT M.C., SPRATT B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 144:3049-3060, 1998.

ERTUGRUL N., RODRIGUEZ-BARRADAS M.C., MUSER D.M., RYAN M.A., AGIN C.S., MURPHY S.J., SHAYEGANI M., WATSON D.A. BOX-polymerase chain reaction-based DNA analysis of nonserotypeable

Streptococcus pneumoniae implicated in outbreaks of conjunctivitis. J Infect Dis, 176:1401–5, 1997.

GARCIA S., LEVINE O.S., CHERIAN T., GABASTOU J.M., ANDRUS J. and the Working Group members. Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. Pan Am J Public Health, 19(5): 340-348, 2006.

GHERARDI G., FALLICO L., DEL GROSSO M., BONANNI F., D'AMBROSIO F., MANGANELLI R., PALÙ G., DICUONZO G., PANTOSTI A. Antibiotic-Resistant Invasive Pneumococcal Clones in Italy. Journal of Clinical Microbiology, 45(2): 306-312, 2007.

HEFRON R. Pneumonia: with special reference to *Pneumococcus lobar pneumonia*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1979.

HERMANS P.W., SLUIJTER M., HOOGENBOEZEM T., HEERSMA H., VAN BELKUM A., DE GROOT R. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. J Clin Microbiol, 33:1606–12, 1995.

HICKS L.A., HARRISON L.H., FLANERY B., HADLER J.L., SCHAFFNER W., CRAIG A.S., JACKSON D., THOMAS A., BEALL B., LYNFIELD R., REINGOLD A., FARLEY M.M., WITHNEY C.G. Incidence of pneumococcal isolates 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, 196:1346-1354, 2007.

HSIEH Y.C., CHANG L.Y., HUANG Y.C., LIN H.C., HUANG L.M., HSUEH P.R. Circulation of international clones of levofloxacin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan. Clin Microbiol Infect, doi: 10.1111. 2009.

IMAI S., ITO Y., ISHIDA T., HIRAI T., ITO I., MAEKAWA K., TAKAKURA S., IINUMA Y., ICHIYAMA S., MISHIMA M. and Community Acquired Pneumococcal Pneumonia Study Group. High prevalence of multidrug-resistant Pneumococcal molecular epidemiology network clones among *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. Clin Microbiol Infect, doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02935.x. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – Resultado do censo da população de Salvador e cidades da região metropolitana- Bahia, 2000. Disponível *on line*: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>

JACOBS M.R., GOOD C.E., BAJAKSOUZIAN S., WINDAU A.R. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* Serotypes 19A, 6C and 23F and Serogroup 15 in Cleveland, Ohio in Relation to Introduction of the Protein-Conjugated Pneumococcal Vaccine. Clin Infect Dis, 47:1388-95, 2008.

JEFFERIES J.M., SMITH A.J., EDWARDS G.F.S., MCMENAMIM J., MITCHELL T.J., CLARKE S.C. Temporal analysis of invasive pneumococcal clones from Scotland illustrates fluctuations in diversity of serotype and

genotype in the absence of pneumococcal conjugate vaccine. J Clin Microbiol, doi: 10.1128. 2009.

JOHNSON A.P., WAIGHT P., ANDREWS N., PEBODY R., GEORGE R.C., MILLER E. Morbidity and mortality of pneumococcal meningitis and serotypes of causative strains prior to introduction of the 7-valent conjugant pneumococcal vaccine in England. Journal of Infection, 55, 394-399, 2007.

KADIOGLU A., WEISER J.N., PATON J.C., ANDREW P.W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature, 6: 288-301, 2008.

KERTESZ D.A., DI FABIO J.L., DE CUNTO BRANDILEONE M.C., et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. Clin Infect Dis, 26:1355-61, 1998.

KLUGMAN K.P. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother, 50 (Suppl. S2): 1-5, 2002.

KO A.I., REIS J.N., COPPOLA S.J., GOUVEIA E.L., CORDEIRO S.M., LOBO T.S., PINHEIRO R.M., SALGADO K., DOURADO C.M.R., TAVARES-NETO J., ROCHA H., REIS M.G., JOHNSON W.D. JR, RILEY L.W. Clonally Related Penicillin-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* Serotype 14 from cases of Meningitis in Salvador, Brazil. Clin Infect Dis, 30:8-86, 2000.

