

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

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha

**TIPAGEM MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DA
NASOFARINGE DE CRIANÇAS NO CONTEXTO DA VACINAÇÃO
PNEUMOCÓCICA**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Cristina Pimenta

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia S.S. Andrade

Tese de Doutorado

Goiânia

2010

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

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha

**TIPAGEM MOLECULAR DE *Streptococcus pneumoniae* ISOLADOS DA
NASOFARINGE DE CRIANÇAS NO CONTEXTO DA VACINAÇÃO
PNEUMOCÓCICA**

**Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Fabiana Cristina
Pimenta**

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Ana Lúcia S. S. Andrade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Tropical, na área de concentração em Microbiologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Goiânia

2010

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

R672t Rocha, Cristyane Gonçalves Benicio Bastos.
Tipagem molecular de *Streptococcus pneumoniae*
isolados da nasofaringe de crianças no contexto da vacinação
pneumocócica [manuscrito] / Cristyane Gonçalves Benicio
Bastos Rocha. - 2010.

64 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Cristina Pimenta; Co-
orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia S. S. Andrade.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.

Inclui listas de quadros, tabelas e abreviaturas.

Bibliografia.

1. Pneumococos. 2. Nasofaringe – crianças. 3. Sorotipos.
I. Título.

CDU: 579.862

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Sonia Beatriz (mãe maravilhosa),
Zander, Júlia, Mateus e Mariane.*

AGRADECIMENTOS

“Agradeço as mãos que me constroem a existência, decorando-a com tintas de alegria e esperança, mas endereço os meus pensamentos de gratidão àquelas outras que com a incompreensão, ensinam me a conviver e a servir”.

“Agradeço as vozes que me embalam os anseios, que me inspiram às melhores realizações, no entanto, envio as minhas vibrações de reconhecimento àquelas outras que me induzem a compreender e a perdoar”.

Meimei

A Deus, Ney e Sonia, Zander, Júlia, Mariane e Mateus, Fabiana Cristina Pimenta, Ana Lúcia S.S. Andrade, Juliana Lamaro Cardoso, meus demais familiares, amigos, aos colegas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG e àqueles que de qualquer forma contribuíram para a execução desta tese.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
SUMÁRIO	5
LISTA DE QUADROS E TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Colonização da nasofaringe por <i>S. pneumoniae</i>	11
1.2 Resistência antimicrobiana	14
1.3 Convencional Multiplex PCR	16
1.4 MLST (<i>multilocus sequence typing</i>)	17
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Amostra do estudo	20
4.2 Coleta de <i>swab</i> de nasofaringe	21
4.3 Isolamento e identificação	21
4.4 Teste de suscetibilidade	22
4.5 Sorotipagem	22
4.6 Tipagem capsular pela técnica de multiplex PCR	23
4.7 Tipagem por sequenciamento de múltiplos <i>locus</i> gênicos (MLST)	27
5 MANUSCRITOS	29
5.1 Artigo de revisão	30
5.2 Artigo original	47
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8 ANEXOS	64

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – <i>Primers</i> de oligonucleotídeos utilizados para as reações seqüenciais no multiplex PCR	24
Table 1 - Pneumococcal nasopharyngeal carriage serotype distribution, Minimal Inhibitory Concentration and Multilocus Sequence Types from healthy children less than 5 years old attending day care centers in Brazil	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	<i>Active Bacterial Core Surveillance</i>
ACIP	<i>Advisory Commitee on Immunization Practices</i>
AC	<i>Acute conjunctivitis</i>
AOM	<i>Acute otitis media</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i>
CMEI	Centro Municipal de Educação Infantil
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONEP	Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa
CRM197	<i>Non-toxic mutant variant of diphtheria toxin 197</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
HCl	Ácido clorídrico
IPD	<i>Invasive Pneumococcal Disease</i>
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
IRA	Infecção Respiratória Aguda
KCl	Cloreto de Potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MIC	<i>Minimall inhibitory concentration</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MS	Ministério da Saúde
NF	Nasofaringe
NP	<i>Nasopharyngeal</i>
NIP	<i>National Immunization Program</i>
NT	<i>Non-typeable</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
PBP	<i>Protein Binding Penicilin</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCV	<i>Pneumococcal Conjugate Vaccine</i> (Vacina pneumocócica conjugada)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel em campo pulsado)
ST	<i>Sequence Type</i>
Th2	<i>T helper 2 cells</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Objetivos: (i) Apresentar uma revisão focando as vacinas pneumocócicas e o portador de *S. pneumoniae* na nasofaringe; (ii) realizar a tipagem capsular de pneumococos colonizadores de nasofaringe de crianças de creches pela técnica de multiplex PCR; (iii) identificar o perfil MLST dos pneumococos isolados na nasofaringe; (iv) identificar os tipos capsulares de múltiplas colônias de *S. pneumoniae* isolados de uma única amostra de secreção da nasofaringe de crianças que frequentam creches do município de Goiânia pela técnica de multiplex PCR.

Material e Métodos: Um estudo de prevalência de portador de pneumococo foi conduzido de agosto a dezembro de 2005, em crianças de dois a 59 meses de idade, atendidas em 62 creches em Goiânia. Os procedimentos laboratoriais para isolamento e identificação dos pneumococos foram realizados de acordo com as técnicas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde. Foram selecionados 217 isolados (resistentes e sensíveis à penicilina) para a tipagem capsular pela técnica de multiplex PCR. O perfil MLST foi realizado para 55 isolados, representando os sorotipos detectados e os diferentes perfis de suscetibilidade à penicilina. A reação de Quellung foi usada para tipar os sorotipos 6A, 6B e 18C e os isolados não tipados pelo multiplex PCR. Para a análise de múltiplas colônias de *S. pneumoniae*, utilizou-se 28 amostras positivas para pneumococo, das quais se recuperou 3 colônias de cada placa de ágar sangue, totalizando 84 colônias, que foram submetidas aos testes de tipagem fenotípica e caracterização capsular pela técnica de multiplex PCR.

Resultados: Cento e setenta e sete sorotipos em duzentos e dezessete (177/217), totalizando 81,6% dos pneumococos foram tipados. Os sorotipos mais frequentes foram 14, 6, 23F, 19F e 18. Foram identificadas múltiplas colônias em 13 amostras de nasofaringe. Foram observados 19 tipos MLST e dois novos tipos de seqüência (ST). Quarenta (18,4%) dos isolados não foram tipados pelo multiplex PCR e todos não tipados pela reação de Quellung. A análise de múltiplas colônias de *S. pneumoniae* pela técnica de multiplex PCR permitiu a detecção de mais de um tipo em 25% (7/28) das amostras.

Conclusões: (i) O método de multiplex PCR mostrou-se seguro e simples na detecção de diferentes tipos capsulares incluídos na reação, além de mais barato; (ii) representou uma valiosa ferramenta em investigações de vigilância de pneumococos; (iii) Aplicação da

técnica multiplex PCR permitiu o conhecimento da diversidade genética de pneumococos colonizadores da nasofaringe, detectando a dinâmica da colonização desta bactéria na população, incluindo a colonização por múltiplos sorotipos; a substituição ou mudança de sorotipo como resultado da vacinação; como também vigilância das doenças pneumocócicas invasivas.

Palavras chave: pneumococos, portador, nasofaringe, sorotipos, convencional multiplex PCR.

ABSTRACT

Objectives – (i) Present review article focusing on pneumococcal vaccines and carriage; (ii) to validate sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from children attending day-care centers; (iii) determine the multilocus sequence typing; (iv) to identify the capsular types of multiple colonies of *S. pneumoniae* isolates from a single sample of nasopharyngeal secretions of children attending day-care centers in Goiânia.

Materials and Methods – *S. pneumoniae* was obtained from health children less than 5 years old attending 62 day care centers of Goiânia. The laboratory procedures were performed according to WHO recommendations. Were selected 217 isolates (penicillin resistant and sensitive) for capsular typing by multiplex PCR technique. MLST was performed for 55 isolates representing the serotypes detected and the different susceptibility patterns for penicillin. Quellung reaction was used for typing isolates serotypes 6A, 6B, 18C and the isolates not typed by multiplex PCR. For 28 presumptive pneumococcal positive NP swabs, 3 colonies were picked to access possible serotype diversity. Eighty four pneumococci were identified by conventionally procedure and multiplex PCR was performed.