LALITHA M.K., BAARNHIELM M., KIHSTROM E., KRONVALL G. Epidemiological typing of *Streptococcus pneumoniae* from various sources in Sweden and India using Box A PCR fingerprinting. APMIS, 107:389-94, 1999.

LEFEVRE J.C., FAUCON G., SICARD A.M., GASC A.M. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strain by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 31:2724-2728, 1993.

MARCHESE A., GUALCO L., COCHETTI I., MONTANARI M.P., SPECIALE A. M., MUSUMECI S.R., VARALDO P.E., NICOLETTI G., SCHITO G. C. Antibiotic susceptibility and serotype distribution in *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the SEMPRE surveillance study (2000-2002). Int J Antimicrob Agents, 26:138-145, 2005.

MONACO M., CAMILLI R., D'AMBROSIO F., DEL GROSSO M., PANTOSTI A. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. J Antimicrob Chemother, 55:256-259, 2005.

MOSCHIONI M., DONATI C., MUZZI A., MASIGNANI V., CENSINI S., HANAGE W.P., BISHOP C.J., REIS J.N., NORMARK S., HENRIQUES-NORMARK B., COVACCI A., RAPPUOLI R., BAROCCHI M.A. *Streptococcus pneumoniae* Contains 3 *rlrA* Pilus variants that are clonally related. The Journal of Infectious Diseases, 197: 1-9, 2008.

MURRAY P.R. (EDITOR CHEFE); BARON E.J.; JORGENSEN J.H.; LANDRY M.L., PFALLER M.A. (EDITORS). Manual of Clinical Microbiology. 9 ed., Vol 1. ASM Press; Washington, DC; 412-429, 2007.

OBERT C.A., GAO G., SUBLETT J., TUOMANEN E.I., ORIHUELA C.J. Assessment of molecular typing methods to determinate invasiveness and to differentiate of *Streptococcus pneumoniae*. Infection, Genetics and Evolution, doi:10.1016 /j.meegid. 2007.07.011. 2000.

O'BRIEN L.L., SHAW J., WEATHERHOLTZ R., REID R., WATT J., CROLL J., DAGAN R., PARKINSON A.J., SANTOSHAM M. Epidemiology of Invasive *Streptococcus pneumoniae* among Navajo Children in the Era before Use of Conjugate Pneumococcal vaccines, 1989-1996. American Journal of Epidemiology, 160(3): 270-278, 2004.

ORTQVIST A., HEDLUND J., KALIN M. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. Semin Respir Crit CareMed, 26:563–74, 2005.

PARK H.I., PRITCHARD D.G., CARTEE R, BRANDAO A., BRANDILEONE M.C.C., NAHM M.H. Discovery of a New Capsular serotype (6C) within Serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol, 45(4): 1225-1233, 2007.

PLETZ M.W., MCGEE L., JORGENSEN J., BEALL B., FACKLAM R.R., WHITNEY C.G., KLUNGMAN K.P. Levofloxacin-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in the United States: evidence for clonal spread and the impact of conjugate pneumococcal vaccine. Antimicrob Agents Chemother, 48:3491–7, 2004.

PLETZ M.W., MAUS U., KRUG N., WELTE T., LODE H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. Int J Antimicrob Agents, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.021. 2008.

Pneumococcal Disease. CDC. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pneumo.pdf> acessado em 04.11.2008.

RAJAM G. ANDERTON J.M., CARLONE G.M., SAMPSON J.S., ADES E.W. *Pneumococcal Surface Adhesin A (PsaA): A Review*. Critical Reviews in Microbiology, 34:1-11, 2008.

REIS J.N., CORDEIRO S.M., COPPOLA S., SALGADO K., CARVALHO M.G.S., TEIXEIRA L.M., THOMPSON T.A., FACKLAM R.R., REIS M.G., KO A.I. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. J Clin Microb, 40(1): 275-277, 2002.

REIS J.N., PALMA T., RIBEIRO G.S., PINHEIRO R.M., RIBEIRO C.T., CORDEIRO S.M., FILHO H.P.S., MOSCHIONI M., THOMPSON T.A., SPRATT B., RILEY L.W., BAROCCHI M.A., REIS M.G., KO A.I. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in a slum community. *Journal of Infection*, 40(1): 275-277, 2008.

ROBINSON K.A., BAUGHMAN W., ROTHROCK G., BARRETT N.L., PASS M., LEXAU C., DAMASKE B., STEFONEK K., BARNES B., PATTERSON J., ZELL E.R., SCHUCHAT A., WHITNEY C.G., ACTIVE BACTERIAL CORE SURVEILLANCE (ABCS)/EMERGING INFECTIONS PROGRAM NETWORK.

Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA*, 285-1729-1735, 2001.

RODRIGUEZ-BARRADAS M.C., THARAPEL R.A., GROOVER J.E., GIRON K.P., LACKE C.E., HOUSTON E.D., HAMILL R.J., STEINHOFF M.C., MUSER D.M. Colonization by *Streptococcus pneumoniae* among human immunodeficiency virus-infected adults: prevalence of antibiotic resistance, impact of immunization, and characterization by polymerase chain reaction with BOX primers of isolates from persistent *S. pneumoniae* carriers. *J Infect Dis*, 175:590-7, 1997.

SADOWY E., SKOCZYNSKA A., FIETT J., GNIADKOWSKI M., HRYNIEWICZ W. Multilocus Sequence Types, Serotypes, and variants of the Surface Antigen PspA in *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Meningitis patients in Poland. *Clinical and vaccine Immunology*, 13:139-144, 2006.

SÁ-LEÃO R., TOMASZ A., SANCHES I.S., NUNES S., ALVES C.R. AVÔ A.B., SALDANHA J., KRISTINSSON K.G., DE LENCASTRE H. Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centers as autonomous epidemiological units. *J Clin Microbiol*, 38:4137-44, 2000.

SILVA N.A., MCCLUSKEY J., JEFFERIES J.M.C., HINDS J., SMITH A., CLARK S.C., MITCHELL T.J., PATERSON G.K.. Genomic Diversity between Strains of the Same serotype and Multilocus Sequence Type Among Pneumococcal Clinical Isolates. *Infection and Immunity*, 74(6): 3513-3518, 2006.

SKOCZYNSKA A., KRIZ P., KONRADSEN, HRYIEWICS W. Characteristics of the major etiologic agents of bacterial meningitis isolated in Poland in 1997-1998. *Microb Drug Resist*, 6:147-153, 2000.

SOGSTAD M.K.R., HOIBY E.A., CAUGANT D.A. Molecular Characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol*, 44(9): 3225-3230, 2006.

SJÖSTRÖM K., BLOMBERG C., FERNEBRO J., DAGERHAMN J., MORFELDT E., BAROCCHI M.A., BROWALL S., MOSCHIONI M.,

ANDERSSON M., HENRIQUES F., ALBINGER B., RAPPUOLI R., NORMARK S., HENRIQUES-NORMARK B. Clonal success of piliated penicillin nonsusceptible pneumococci. *PNAS*, 104(31):12907-12912, 2007.

TEIXEIRA L.M., CARVALHO M.G., CASTINEIRAS T.M., FRACALANZZA S.A., LEVIN A.S., FACKLAM R.R. Serotyping distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Brazil (1992–1996). *Adv Exp Med Biol*, 418:269–71, 1997.

TENOVER F.C., ARBEIT R.D., GOERING R.V., MICKELSEN P.A., MURRAY B.E., PERSING D.H., SWAMINATHAN B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol*, 33(9): 2233-2239, 1995.

TOMASZ A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*, 24(Suppl 1):S85–8, 1997.

Trabulsi L.R., Altethum F. (editores) e cols. *Microbiologia*. 5ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

WHO. World Health Organization. *Weekly epidemiological record*.12(82): 93-104, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/wer>

WHITNEY C.G., FARLEY M.M., HADLER J., HARRISSON L. H., BENNETT N.M., LYNFIEL R., REINGOLD A., CIESLAK P. R., PILISHVILI T., JACKSON D., FACKLAM R.R., JORGESEN J.H., SCHUCHAT A. and the active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infectious program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med*, 348: 1737-1746, 2003.