Results – Serotypes were deduced for 177/217 (81.6%) of the pneumococcal. The most frequent serogroups/serotypes were 14, 6, 23F, 19F and 18. Multiple serotypes were detected in 13 specimens. Were found 19 MLST types and two new ST. Forty (18.4%) were not serotyped by the multiplex PCR and quellung reaction. The analysis of three colonies from the same NP permitted the detection of different serotypes in 7/28 (25%) NP samples.

Conclusion – (i) The multiplex PCR is simple and cost-effective method for detecting multiple serotypes in nasopharyngeal isolates; (ii) and thus might be useful for the monitoring of pneumococcal colonization over time; (iii) the use of multiplex PCR can further broaden our understanding of the dynamics of pneumococcal carriage, including multiple serotypes, the effect of vaccination on carriage, and transmission, as well as surveillance of IPD and co-colonization.

Key words: pneumococcal, nasopharyngeal carriage, serotype, conventional multiplex PCR

1 INTRODUÇÃO

1.1 Colonização da nasofaringe por *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é a maior causa de doença e morte em crianças e adultos em todo mundo (WHO 2008). As doenças pneumocócicas matam 1,6 milhões de pessoas anualmente, na maioria crianças e idosos, incluindo mais de 800 mil crianças menores de cinco anos (WHO 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) conduziu um estudo multicêntrico com crianças maiores de 90 dias atendidas em ambulatórios das Filipinas, Gâmbia, Etiópia e Papua Nova Guiné, e concluiu que *S. pneumoniae* foi o microrganismo mais comumente isolado com taxa de mortalidade de 33% por doença pneumocócica invasiva (WHO 1999a, WHO 1999b).

S. pneumoniae são cocos Gram-positivos visualizados aos pares, de forma lanceolada ou em cadeias curtas; catalase negativos, que produzem alfa-hemólise em ágar sangue; suscetíveis à optoquina e solúveis em sais biliares (Koneman et al. 2001). Possuem uma cápsula externa polissacarídica ligada à parede celular e podem ser classificados em 91 sorotipos diferentes devido a diferenças antigênicas entre os polissacarídeos capsulares (Muscher 2000, Park et al. 2007).

O principal fator de virulência do pneumococo é a cápsula polissacarídea, a qual protege a bactéria da fagocitose pelos polimorfonucleares durante o processo de invasão. Logo, a virulência desta bactéria difere entre os sorotipos, sendo alguns considerados mais virulentos por estarem mais associados às doenças (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 19A), enquanto outros sorotipos são frequentemente isolados de portadores sadios (Porat et al. 2001).

S. pneumoniae coloniza a nasofaringe (NF) humana fazendo parte da microbiota normal e transitória local (Ghaffar et al. 1999). A sua transmissão é pela via respiratória de pessoa a pessoa mediada por aerossóis. Após a colonização da nasofaringe e, dependendo das condições imunológicas do indivíduo e dos fatores de risco associados às infecções

pneumocócicas, o pneumococo pode invadir o organismo, causando doença (Bogaert et al. 2001, Dunais et al. 2003).

Em um estudo realizado no Gâmbia, a prevalência de portadores de *S. pneumoniae* em crianças menores de um ano foi de 97%, sendo que a idade média de aquisição do pneumococo foi de 33 dias. Os sorotipos não vacinais foram adquiridos mais rapidamente e permaneceram por um período menor quando comparado com os sorotipos vacinais (Hill et al. 2006). Embora a proteção da vacina conjugada seja conhecida como sorotipo-específica, a redução na colonização dos tipos vacinais pode potencialmente abrir um nicho ecológico para os sorotipos não vacinais ou para outra bactéria, além disso, é necessário avaliar como a colonização se converte em doença e como isso pode ser controlado (Obaro & Adegbola 2002).

Segundo Muscher (2005), as crianças adquirem *S. pneumoniae* entre os 4 e 6 meses de idade. Interações inter-espécies podem ocorrer e interferir com a composição da microbiota da NF. O equilíbrio entre a microbiota residente e a transitória patogênica é importante. A microbiota autóctone, incluindo estreptococos do grupo viridans, pode inibir a colonização por *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Moraxella catarrhalis* (Ghaffar et al. 1999, Garcia-Rodriguez & Fresnadillo Martinez 2002). As taxas de colonização bacteriana dependem da idade, área geográfica, antecedentes genéticos e condições socioeconômicas (Bogaert et al. 2001).

A NF também atua como uma importante fonte de propagação horizontal deste patógeno dentro da comunidade. Em aglomerados como hospitais, creches, prisões, entre outros se observa um aumento na propagação horizontal do pneumococo (Hoge et al. 1994, Millar et al. 1994, Principi et al. 1999). As crianças apresentam a maior frequência de colonização pneumocócica, sendo consideradas os vetores mais importantes de transmissão horizontal dos pneumococos dentro da comunidade. Por isso, parte da estratégia de prevenção da doença pneumocócica centra-se na prevenção de colonização nasofaríngea, especialmente em crianças (Leiberman et al. 1999, Givon-Lavi et al. 2002).

Gray et al. (1980) em estudo longitudinal relataram que nos primeiros 24 meses de vida, as crianças foram colonizadas por *S. pneumoniae*, com 73% destas adquirindo pelo

menos dois sorotipos em ocasiões diferentes, 4% apresentaram dois e 0,3% três sorotipos ao mesmo tempo.

Sá-Leão et al. (2008) conduziram um estudo longitudinal com crianças em creches para observar a dinâmica de colonização por pneumococos. Foram identificados 61,4% de pneumococos, com apenas 8,3% de amostras negativas. Detectaram 21 clones de pneumococos. Noventa e oito por cento de todos os pneumococos pertenciam a clones compartilhados por mais de uma criança. As crianças foram sequencialmente colonizadas por cinco diferentes sorotipos e mais de seis clones de pneumococos (média de 3,6). Concluíram que as creches são unidades em que ocorrem introdução e disseminação horizontal de novos clones bacterianos e a nasofaringe das crianças constituem o reservatório desses clones.

Pettigrew et al. (2008) avaliaram as interações microbianas na NF de crianças, com até um ano de idade, com infecções do trato respiratório superior. Observaram que a colonização simultânea por *H. influenzae* e *M. catarrhalis* esteve positivamente associada com a colonização com *S. pneumoniae*. Enfatizaram que o impacto de uma intervenção na microbiota da NF em virtude de uma estratégia de saúde pública, como a vacinação para o *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, deve ser monitorado para o entendimento da dinâmica microbiana.

Vestheim et al. (2008) realizaram um estudo transversal e observaram um pico de prevalência de portador assintomático em 88,7% das crianças com idade entre dois e três anos e mais de um sorotipo foi isolado de 12,7% dos portadores. Do total de isolados, 44,6% pertenciam aos sorotipos vacinais da heptavalente; 4,7% dos isolados foram não tipáveis. A resistência à penicilina foi rara (1,8%) e o perfil do MLST revelou 102 tipos dos quais 31 (30,4%) foram considerados como novos tipos. Onze isolados pertenciam ao clone England¹⁴-9, e dezenove isolados (3,7%) a variante do *locus* simples do clone Portugal^{19F}-21.

Andrade et al. (2003), utilizando a técnica de PFGE, demonstraram a identidade genética entre cepas do LCR e NF de duas crianças com meningite pneumocócica.

A prevalência de portadores de pneumococos foi avaliada em crianças saudáveis, com meningite e IRA (infecção respiratória aguda) no município de Goiânia. Foi verificada

uma prevalência de 35,8% de portadores na nasofaringe de pneumococo. Os sorotipos mais frequentes foram: 14, 6B, 6A, 19F 10A, 23F e 18C, os quais estão incluídos na vacina conjugada 7-valente. Os sorotipos 4 e 9V foram menos comuns e os sorotipos 1 e 5 foram raramente isolados da nasofaringe. A cobertura de sorotipos da vacina em relação aos sorotipos colonizadores e invasivos (meningite) foi respectivamente 52,2% e 62,4%. O estudo mostrou o potencial benefício da vacina 7-valente na redução de portador e de pneumococos resistentes à penicilina (Laval et al. 2006).