<http://www.sph.emory.edu/PMEN/index.html>

<http://www.mlst.net>

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HCM**CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DA BAHIA
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HOSPITAL COUTO MAIA**

Salvador 08 de novembro de 1998
Of. Nº

Prezado Dr. Mitermayer

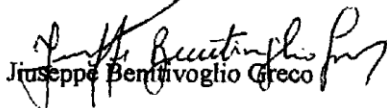
A Comissão de Ética Médica do Hospital Couto Maia após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado; **“Epidemiologia molecular das Meningites Bacterianas em Salvador”**. Achou – o de alta relevância e, por não ferir nenhum capítulo do Código de Ética Médica, Declaração de Helsinque e a Declaração Universal do Direitos do Homem aprova o referido projeto para sua realização no Hospital Couto Maia.

A Comissão de Ética Médica do Hospital Couto Maia esta a disposição da referida equipe do projeto para qualquer orientação e esclarecimento.

Atenciosamente



Edilson Sacramento da Silva



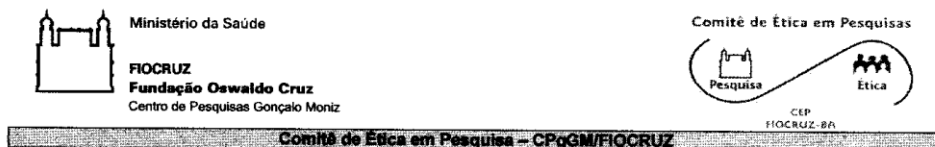
Giuseppe Benfivoglio Greco



Everaldo Benedito da Silva costa

Ilmº Sr.
Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Nesta

ANEXO II - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CPQGM-FIOCRUZ



Salvador, 08 de abril de 2009.

Ofício nº 006/2009

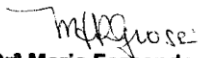
Para: Dr^a Joice Neves Reis Pedreira
Pesquisadora Responsável pelo Protocolo de Pesquisa CEP/CPqGM N° 164
Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), com base na Resolução 196/96, atesta que o protocolo de pesquisa nº 164, intitulado “**Transmissão de *Streptococcus pneumoniae* resistente aos antimicrobianos no Brasil**” foi aprovado em 25/02/2005 e está licenciado e válido até 25/02/2010.

The present study, entitled “Transmission of Drug-Resistant S. pneumoniae in Brazil” with protocol number 164 has been approved by the Gonçalo Moniz Research Center of the Oswaldo Cruz Research Foundation (FIOCRUZ) Ethical Committee on Human Subject (IORG00002090 / IRB000026120) in February 25th 2005 meeting and in the Brazilian National Ethical Committee on Human Subject (CONEP) with protocol number 25000.045797/2005-18. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. In the present version, this project is licensed and valid until February 25th 2010.

Atenciosamente,


Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ
(IORG00002090 / IRB000026120)
Salvador – Bahia - Brasil

ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia****Título do Projeto:** Meningite Bacteriana em Salvador, Brasil.**Paciente:** _____ **No. de estudo:** _____

Para ser lido a todos os pacientes adultos e responsáveis legais dos pacientes menores: As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e o seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo de pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo do Estudo de Pesquisa:

Você/Sua criança está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisas que estamos realizando no Hospital Couto Maia sobre meningites bacterianas. Nos convidamos você a participar deste estudo porque os seus sintomas e os seus resultados de exames laboratoriais indicam que você tem esta doença. A meningite é uma infecção dos tecidos e do fluido que cercam o cérebro. Para identificar o agente causador da doença, seu médico fará alguns exames de rotina e uma parte de sua amostra de líquido será testada para um novo método de diagnóstico. Você não sofrerá nenhum desconforto e não haverá nenhum risco para sua saúde. Nenhuma amostra será coletada só para o estudo, as amostras serão coletadas somente se o médico solicitar, e o estudo não vai interferir no seu tratamento. O objetivo de nosso estudo é conhecer mais esta doença na nossa população, estudando a forma como elas são transmitidas; quais são os fatores que fazem com que algumas pessoas apresentem um quadro mais grave que outras, quais as melhores formas de tratamento, e os testes de diagnóstico. Obtendo estas informações teremos condições, no futuro de implantar medidas para diminuir o número de pessoas com meningite.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar deste estudo de pesquisas após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas relacionadas ao local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica. Irá ainda examiná-lo (a) buscando sinais da doença e lerá seu prontuário médico para obter os resultados de seus exames no hospital. O investigador, a partir de então, irá lhe fazer uma breve visita diária no período em que você estiver no hospital, lhe fará perguntas relativas ao seu estado de saúde e fará em pequeno exame. Não há nenhum risco na participação desse estudo de pesquisas.

Sigilo:

As respostas feitas durante a entrevista, as informações do seu prontuário médico ou dos seus exames serão confidenciais e apenas você e o investigador terão acesso a elas. Você não será identificado (a) em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo de pesquisas.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo de pesquisas é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar em qualquer momento do estudo de pesquisas se você quiser. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista ou avaliação diária. Sua recusa em participar no estudo de pesquisas ou em parte do mesmo, ou sua decisão de interromper sua participação, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações com o Hospital Couto Maia no presente ou no futuro. Uma cópia deste formulário lhe será dada para você. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo de pesquisas, nem receberá compensação financeira.

Benefícios: Não haverá de imediato benefício para o paciente. Mas, indiretamente os participantes estarão contribuindo com informações muito importantes no estudo das meningites que poderão melhorar o controle da doença e aumentar o conhecimento científico.

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo, ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Miralba Oliveira Silva pelo telefone: (071) 312-0084 ou diretamente no Hospital Couto Maia cujo endereço é Rua São Francisco, s/n, Monte Serrat, no. 40, CEP 40.425-001, Salvador, Bahia. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor, entre em contato com a Dra. Marilda Gonçalves, Presidente da Comissão de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3356 4320.

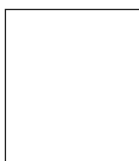
Consentimento:

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos.

Assinatura do paciente (Incluindo Menores)

Data

Hora



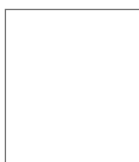
Impressão datiloscopia do paciente

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto que o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou responsável legal participe deste estudo de pesquisas.

Assinatura do pai ou mãe ou responsável legal

Data

hora



Impressão datiloscopia do pai ou mãe ou guardião legal

_____	_____	_____
Assinatura do Investigador	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia****Assentimento para Menores na Investigação Clínica: Pág. 1****Título do Projeto:** Meningite Bacteriana em Salvador, Brasil.**Paciente:** _____ **Nº de****Estudo:** _____

Para ser lido a todos os pacientes menores de idade: As informações que seguem serão para um estudo que estamos realizando. Será feita uma entrevista na qual você deverá responder algumas perguntas. Por favor, escute cuidadosamente e pergunte sobre qualquer dúvida que você tenha.

Nós estamos pedindo para você nos ajudar porque você tem uma infecção. Muitos sinais desta infecção são similares à doença causada por uma infecção nos tecidos que circundam o cérebro que se chama meningite. Nós gostaríamos de conseguir o máximo de informações possíveis para determinar a melhor maneira que podemos tratar e prevenir essa doença. Futuramente, suas informações ajudarão outras pessoas com esse problema.

Se você concordar em ajudar, nós faremos a você e a seus pais algumas perguntas. Nós só iremos te fazer algumas perguntas se você e seus pais concordarem.

Consentimento: Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo em participar:

Assinatura do Paciente Menores de Idade_____
Data_____
Hora

Impressão Digital do Paciente

Assinatura da Testemunha_____
Data_____
Hora_____
Assinatura do Investigador_____
Data_____
Hora

ANEXO IV. CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA *S.pneumoniae*

January 2008

Vol. 28 No. 1

Table 2G
Streptococcus pneumoniae
M7-MIC

Table 2G. MIC Interpretive Standards (µg/mL) for *Streptococcus pneumoniae*

<p>Testing Conditions</p> <p>Medium: Broth dilution; Cation-adjusted Mueller-Hinton broth with lysed horse blood (LHB) (2.5 to 5% v/v)</p> <p>Inoculum: Direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard</p> <p>Incubation: 35 ± 2 °C; ambient air; 20 to 24 hours</p>	<p>Minimal QC Recommendations (See Table 3A for acceptable QC ranges.)</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619</p>
--	--

General Comments

- (1) Only results of testing with penicillin, vancomycin, and cefotaxime or ceftriaxone or meropenem should be reported routinely for CSF isolates of *S. pneumoniae*.
- (2) Instructions for preparation of lysed horse blood are provided in CLSI document M7.
- (3) For some organism/antimicrobial agent combinations, the absence or rare occurrence of resistant strains precludes defining any results categories other than "susceptible." For strains yielding results suggestive of a "nonsusceptible" category, organism identification and antimicrobial susceptibility test results should be confirmed. Subsequently, the isolates should be saved and submitted to a reference laboratory that will confirm results using a CLSI reference dilution method.