S. pneumoniae sorotipo 6C foi recentemente descrito por Park et al. (2007). Nunes et al. (2009) avaliaram a coleção de pneumococos isolados da NF de crianças que frequentavam creches em Portugal e 2,6% foram tipados como sorotipo 6C, dos quais, 17,9% eram multirresistentes. No Brasil, Campos et al. (2009) identificaram o sorotipo 6C em 2,3% dos casos de meningite e em 3,2% dos isolados de nasofaringe de adultos saudáveis, sendo 18,8% multirresistentes. Apesar da baixa prevalência, é necessário vigilância contínua para conduzir estratégias vacinais.

1.2 Resistência antimicrobiana

A resistência do pneumococo aos antimicrobianos apresenta variação regional e geográfica e resulta de mecanismos específicos. O mecanismo de resistência às penicilinas é mediado por genes cromossômicos que comandam alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas, as PBPs 1a, 1b, 2x, 2a, 2b e 3, que passam a apresentar baixa afinidade de ligação às penicilinas (Smith & Klugman 1998). Em relação a outros antimicrobianos, a resistência à eritromicina é devida a modificação no ribossomo e presença de um sistema de efluxo, enquanto a resistência ao cotrimoxazol é resultante de modificações no metabolismo dos folatos; a resistência às tetraciclinas deve-se a um mecanismo de proteção do ribossomo e a do cloranfenicol à produção de uma acetiltransferase (Crook & Spratt 1998).

Os pneumococos com elevada resistência às penicilinas frequentemente mantêm a sensibilidade às fluoroquinolonas antipneumocócicas (levofloxacin, gatifloxacin, esparfloxacin, clinafloxacin) e aos glicopeptídeos (Gums 2003).

A nasofaringe pode ser considerada como o berço dos pneumococos resistentes uma vez que os estudos sobre os sorotipos de clones resistentes sugerem a associação da emergência desses clones a partir do reservatório ecológico (nasofaringe) e disseminação para sítios da doença (de Lencastre & Tomaz 2002).

Entre as cepas invasivas de pneumococo, a resistência à penicilina tem aumentado ano a ano no Brasil. Esta resistência é mais prevalente entre as estirpes isoladas de crianças de até 4 anos de idade. Os sorotipos associados à resistência à penicilina são o 6A, 6B, 14, 19F, 19A e 23F; logo, a vacina conjugada 7-valente contempla os sorotipos associados à resistência, com exceção do 19A, com uma cobertura estimada em 91% dos isolados associados à resistência à penicilina. Entre isolados de casos de meningites, a resistência à cefalosporina de terceira geração encontra-se em percentual baixo, aproximadamente 2,5% (Brandileone et al. 1997).

Rey et al. (2002) compararam as taxas de colonização e a resistência antimicrobiana de pneumococos em nasofaringe de crianças saudáveis e com pneumonia. A taxa de portador de pneumococos foi maior em crianças saudáveis do que naquelas com pneumonia. A resistência dos pneumococos à penicilina e ao cotrimoxazol foi elevada, sobretudo entre os usuários de creches públicas.

Ferreira et al. (2001), avaliaram a prevalência e os fatores de risco para a colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae* e determinaram o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em crianças que apresentavam quadro clínico de rinofaringite aguda. A prevalência da colonização nasofaríngea foi de 35%. A análise dos fatores de risco associados à colonização nasofaríngea indicou que as crianças que eram institucionalizadas e que tinham irmãos menores de cinco anos apresentaram uma taxa maior de colonização. A prevalência de isolados não suscetíveis à penicilina foi de 16%. Não foi observada resistência à ceftriaxona, claritromicina ou cloranfenicol. Este fato sugere que os isolados de pneumococo da nasofaringe de crianças com infecção respiratória alta podem ser usados em estudos de vigilância da resistência antimicrobiana numa determinada comunidade.

Andrade et al. (2004) relataram um caso de infecção pneumocócica invasiva, em uma criança saudável com 10 meses de idade, com a detecção de dois sorotipos. *S. pneumoniae* sorotipo 23F foi isolado a partir do sangue e sorotipo 23B foi isolado do

líquido cefalorraquidiano. Ambos isolados apresentaram resistência à penicilina. A análise do perfil genotípico pela eletroforese em campo pulsado revelou padrões distintos de DNA, indicando possivelmente que a infecção ocorreu como um resultado de uma infecção mista com dois distintos sorotipos pneumocócicos.

Franco et al. (2010) avaliaram a colonização da nasofaringe de 1192 crianças usuárias de creches do município de Goiânia, Goiás – Brasil. *S. pneumoniae* foi isolado da NF de 686 crianças e 178 (25,9%) deles apresentaram resistência à penicilina. Os sorotipos 14 (53%), 23F (10,2%), 6B (6%), 19F (4,8%) e 19A (4,2%), representaram 78,2% dos pneumococos resistentes. Houve uma alta prevalência 76 (11,1%) de pneumococos não tipados, dos quais 62,9% eram resistentes à penicilina.

O uso criterioso de antibióticos, os dados de vigilância regionais e o reconhecimento das crianças com maior risco para a aquisição de infecções com patógenos resistentes são extremamente importantes e constituem um permanente desafio.

1.3 Convencional Multiplex PCR

Métodos de tipagem molecular são muito utilizados para auxiliar estudos epidemiológicos e também fundamentais no subsídio de pesquisas relacionadas a programas de vacinação.

Segundo O'Brien & Nohynek (2003) não existe um método único disponível para identificar múltiplos sorotipos simultâneos de uma amostra original sem o passo da cultura, uma vez que iniciadores específicos (primers) para todos os tipos de cápsula, ainda não estão disponíveis. O alto custo dos antisoros, subjetividade na interpretação e habilidade técnica, constituem sérias desvantagens do método clássico de aglutinação para determinação sorológica. O desenvolvimento de técnicas de tipagem baseado no sistema convencional de multiplex PCR é simples e efetivo para tipar sorotipos em grande número de isolados (Pai et al. 2006).

Técnicas de biologia molecular estão sendo avaliadas para a tipagem capsular do pneumococo. O método de multiplex PCR tem apresentado boa sensibilidade e

especificidade na detecção dos sorotipos e sorogrupos incluídos na reação (Brito et al. 2003, Lawrence et al. 2003, Moreno et al. 2005)

Pai et al. (2006) delineararam um sistema de tipagem capsular para o pneumococo, compreendendo 29 sorotipos, com sete reações sequenciais, baseado na sequência de multiplex PCR. Um total de 421 *S. pneumoniae* do *Active Bacterial Core Surveillance* (ABCs) foram selecionados aleatoriamente para validar a técnica. Em 229 (54,4%) tipagens capsulares, os resultados apresentaram completa concordância como a sorotipagem convencional. Um total de 172 (40,9%) pneumococos foi caracterizado em sorogrupo e somente 20 isolados não foram tipados por se tratarem de sorotipos raros não incluídos nas reações ou não sorotipáveis. A técnica de multiplex PCR mostrou-se altamente segura, mais barata, além de representar uma valiosa ferramenta em investigações de vigilância de pneumococos.

1.4 MLST (*multilocus sequence typing*)

Esta técnica consiste no sequenciamento e análise de fragmentos de 7 genes conservados ao longo do genoma microbiano com pelo menos 100 Kb de distância um do outro. A vantagem desta técnica é que a diferença entre linhagens é indexada diretamente nas sequências de DNA. Como estes genes evoluem muito lentamente, se tornam ideais para estudos de epidemiologia e identificação (Maiden et al. 1998). Além disto, sequências gênicas podem ser armazenadas em bancos de dados eletrônicos de domínio público e comparadas com facilidade no site (<http://www.mlst.net>)

O MLST tem sido utilizado para identificar a transferência de clones de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina e a outros antimicrobianos em diversos países (Pai et al. 2005, Sousa et al. 2005, Smith et al. 2006, Marimon et al. 2006, Reinert et al. 2007)

A desvantagem do MLST é o alto custo de equipamentos e reagentes, o que dificulta a execução da técnica na maioria dos laboratórios.