NOTE: Information in boldface type is considered tentative for one year.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL)			Comments
		Interpretive Standard			
		S	I	R	
PENICILLINS	Penicillin parenteral (nonmeningitis)	≤ 2	4	≥ 8	<p>See comment (1).</p> <p>(4) Rx: Doses of intravenous penicillin of at least 2 million units every four hours in adults with normal renal function (12 million units per day) can be used to treat nonmeningeal pneumococcal infections due to strains with a penicillin MIC ≤ 2 µg/mL. Strains with an intermediate MIC of 4 µg/mL may require penicillin doses of 18 to 24 million units per day.</p> <p>(5) Rx: A nonmeningitis pneumococcal isolate for which the penicillin MIC is ≤ 2 µg/mL can be considered susceptible to ampicillin (parenteral), amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, cefepime, cefotaxime, and ceftriaxone. A nonmeningitis pneumococcal isolate for which the penicillin MIC is ≤ 0.06 µg/mL can be considered susceptible to ceftizoxime, ertapenem, imipenem, and meropenem. See also comment (9).</p> <p>(6) For all isolates other than those from CSF, report interpretations for both meningitis and nonmeningitis.</p>

Table 2G. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$) Interpretive Standard				Comments
		S	I	R	R	
PENICILLINS						
A	Penicillin parenteral (meningitis)	≤ 0.06	-	≥ 0.12		(7) Rx: Use of penicillin in meningitis requires therapy with maximum doses of intravenous penicillin (eg, at least 3 million units every four hours in adults with normal renal function). (8) For CSF isolates, report only meningitis interpretations.
A	Penicillin (oral penicillin V)	≤ 0.06	0.12-1	≥ 2		(9) Rx: A nonmeningitis pneumococcal isolate for which the penicillin MIC is ≤ 0.06 $\mu\text{g/mL}$ can be considered susceptible to oral ampicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefaclor, cefdinir, cefditoren, cefepodoxime, cefprozil, cefuroxime, and loracarbef for approved indications.
C	Amoxicillin (nonmeningitis)	≤ 2	4	≥ 8		(10) An isolate for which the penicillin MIC is ≥ 0.12 $\mu\text{g/mL}$ may be tested for potential susceptibility to other beta-lactams for which there are interpretive criteria for pneumococci. See also comment (5).
C	Amoxicillin-clavulanic acid (nonmeningitis)	$\leq 2/1$	4/2	$\geq 8/4$		
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.) See comment (1).						
B	Cefepime (nonmeningitis)	≤ 1	2	≥ 4		(11) Only report interpretations for nonmeningitis and include the nonmeningitis notation on the report. There is not a US FDA-approved indication for the use of cefepime for meningitis.
B	Cefepime (meningitis)	≤ 0.5	1	≥ 2		(12) For CSF isolates, report only meningitis interpretations.
B	Cefotaxime (meningitis)	≤ 0.5	1	≥ 2		(13) Rx: Use of cefotaxime or ceftriaxone in meningitis requires therapy with maximum doses.
B	Ceftriaxone (meningitis)	≤ 0.5	1	≥ 2		
B	Cefotaxime (nonmeningitis)	≤ 1	2	≥ 4		(14) For all isolates other than those from CSF, report interpretations for both meningitis and nonmeningitis.
B	Ceftriaxone (nonmeningitis)	≤ 1	2	≥ 4		
C	Cefuroxime (parenteral)	≤ 0.5	1	≥ 2		(15) Rx: For cefuroxime, use of interpretive criteria for nonmeningitis requires doses appropriate for serious pneumococcal infections (eg, at least 1 g [adults] or 50 mg/kg [children] every eight hours or more frequently).

Table 2G

Streptococcus pneumoniae

Table 2G
Streptococcus pneumoniae
M7-MIC

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL) Interpretive Standard				Comments
		S	I	R		
CEPHEMS (ORAL)						
O	Cefaclor	≤ 1	2	≥ 4		
O	Cefdinir	≤ 0.5	1	≥ 2		
O	Cefepime	≤ 0.5	1	≥ 2		
O	Cefprozil	≤ 2	4	≥ 8		
O	Cefuroxime (oral)	≤ 1	2	≥ 4		
O	Loracarbef	≤ 2	4	≥ 8		
CARBAPENEMS						
B	Meropenem	≤ 0.25	0.5	≥ 1	See comment (1).	
C	Ertapenem	≤ 1	2	≥ 4		
C	Imipenem	≤ 0.12	0.25-0.5	≥ 1		
GLYCOPEPTIDES						
B	Vancomycin	≤ 1	-	-	See comment (1). See comment (3).	
MACROLIDES						
A	Erythromycin	≤ 0.25	0.5	≥ 1	(16) Susceptibility and resistance to azithromycin, clarithromycin, and dirithromycin can be predicted by using erythromycin.	
O	Azithromycin	≤ 0.5	1	≥ 2	(17) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.	
O	Clarithromycin	≤ 0.25	0.5	≥ 1		
O	Dirithromycin	≤ 0.5	1	≥ 2		
KETOLIDES						
B	Telithromycin	≤ 1	2	≥ 4		
TETRACYCLINES						
B	Tetracycline	≤ 2	4	≥ 8	(18) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline.	
FLUOROQUINOLONES						
B	Gemifloxacin	≤ 0.12	0.25	≥ 0.5		
B	Levofloxacin	≤ 2	4	≥ 8		
B	Moxifloxacin	≤ 1	2	≥ 4		
B	Ofloxacin	≤ 2	4	≥ 8		
O	Gatifloxacin	≤ 1	2	≥ 4		
O	Grepafloxacin	≤ 0.5	1	≥ 2		
O	Sparfloxacin	≤ 0.5	1	≥ 2		
O	Trovafloxacin	≤ 1	2	≥ 4		
FOLATE PATHWAY INHIBITORS						
A	Trimethoprim-sulfamethoxazole	≤ 0.5/9.5	1/19-2/38	≥ 4/76		
PHENICOLS						
C	Chloramphenicol	≤ 4	-	≥ 8	See comment (17).	
ANSAMYCINS						
C	Rifampin	≤ 1	2	≥ 4	(19) R _c : Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.	
LINCOSAMIDES						
B	Clindamycin	≤ 0.25	0.5	≥ 1	See comment (17).	
STREPTOGRAMINS						
O	Quinupristin-dalfopristin	≤ 1	2	≥ 4		
OXAZOLIDINONES						
C	Linezolid	≤ 2	-	-	See comment (3).	

**ANEXO V. VALORES ACEITÁVEIS PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA
NO TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE CIM
PARA *S.pneumoniae***

January 2008

Vol. 28 No. 1

Table 3A. Acceptable Limits for Quality Control Strains Used to Monitor Accuracy of Disk Diffusion Testing of Fastidious Organisms