2 JUSTIFICATIVA

Desde maio de 2000 um grupo de pesquisadores sob a coordenação geral da Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia S. S. Andrade, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, apoiados pela Secretaria Municipal da Saúde de Goiânia, pela Divisão de Imunização e Vacinas da Organização Mundial de Saúde/PAHO, pelo Instituto Adolf Lutz de São Paulo e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), implantaram um sistema de vigilância ativa, prospectiva e populacional do *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *S. aureus* em crianças menores de cinco anos de idade no município de Goiânia com o objetivo de construir um banco de dados epidemiológicos antes da introdução das vacinas conjugadas contra o pneumococo nos serviços de saúde pública (Andrade et al. 2004, Franco et al. 2010).

Portanto, dentro deste contexto, este trabalho avança na determinação da diversidade genética de pneumococos isolados da nasofaringe de crianças menores de 5 anos de idade que frequentam creches do município de Goiânia-Goiás com o intuito de proporcionar informações úteis para a otimização e caracterização específica deste microrganismo. A investigação subsidia estratégias preventivas e de controle mais eficientes, uma vez que as crianças são especialmente suscetíveis à condição de portador podendo ser colonizadas por inúmeras bactérias com diferentes sorotipos. Além disso, o conhecimento da diversidade dos pneumococos determinará a necessidade do estudo de uma ou múltiplas colônias de pneumococos.

3 OBJETIVOS

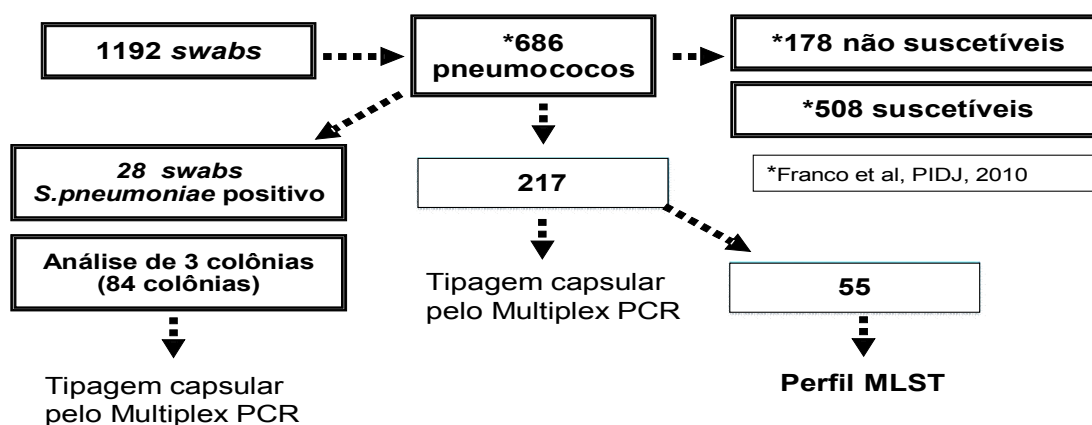
- Apresentar uma revisão focando as vacinas pneumocócicas e o portador de *S. pneumoniae* na nasofaringe
- Realizar a tipagem capsular de pneumococos colonizadores de nasofaringe de crianças de creches pela técnica de multiplex PCR;
- Identificar o perfil MLST dos pneumococos isolados na nasofaringe;
- Identificar os tipos capsulares de múltiplas colônias de *S. pneumoniae* isolados de uma única amostra de secreção da nasofaringe de crianças que frequentam creches do município de Goiânia pela técnica de multiplex PCR;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra do estudo

Este estudo utilizou a estrutura de um estudo maior, no qual foram coletadas 1192 amostras de nasofaringe de crianças menores de 5 anos de 62 creches de Goiânia (Franco et al. 2010)

Foram selecionados 217 isolados (resistentes e sensíveis à penicilina) para tipagem capsular pela técnica de multiplex PCR e 55 para determinação do perfil MLST. Para a análise de múltiplas colônias de *S. pneumoniae*, utilizou-se 28 amostras positivas para pneumococo, das quais recuperou-se três colônias de cada placa de ágar sangue, totalizando 84 colônias, que foram submetidas aos testes de tipagem fenotípica e caracterização capsular pela técnica de multiplex PCR.



Fluxograma: Amostragem de *S. pneumoniae* utilizada no estudo.

4.2 Coleta de *swab* de nasofaringe

As amostras foram obtidas utilizando um *transwab* (*Transwab* Medical Wire & Equipment Corsham, UK) ultrafino e flexível em uma das narinas da criança, até aproximadamente 2/3 da distância do nariz ao lóbulo da orelha, na direção horizontal, até encontrar um ponto de resistência. Na parede posterior da nasofaringe, movimentos giratórios lentos foram aplicados com o *transwab* que em seguida foi removido e inoculado no meio para transporte (meio modificado de *Stuart – Medical Wire & Equipment Corsham*, UK). Posteriormente, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás - IPTSP/UFG para processamento, dentro de, no máximo, duas horas da coleta.

4.3 Isolamento e identificação

Os procedimentos laboratoriais para isolamento e identificação foram realizados de acordo com as técnicas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1994). As amostras da nasofaringe foram semeadas no meio Columbia Blood Agar (Difco, Detroit, Mich.) suplementado com 5% de sangue de carneiro e 5 µg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.). As placas foram incubadas em microaerofilia a 35°C por 24 horas. As colônias sugestivas de *S. pneumoniae* com α - hemólise foram examinadas microscopicamente após a coloração pelo método de Gram. As colônias foram identificadas pelo teste de sensibilidade à optoquina (disco com 5 µg/mL - CECON, São Paulo, Brasil), com halo de inibição \geq 14mm à volta de um disco de 6mm de optoquina; e pela prova de solubilidade em bile, observando uma redução da turbidez da suspensão que reflete a lise bacteriana e confere um resultado positivo à prova (Ruoffs et al. 1995). Os isolados ainda foram repicados em caldo de TSB (tripticase soy broth) suplementado com 20% de glicerol e estocados a -80°C.

4.4 Teste de suscetibilidade

Difusão em disco de oxacilina

A suscetibilidade dos pneumococos foi avaliada pelo método de difusão em disco de oxacilina (CLSI 2007). Um inóculo padrão de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml (0,5 da Escala de Mac Farland) foi obtido e semeado em placas de ágar Müller-Hinton, suplementado com 5% de sangue de carneiro, com o auxílio de *swab* esterilizado. Sobre as placas foi depositado o disco de oxacilina (OXOID, Basingstoke, Inglaterra) que foram incubadas a 35°C por 24 horas. O controle de qualidade foi realizado com cepas ATCC de *S. pneumoniae* 49619. A leitura e identificação dos halos de inibição foram realizadas segundo os critérios do CLSI (CLSI 2007).

Etest®

Os isolados não suscetíveis à oxacilina (halo ≤ 19 mm) foram submetidos ao E-Test® de acordo com as recomendações do (CLSI 2007), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em relação à penicilina. *S. pneumoniae* foram cultivados em ágar sangue e incubados em microaerofilia por 24 horas a 35°C. Um inóculo de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml foi preparado e semeado em ágar Müller-Hinton enriquecido com 5% de sangue de carneiro. Tiras contendo concentrações seriadas de penicilina (Etest®) foram depositadas sobre as placas e incubadas por 24 horas a 35°C. A leitura da CIM foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e a interpretação segundo documento do CLSI (CLSI 2007).

4.5 Sorotipagem

A sorotipagem foi realizada no *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) – Atlanta, Georgia, USA, por meio da reação de Quellung (Sorensen 1993) com aglutinação em látex, e anti-soro padrão produzido *in house*. A sorotipagem foi

realizada em todos os isolados não tipáveis pela técnica de multiplex PCR e para diferenciar os sorotipos 6A, 6B e 18C.

4.6 Tipagem capsular pela técnica de multiplex PCR

A tipagem capsular dos pneumococos foi realizada pela técnica de multiplex PCR (Pai et al. 2006, Dias & Caniça 2007) com modificações e o DNA extraído com o Dnazol. A etapa de tipagem pela PCR foi realizada em colaboração com o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) – Atlanta, Georgia, USA.

As informações referentes aos *primers* e condições das reações podem ser encontradas no site <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>. As reações foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do IPTSP e confirmadas no CDC.