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 ^a	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619 ^b
Amoxicillin-clavulanic acid ^c	20/10 µg	15-23	-	-	-
Ampicillin	10 µg	13-21	-	-	30-36
Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	14-22	-	-	-
Azithromycin	15 µg	13-21	-	-	19-25
Aztreonam	30 µg	30-38	-	-	-
Cefaclor	30 µg	-	25-31	-	24-32
Cefdinir	5 µg	-	24-31	40-49	26-31
Cefditoren	5 µg	25-34	-	-	27-35
Cefepime	30 µg	25-31	-	37-46	28-35
Cefetamet	10 µg	23-28	-	35-43	-
Cefixime	5 µg	25-33	-	37-45	16-23
Cefmetazole	30 µg	16-21	-	31-36	-
Cefonicid	30 µg	-	30-38	-	-
Cefotaxime	30 µg	31-39	-	38-48	31-39
Cefotetan	30 µg	-	-	30-36	-
Cefoxitin	30 µg	-	-	33-41	-
Cefpodoxime	10 µg	25-31	-	35-43	28-34
Cefprozil	30 µg	-	20-27	-	25-32
Ceftaroline	30 µg	29-39	-	-	31-41
Ceftazidime	30 µg	27-35	-	35-43	-
Ceftibuten	30 µg	29-36	-	-	-
Ceftizoxime	30 µg	29-39	-	42-51	28-34
Ceftobiprole ^d	30 µg	28-36	30-38	-	33-39
Ceftriaxone	30 µg	31-39	-	39-51	30-35
Cefuroxime	30 µg	-	28-36	33-41	-
Cephalothin	30 µg	-	-	-	26-32
Chloramphenicol	30 µg	31-40	-	-	23-27
Ciprofloxacin	5 µg	34-42	-	48-58	-
Clarithromycin	15 µg	11-17	-	-	25-31
Clinafloxacin	5 µg	34-43	-	-	27-34
Clindamycin	2 µg	-	-	-	19-25
Daptomycin ^e	30 µg	-	-	-	19-26
Dinithromycin	15 µg	-	-	-	18-25
Doripenem	10 µg	21-31	-	-	30-38
Enoxacin	10 µg	-	-	43-51	-
Ertapenem	10 µg	20-28	27-33	-	28-35
Erythromycin	15 µg	-	-	-	25-30
Faropenem	5 µg	15-22	-	-	27-35
Fleroxacin	5 µg	30-38	-	43-51	-
Garenoxacin	5 µg	33-41	-	-	26-33
Gatifloxacin	5 µg	33-41	-	45-56	24-31
Gemifloxacin	5 µg	30-37	-	-	28-34
Grepafoxacin	5 µg	32-39	-	44-52	21-28
Iclaprim	5 µg	24-33	-	-	21-29
Imipenem	10 µg	21-29	-	-	-
Levofloxacin	5 µg	32-40	-	-	20-25
Linezolid	30 µg	-	-	-	25-34
Lomefloxacin	10 µg	33-41	-	45-54	-
Loracarbef	30 µg	-	26-32	-	22-28
Meropenem	10 µg	20-28	-	-	28-35
Moxifloxacin	5 µg	31-39	-	-	25-31
Nitrofurantoin	300 µg	-	-	-	23-29
Norfloxacin	10 µg	-	-	-	15-21
Ofloxacin	5 µg	31-40	-	43-51	16-21
Oxacillin	1 µg	-	-	-	≤ 12 ^f
Penicillin	10 units	-	-	26-34	24-30
Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	33-38	-	-	-
Quinupristin-dalfopristin	15 µg	15-21	-	-	19-24
Rifampin	5 µg	22-30	-	-	25-30

For Use With M2-A9—Disk Diffusion

M100-S18

Table 3A. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 ^a	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619 ^b
Sparfloxacin	5 µg	32-40	-	43-51	21-27
Spectinomycin	100 µg	-	-	23-29	-
Telavancin	30 µg	-	-	-	17-24
Telithromycin	15 µg	17-23	-	-	27-33
Tetracycline	30 µg	14-22	-	30-42	27-31
Tigecycline	15 µg	23-31	-	30-40	23-29
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	24-32	-	-	20-28
Trospectomycin	30 µg	22-29	-	28-35	-
Trovafloxacin	10 µg	32-39	-	42-55	25-32
Vancomycin	30 µg	-	-	-	20-27

Disk Diffusion Testing Conditions for Clinical Isolates and Performance of Quality Control

Organism	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Streptococci and <i>Neisseria meningitidis</i>
Medium	<i>Haemophilus</i> Test Medium	GC agar base and 1% defined growth supplement. The use of a cysteine-free growth supplement is not required for disk diffusion testing.	MHA supplemented with 5% defibrinated sheep blood
Inoculum	Direct colony suspension	Direct colony suspension	Direct colony suspension
Incubation Characteristics	5% CO ₂ ; 16 to 18 hours; 35 °C	5% CO ₂ ; 20 to 24 hours; 35 °C	5% CO ₂ ; 20 to 24 hours; 35 °C

NOTE: Information in boldface type is considered tentative for one year.

Footnotes

- ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.
- Despite the lack of reliable disk diffusion interpretive criteria for *S. pneumoniae* with certain β-lactams, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 is the strain designated for quality control of all disk diffusion tests with all *Streptococcus* spp.
- When testing *Haemophilus* on HTM, the acceptable limits for QC strain *E. coli* ATCC® 35218 are 17 to 22 mm for amoxicillin-clavulanic acid when incubated in ambient air.
- Either *H. influenzae* ATCC® 49247 or 49766 may be used for routine quality control testing.
- Some lots of Mueller-Hinton agar are deficient in calcium and give small zones.
- Deterioration in oxacillin disk content is best assessed with QC organism *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, with an acceptable zone diameter of 18 to 24 mm.