Foram utilizados 32 pares de *primers* (iniciadores) divididos entre seis reações sequenciais de multiplex PCR [reação 1 (14, 6A/6B/6C, 23F, 19A, 9V/9A); reação 2 (19F, 3, 15B/15C, 18/(18A/18B/18C/18F), 10A, 7F/7A); reação 3 (1, 5, 11A/11D, 9L/9N, 17F); reação 4 (7C/7B/40, 12F/12A/44/46, 4, 38/25F, 23A); reação 5 (8, 2, 34, 20, 22F/22A, 31); reação 6 (33F/33A/37, 15A, 35F/47F, 35B, 16F)]. As reações de multiplex PCR foram estabelecidas para incluir sequencialmente os sorogrupos/sorotipos invasivos e de portador mais frequentes em Goiânia e no Brasil (Laval et al. 2006, Dias & Caniça 2007). O iniciador *cpsA* foi incluído como controle interno específico, em todas as reações, para o *locus cpsA* presente nos pneumococos. A reação foi realizada em um volume de 25µL: tampão PCR 1x (20mM Tris-HCl, pH 8,0; 100mM KCl; 0.1mM EDTA; 1 M ditiotreitól; 0,5% Tween 20; 0,5% Nonidet P-40; Madison, Wis.), 200µM de cada desoxinucleosídeo trifosfato, 2,5mM de MgCl₂, 2,0 U de Taq DNA polimerase e iniciadores com concentrações específicas. As condições da reação foram: 94°C por 4 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 65°C por 2 minutos 30 segundos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, marcador de peso molecular de 50 bp, a 120V por 60 a 90 minutos e corados com brometo de etídio. Os géis foram fotografados para análise, baseada no peso molecular das bandas, de acordo com o quadro 1.

Quadro 1- *Primers* de oligonucleotídeos utilizados para as reações seqüenciais do multiplex PCR

<i>PRIMERS</i>	SEQUENCIA	PESO MOLECULAR (bp)
14-f 14-r	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT	189
6A/6B/6C-f 6A/6B/6C-r	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	250
23F-f 23F-r	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC	384
19A-f A 19A-r	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC	566
9V/9A-f 9V/9A-r	GGG TTC AAA G TC AGA CAG TG A ATC TTA A CCA TGA ATG A AA TCA ACA TT G TCA GTA GC	816
19F-f 19F-r	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	304
3-f 3-r	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	371
15B/15C-f 15B/15C-r	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	496
<i>PRIMERS</i>	<i>SEQUENCIA</i>	<i>PESO MOLECULAR</i>
18/(18A/18B/18C/18F)-f	CTT AAT AGC TCT CAT TAT	

18/(18A/18B/18C/18F)-r	TCT TTT TTT AAG CC TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	573
10A- f 10A-r	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	628
7F/7A-f 7F/7A-r	CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC	826
1-f 1-r	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	280
5-f 5-r	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	362
11A/11D-f 11A/11D-r	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	463
9N/9L-f 9N/9L-r	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T	516
17F-f 17F-r	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	693
7C/(7B/40)-f 7C/(7B/40)-r	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	260
PRIMERS	SECUENCIA	PESO MOLECULAR
12F/(12A/44/46)-f 12F/(12A/44/46)-r	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	376

4-f	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	430
4-r	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	
38/25F-f	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	574
38/25F-r	ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	
23A-f	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	722
23A-r	CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC	
8-f	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	201
8-r	CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT	
2-f	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC	290
2-r	ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT	
34-f	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	408
34-r	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	
20-f	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	514
20-r	CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	
22F/22A-f	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	643
22F/22A-r	CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	
PRIMERS	SECUENCIA	PESO MOLECULAR
31-f	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	701
31-r	CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	
33F/(33A/37)-f	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	338
33F/(33A/37)-r	CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	

15A/15F-f	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	434
15A/15F-r	GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	
35F/47F-f	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA	517
35F/47F-r	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	
35B-f	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	677
35B-r	CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	

4.7 MLST (*multilocus sequence typing*)

A etapa do MLST foi realizada em colaboração com o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) – Atlanta, Georgia, USA.

Foram selecionados 55 pneumococos (resistentes e sensíveis à penicilina) representativos dos diferentes sorotipos detectados nesse estudo para a análise pelo MLST de acordo com Enright & Spratt (1998). Os *primers* utilizados para amplificação pela PCR foram:

aroE-up, 5'-GCC TTT GAG GCG ACA GC,

aroE-dn, 5'-TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)TTCTAA;

gdh-up, 5'-ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT,

gdh-dn,5'-GCTTGAGGTCCCAT(G/A)CT(G/A/T/C)CC;

gki-up, 5'-GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC,

gki-dn, 5'-TCT CCC GCA GCT GAC AC;

recP-up, 5'-GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG,

recP-dn, 5'- TGC AAC CGT AGC ATTGTAAC;

spi-up, 5'-TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC,

spi-dn, 5'-GTG ATT GGC CAG AAG CGGAA;

xpt-up, 5'-TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT,

xpt-dn, 5'-AGA TCT GCC TCC TTA AATAC;

ddl-up, 5'-TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG,

eddl-dn, 5'-CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT

Os fragmentos de DNA foram purificados usando QIAquick (Qiagen) e foram sequenciados, utilizando os iniciadores utilizados para amplificação, no sequenciador automatizado Applied Biosystems Prism 377 (PE AppliedBiosystems).

Os tipos (*sequence types* - ST) do MLST foram estabelecidos pelas específicas combinações das sequências dos sete genes (*housekeeping alleles*) referentes aos genes *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, e *ddl*, disponíveis no *web site* (<http://www.mlst.net>).

5 MANUSCRITOS

5.1 Artigo de revisão

Focus on pneumococcal vaccines and nasopharyngeal carriage

Cristyane G.B.B. Rocha, Ana Lucia S.S. Andrade, Fabiana C. Pimenta†

O Artigo foi submetido ao *Brazilian Journal of Infectious Diseases*

Focus on pneumococcal vaccines and nasopharyngeal carriage

Cristyane G.B.B. Rocha†, Ana Lucia S.S. Andrade‡, Fabiana C. Pimenta†, ††*

†Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil

‡Department of Community Health, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil

††Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control & Prevention, Atlanta, USA

This investigation was sponsored by Brazilian Council for Scientific and Technological Development Research/CNPq (Research Grants no. 482646/2007-1) and the Secretariat of Health of Goiânia Municipality. AL Andrade (Grant no. 309196/2007-8) is fellowship from the CNPq.

*Fabiana Pimenta, Ph.D. 1600 Clifton Road N.E., Atlanta, GA, fax 404639 4518, gzy7@cdc.gov Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control & Prevention, Atlanta, USA

Title: Focus on pneumococcal vaccine and nasopharyngeal carriage**Abstract**

The vaccination is the only available tool to prevent disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. In this review emphasis was given on pneumococcal conjugate vaccine (PCV) and *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage, as nasopharynx colonization precede invasive disease. To optimize the development of future conjugate vaccines and to evaluate their efficacy, it is necessary to understand the serogroup-specific epidemiology of pneumococci and their associated disease types. Continuous monitoring of *S. pneumoniae* serotypes is essential since it has been shown that the incidence of types responsible for invasive disease can change over time. The extended protection increases the cost-effectiveness of PCV and should clearly encourage its use in poorly resourced countries. However, the accumulated experience also shows that the herd immunity, due to PCV, is partly offset by replacement of the vaccine serotypes by other, nonvaccine serotypes. Owing to the general reduced virulence of the latter, this has only had a modest effect on disease, but the possibility of more virulent nonvaccine serotypes arising cannot be ignored and should be the focus of continued surveillance.

Key words: pneumococcal vaccine, nasopharyngeal carriage

Introduction

Streptococcus pneumoniae, is a Gram-positive alpha-haemolytic encapsulated diplococcus. The polysaccharide capsule defines the serotype and at present, 91 distinct serotypes were identified [1]. The major virulence factor of *S. pneumoniae* is the polysaccharide capsule, which prevents phagocytosis of the bacteria by macrophages. Most *S. pneumoniae*

serotypes have been shown to cause serious disease, but only a few serotypes produce the majority of pneumococcal infections. The reservoir for pneumococci is presumably the nasopharynx (NP) of asymptomatic human carriers. The rate of *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage varies with age, geographical location, socio-economic status and in households with children [2,3].

The pneumococcal colonization of the NP occurs early in life depending on the local epidemiology. A single serotype usually is carried for extended periods (45 days to 6 months). Carriage does not consistently induce local or systemic immunity sufficient to prevent later reacquisition of the same serotype. The colonization is the starting point for all relevant aspects of this pathogen [4]. As a result of vaccination, a decrease in carriage of vaccine serotypes and a significant increase of non-vaccine serotypes occurs in immunized children, probably due to replacement of serotypes or unmasking of minority populations of *S. pneumoniae* present in the NP since multiple serotypes can colonize simultaneously [5]. Although the biology of *S. pneumoniae* carriage is not well understood, the human NP is the reservoir of pneumococcal and studies suggest that NP colonization can reflect the epidemiological aspects of pneumococcal disease in the community [6].

During the past 4 decades, serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F constituted the majority of invasive isolates in children in the United States and other developed countries. Of these, serotypes 6B, 9V, 14, and 19F frequently have reduced susceptibility to penicillin. Rates of pneumococcal carriage peak during the first two years of life and decline gradually thereafter. Carriage rates are highest in institutional settings and during the winter, and rates are lowest in summer. Nasopharyngeal carriage of pneumococci is common among young children attending day care with rates of 61.3% in point prevalence estimates [7].

Pneumococcal Vaccines

Pneumococcal polysaccharide vaccine

The first polysaccharide pneumococcal vaccine was licensed in the United States in 1977. It contained purified capsular polysaccharide antigen from 14 different types of pneumococcal bacteria. In 1983, a 23-valent polysaccharide vaccine (PPSV23) was licensed and replaced the 14-valent vaccine, which is no longer produced. The PPV23 is a polysaccharide vaccine composed of capsular polysaccharide antigens purified from the 23 most prevalent pneumococcal serotypes: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F and 33F that cause 88% of bacteremic pneumococcal disease [8].

The PPV23 is primarily designed for use in older children and adults who are at risk for pneumococcal disease. It is not licensed for use in children <2 years of age. In some countries it is recommended by the public health authorities for all adults at the age of 60 years or older. It is not effective for children under 2 years of age because the immune response in this age group is reduced with low production of specific antibodies and the memory phenomenon does not occur [9].

Pneumococcal conjugate vaccine

Employment of pneumococcal conjugate vaccine is particularly successful in young children vaccination. Capsular polysaccharides of PCV-7 are conjugated to highly immunogenic cross-reactive material 197 (CRM197), a non-toxic diphtheria toxoid protein. The CRM197-specific type 2 helper T (Th2) cells interact with B-cells that have bound and

internalized the polysaccharide-CRM197 complex via polysaccharide-specific IgM and subsequently present the processed CRM197 protein along with MHC II to effector T-cells. This type of adaptive immune response is characterized by antibody isotype switching and the generation of memory B-cells [9].

Prevention of pneumococcal nasopharyngeal colonization is the first step in the infection cycle that has important consequences: it reduces chances of spread of the infection and indirectly protects from disease. Through these indirect effects, the protection afforded by the vaccine extends to the whole population, including those not vaccinated (herd immunity) [10].

After the introduction of PCV7 in USA in the infant vaccination programme, it was observed a reduction of 76% in the overall incidence of invasive pneumococcal disease (IPD), and 94% for vaccine serotypes in children younger than five years old [11]. This PCV7 came onto the market in Europe in 2002.

The PCV7 available in Brazil was licensed for use in February 2001 but was not introduced in the National Immunization Program (NIP). The estimated cover of PCV7 is 73,9% for invasive serotypes [3]. Furthermore, it could also protect against serotypes that are cross-reactive antigenic similarity: 6A, 9A, 9L, 18B and 18F [12]. At the present time the development of PCVs against more than seven serotypes continues undiminished and different types of carrier protein are under development. Pneumococcal conjugate vaccine 10-valent (PCV10) includes the PCV7 serotypes plus serotypes 1, 5, and 7F, conjugated with the protein D from nontypeable *H. influenzae*, and has already been licensed for use in Brazil. The pneumococcal conjugate vaccine PCV13 contains the PCV10 + 3, 6A, and 19A, and has recently been approved by the regulatory agencies of European communities (EMEA), Chile and Canada. The PCV13 is under evaluation in Brazil by ANVISA. Studies

carried out with PCV13 showed that the vaccine was well tolerated and more immunogenic than the polysaccharide to the most serotypes contained in the two vaccines [13].

Since the introduction of PCV7 in the USA there is a need to expand coverage to include other serotypes. The potential coverage of PCV7, PCV10 and PCV13 against IPD, acute otitis media (AOM), acute conjunctivitis (AC) and patients in southern Israel, before the introduction of PCV7 in the period 2000-2004 were evaluated. A total of 5497 samples were collected from children <36 months: 189 from blood or cerebral spinal fluid (CSF), 3197 from the middle ear secretion, 348 from the conjunctiva, and 1763 from the NP of healthy children. According to the serotypes detected, PCV7 coverage for IPD, AOM, AC, and carriage would be 44%, 54%, 37% and 46%, respectively. The PCV10 extended coverage primarily to IPD, whereas the addition of serotypes 6A and 19A in PCV13 increased coverage in all entities (84%, 79%, 54% and 67% in IPD, AOM, AC, and carrier, respectively) [14].

Conjugate vaccines are protective against pneumococcal disease; however the vaccination resulted in selective pressure for replacement with non-vaccine *S. pneumoniae* serotypes in both invasive disease and asymptomatic carriage [15]. In almost all clinical trials among vaccinated children has been observed a reduction in NP colonization of vaccine serotypes and an increase in non-vaccine serotypes [16]. The clinical significance of change in the microbiota and consequent replacement of serotypes is unclear, but the replacement with potentially virulent strains and development of antibiotic resistance in non-vaccine type pneumococci are theoretically possible and should encourage more prudent use of anti-infectives to reduce antibiotic pressure [17]. Analysis of colonizing serotypes among healthy children in communities provides critical data on changes in serotype distribution and antimicrobial susceptibility, particularly of emerging non-vaccine strains [18]. A prospective study to assess the impact of the PCV7 in resistant pneumococci colonizing the NP of healthy children in day care aged 6 months to 6 years was conducted, and was observed a reduction in colonization with penicillin-resistant serotypes vaccine related, and could notice resistance increase in non-vaccine serotype [19]. Pediatric vaccination with PCV7 has also resulted in decreased PCV7-type pneumococcal carriage among adults and helps to explain recent decreases in the rate of PCV7-type invasive pneumococcal disease among adults [20].

A significant reduction in colonization rate of penicillin-resistant pneumococci, especially in children under 36 months, and also an increase in colonization with serotypes not contained in the vaccine, which were susceptible to penicillin after the PCV9 vaccination was observed [21]. The carrier state of resistant pneumococci remained low, concluding that the rate *S. pneumoniae* resistant was high in childcare and that the conjugate vaccines appear to be an important tool to reduce the antibiotic-resistant pneumonia rate in nursery.

Several questions are open to debate especially those related to NP colonization, antimicrobial resistance, vaccination, and cross-reaction of serotype replacement, although many of these issues can be addressed and possibly resolved by mass vaccination, accompanied by an accurate monitoring. In the state of the art, it is clear that the conjugate vaccine significantly reduces pneumococcal disease in vaccinated individuals and indirectly in non-vaccinated contacts, and is generally well tolerated and safe [22].

Importance of monitoring *S. pneumoniae*

High rates of pneumococcal carriage are detected in day care centers with higher prevalence of multidrug-resistant strains, which emphasize the role of these institutions as the focus of selection and spread of resistant isolates [23]. Thus, the monitoring of children with resistant pneumococci should be established, to control the spread of resistant clones, especially in institutionalized children. Although a limited number of serotypes cause the majority of invasive pneumococcal disease and multiple serotypes can colonize the NP. The identification of these serotypes is important in monitoring programs and to evaluate the vaccination effect on the carrier status. This dynamic of replacing serotypes, the impact of vaccination, can result in major changes in the epidemiology of invasive pneumococcal disease [24]. The presence of multiple strains of pneumococci in substantially lower levels in the NP may have an important role in the dynamics of population shift that occurs when the balance of pneumococcal NP is changed by interventions such as the introduction of vaccines, antimicrobial treatment or improvements in infection control measures [25].

In Brazil, few studies have been conducted to assess the NP colonization and distribution of pneumococcal serotypes in children younger than five years [26-31]. The distribution of

serotypes and resistance of pneumococci colonizing the NP should be used as one of the predictors of invasive disease [2]. However, there is difficulty in identifying multiple serotypes in a single carrier. Strategies should be developed to evaluate the impact of conjugate vaccines on the pneumococcal ecology in the NP. There is no single method available to identify multiple serotypes of a simultaneous original sample without the step of culture, since specific primers for all capsular types are not available [32]. The high cost of antisera, the subjectivity in the interpretation and technical skill is serious disadvantages of the classical method of agglutination for serological determination. The development of genotyping techniques based on multiplex PCR system could be a simple and effective technique to infer serotypes in large numbers of isolates [33]. The conventional multiplex PCR method to serotype pneumococcal has shown good sensitivity and specificity [34, 35, 24] and represent a valuable tool in investigations of surveillance of pneumococci [34].

A total of 446 pneumococci isolated from children NP of attending day care centers in Lisbon (Portugal) were serotyped by classic immunological techniques and by conventional multiplex PCR. The capsular typing results obtained by PCR were consistent with the results obtained by the classic serotyping with accuracy and cost-effective [36]. A system for capsular typing of pneumococcal, comprising 29 serotypes, with seven sequential reactions, based on the sequence of multiplex PCR were outlined [33]. A total of 421 *S. pneumoniae* from Active Bacterial Core Surveillance (ABC) were randomly selected to validate the technique. In 229 (54.4%) capsular typing, the results showed complete agreement with the results obtained by classic serotyping (Quellung reaction). A total of 172 (40.9%) was characterized in pneumococcal serogroup and 20 (were rare serotypes or non-typeable) not included in the reaction. The multiplex PCR technique represents a valuable tool in investigations of pneumococcal surveillance. The conventional multiplex

PCR method [35] was adapted to include the most prevalent serotypes in Latin America and 139/147 (94.6%) of the isolates were demonstrating the efficiency and accuracy of the method [36]. The same strategy was used of adapting the multiplex PCR reactions according to the serotype prevalence in Mozambique for pneumococcal serotype, and also demonstrated the efficiency and accuracy of the technique. It is important to demonstrate the flexibility of the method, by altering the combinations of specific serotypes to achieve the strains diversity in different countries [37].

A rapid pneumococcal serotyping called multibead test, based in a multiplex immunoassay-type inhibition for 36 capsular polysaccharides was highly specific and could differentiate the 90 pneumococcal serotypes represented. To validate this test *S. pneumoniae* were serotyped by the agglutination test in reference laboratories in their countries of origin and the lysate of each strain were coded and sent to the USA for the multibead test. The method showed agreement in 89% of the results and discrepancies that have persisted in only eight isolates involving serotypes 6A, 11A and 18C. Later studies showed that the discrepancies were due to technical problems (reagents) used in multibead or agglutination test for these three serotypes. The test has been considered appropriate for epidemiological studies since it is simple, low cost, fast and accurate [38]. The conventional multiplex PCR was employed to evaluate the secretion of NP in children with otitis media. The most frequent pneumococcal serogroups and serotypes were 6, 19F and 23F. The technique allowed a rapid characterization of pneumococcal serotypes and resistance genes [39]. The technique of multiplex PCR was also used to detect *S. pneumoniae* directly in 279 NP swabs and a greater number of serotypes were detected when compared with conventional methods such as culture, latex agglutination and Quellung reaction [40].

The knowledge of co-colonization with multiple serotypes of pneumococci is very important in clarifying the replacement and change as a result of vaccination. Co-colonization has been reported in more than 30% of patients, especially in populations with high rates of colonization [41]. The technique of multiplex PCR was applied in 50 primary cultures of NP samples and identified a second serotype in 20% of patients [42]. An important gap in knowledge about pneumococcal refers to the genetic diversity of these bacteria in a single clinical specimen. However, one of the recommendations of the Vaccines Department from the World Health Organization (WHO) is the development of standardized methods for the study of multiple serotypes of pneumococci colonizing the nasopharynx in order to detect the dynamics of colonization of this bacterium in the population after introduction of conjugate vaccines [43].

The question to ask is: How to validate the isolation of a single colony for surveillance of patients with *S. pneumoniae*? Most surveillance studies characterize only a single colony when seeking average prevalences of serotype/serogroups or antibiotic susceptibility. Therefore to study the diversity of pneumococcal colonization and to identify which serotypes are circulating in the population the methodology of multiple colonies should be applied [44]. New evidence for between-strain competition among pneumococci have been reported, suggesting that the essential mechanism of competition works in acquisition rather than in clearance of carriage [45].

Conclusion

Pneumococcal conjugate vaccine has a significant impact on pneumococcus epidemiology with a remarkable decline in invasive disease rates in young children. It also reduces the

nasopharyngeal carriage of vaccine related serotypes that result in herd immunity effect benefits on unvaccinated children and adults. There is also a decrease in the antibiotics resistance in the pneumococcal isolates in the vaccinated communities. *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage of children reflect the infection-causing strains currently circulating in the community, and so studies of the prevalence of different pathogens and their resistance patterns can provide useful indications for more rational therapeutic and preventive strategies.

References

1. Park I.H., Pritchard D.G., Cartee R., et al. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol **2007**;45:1225-1233.
2. Bogaert D., Groot T.R., Hermans W.H. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis **2004**;4:144-154.
3. Organización Panamericana de la Salud. Informe Regional de SIREVA II, 2007: datos por país y por grupo de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Documentos Técnicos. Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV-2008/003. Washington, DC: OPS; **2008**.
4. Dagan R.E., Leibovitz D., Greenberg P., et al. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. Pediatr Infect Dis J **1998**;17:880-885.

5. De Lencastre H.A., Tomaz A. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centers and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *Antim Chemoth J* **2002**;50:75-81.
6. Kaplan S.L., Mason E.O., Barson W.J., et al. Three-year multicenter surveillance of systemic pneumococcal infections in children. *Pediatrics* **1998**;102:538-545.
7. Rodrigues F., Nunes S., Sá Leão R., et al. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care centers in the central region of Portugal, in the era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Microb Drug Resist* **2009**;15(4):269-277.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the ACIP MMWR **2000**; 49 (NºRR-09).
9. Pletz M.W., Maus U., Krug N., et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2008**;32:199-206.
10. Käyhty H., Kari A., Nohynek H., Dagan R. et al. Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Review of Vaccines* **2006**;5:651-667.
11. Pilishvili T., Lexau C., Farley M.M., et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *Journal Infect Dis* **2010**;201:32-41.
12. Eskola J., Antilla M. Peumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* **1999**;18:543-51.
13. Scott D.A., Komjathy S.F., Hu B.T., et al. Phase 1 trial of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine* **2007**;25:6164-6166.

14. Shouval D.S., Greenberg D., Givon-Lavi N., et al. Serotype coverage of invasive and mucosal pneumococcal disease in Israeli children younger than 3 years by various pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* **2009**;28:277-282.
15. Black S., Shinefield H., Fireman B. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* **2001**;19:187-195.
16. Spratt B.G., Greenwood B.M. Prevention of pneumococcal disease by vaccination: does serotype replacement matter? *Lancet* **2000**;356:1210-1211.
17. Cohen R., Levy C., de la Rocque F. Impact of pneumococcal conjugate vaccine and of reduction of antibiotic use on nasopharyngeal carriage of nonsusceptible pneumococci in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* **2006**;25:1001-1007.
18. Frazao N., Brito-Avo A., Simas C., et al. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. *Pediatr Infect Dis J* **2005**;24:243-252.
19. Millar E.V., Watt J.P., Bronsdon M.A., et al. Indirect effect of 7- valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal colonization among unvaccinated household members. *Clin Infect Dis* **2008**;47:989-96.
20. [Hammit L.L.](#), [Bruden D.L.](#), [Butler J.C.](#), et al. Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*: an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis*. **2006**;193(11):1487-1494.
21. Dagan R., Givon-Lavi N., Zamir O., et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis* **2002**;185:927-936.

22. Oosterhuis-Kafeja F., Beutels P., van Damme P. Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (1998-2006). *Vaccine* **2007**;25:2194-2212.
23. Lauderdale T.L., Lee W.Y., Cheng M.F., et al. High carriage rate of high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan kindergarten associated with a case of pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis* **2005**;5:96-103.
24. Moreno J., Hernandez E., Sanabria O., et al. Detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal samples by PCR-based multiplex assay. *J Clin Microbiol* **2005**;43:6152-6154.
25. Huebner R.E., Dagan R., Porath N., et al. Lack of utility of serotyping multiple colonies for detection of simultaneous nasopharyngeal carriage of different pneumococcal serotypes. *Pediatr Infect Dis J* **2000**;19:1017-1019.
26. Wolf B., Rey L.C., Brisse S., et al. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centers in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother* **2000**;46:757-765.
27. Ferreira L.L.M., Carvalho E.S., Berezin E.M., et al. Nasopharyngeal colonization and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with acute rhinopharyngitis. *J Pediatr* **2001**;77:227-234.
28. Rossi F., Andreazzi D., Maffucci M., et al. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to various antibiotics among strains isolated from patients and healthy carries in different regions of Brazil (1999-2000). *Braz J Infect Dis* **2001**;5:305-312.

29. Lima E.C. Prevalência de portador e sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe de crianças menores de 5 anos de Goiânia-Goiás. In: Dissertação para obtenção de título de mestre. Universidade Federal de Goiás: Goiânia, **2001**.
30. Laval C.A., Andrade A.L.S.S., Pimenta F.C., et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clin Microbiol Infect* **2006**;12:50-55.
31. Franco C.M., Andrade A.L.S.S., Andrade J.G., et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr Infect Dis J* **2010**;29:77-79.
32. O'Brien K.L., Nohynek H. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* **2003**;22:133-140.
33. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiology* **2006**;44:124-131.
34. Brito D.A., Ramirez M., de Lancastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **2003**;41:2378-2384.
35. Lawrence E.R., Griffiths D.B., Martin S.A., et al. Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J Clin Microbiol* **2003**;41:601-607.
36. Dias C.A., Teixeira L.M., Carvalho M.G., et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol* **2007**;56:1185-1188.

37. Morais L., Carvalho M.G., Roca A., et al. Sequencial multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African isolates. *J Med Microbiol* **2007**;56:1181-1184.
38. Lin J., Kaltoft M.S., Brandão A.P., et al. Validation of a multiplex pneumococcal serotyping assay with clinical samples. *J Clin Microbiol* **2006**;44:383-388.
39. Billal D.S., Hotomi M., Masaki S.M., et al. Determination of pneumococcal serotypes/genotypes in nasopharyngeal secretions of otitis media children by multiplex PCR. *Eur J Pediatr* **2008**;167:401-407.
40. Antonio M., Hakeem I., Sankareh K., et al. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. *J Med Microbiol* **2009**;58:296-302.
41. Gratten M., Manning K., Dixon J., et al. Upper airway carriage by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in Australian aboriginal children hospitalised with acute lower respiratory infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **1994**; 25:123-131.
42. Rivera-Olivero I.A., Blommaert M., Bogaert D., et al. Multiplex PCR reveals a high rate of nasopharyngeal pneumococcal 7-valent conjugate vaccine serotypes co-colonizing indigenous Warao children in Venezuela. *J Med Microbiol* **2009**;58:584-587.
43. World Health Organization. Weekly epidemiological Record. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper **2007**;82:93-104. Available from: <http://www.who.int/wer>
44. Charalambous B.M., Oriyo N.M., Gillespie S.H. [How valid is single-colony isolation for surveillance of *Streptococcus pneumoniae* carriage?](#) *J Clin Microbiol* **2008**;46:2467-2468.

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

5.2 Artigo original

Sequential multiplex PCR for identifying capsular serotype of pneumococcal isolated from the nasopharyngeal from Brazilian children attending day-care centers

Fabiana Cristina Pimenta, Maria da Gloria Carvalho, Cristyane GB Bastos Rocha, Luciana SC Oliveira, Laurine Lacerda, Juliane A Lima, Caritas Marquez Franco, Ana Lucia SS Andrade, Bernard Beall

Artigo será submetido ao Journal Clinical of Microbiology

Sequential multiplex PCR for identifying capsular serotype of pneumococcal isolated from the nasopharyngeal from Brazilian children attending day-care centers

Fabiana Cristina Pimenta^{1,4}, Maria da Gloria Carvalho¹, Cristyane GB Bastos Rocha², Luciana SC Oliveira², Laurine Lacerda², Juliane A Lima², Caritas Marquez Franco³, Ana Lucia SS Andrade⁴, Bernard Beall¹

1 PhD, Division of Bacterial Diseases, Center for Disease Control and Prevention

2 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG)

3 Secretariat of Health of the Municipality of Goiânia, Goiás, Brazil; Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Brasil

4 PhD, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG

Address for correspondence: Bernard Beall, PhD, 1600 Clifton Road N.E., Mail Stop C-02, Atlanta, GA, fax 404639 4518, BBeall@cdc.gov

This study was support in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Research grants #301646/2006-6 #473880/2006-7) and American Society for Microbiology (Latin American Fellowship).

Key Words: pneumococcal, nasopharyngeal carriage, serotype, multiplex PCR

Abbreviated title: Serotype of pneumococcal isolated from children nasopharynx

Running title: Pneumococcal carriage from Brazil

Abstract: Using the sequential multiplex PCR approach, serotypes were identified for pneumococci isolated from children nasopharynx attending day-care-centers. Serogroups/serotypes were determined for 81.6% of the isolates, and the types 14, 6, 23F, 19F, and 18, accounted for 74.2% of the pneumococcal. Nineteen types were detected. Three colonies were analyzed from 28 samples and 7 (25%) showed multiples serotypes.

The multiplex PCR showed to be a powerful tool to detect pneumococcal serotype in nasopharyngeal carriage.

INTRODUCTION

The human nasopharynx is the reservoir of *Streptococcus pneumoniae* (2, 3) and studies suggest that nasopharyngeal (NP) colonization can reflect the epidemiological aspects of pneumococcal disease in the community. The currently available, highly effective pneumococcal conjugate vaccine 7-valent (PCV7) provides serotype-specific protection against disease that has been reflected in the U.S. by a modest shift in invasive serotype distribution to non-vaccine serotypes (4). Carriage serotype surveillance is a viable option in monitoring the impact and suitability of current vaccines.

Pneumococci are traditionally serotyped by the Quellung reaction; however PCR approaches based upon serotype-specific DNA sequences provide a viable and straightforward alternative (4, 8, 9). The purpose of our study was to serotype *S. pneumoniae* isolates from the NP of healthy Brazilian children attending day-care centers by sequential multiplex PCR and determine the **multilocus sequence typing (MLST)**.

MATERIAL AND METHODS

A collection of *S. pneumoniae* was obtained from healthy children less than 5 years old attending 62 day-care centers in the municipality of Goiania, central Brazil. NP swabs were collected from children during a prospective *S. pneumoniae* surveillance study during August to November 2005 after written informed consent of parents or guardians. The carriage prevalence of *S. pneumoniae* were 57.6% and the details on the surveillance were described elsewhere (5).

The laboratory procedures were performed according to WHO recommendations (11). Were selected 217 isolates (resistant and sensitive to penicillin) for capsular typing by multiplex PCR technique. MLST was performed as described (6) for 55 isolates representing the serotypes detected and the different susceptibility patterns for penicillin using 2007 CSLI standards (1). For 28 presumptive pneumococcal positive NP swabs, 3

colonies were picked to access possible serotype diversity. Pneumococci were identified by colony morphology, microscopic Gram stain examination, optochin and bile solubility tests. DNA extraction and sequential multiplex PCR were performed according Pai et al. (9) with modifications posted at <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>. The serotypes distribution in the reactions were adapted to target common invasive and carriage serotypes observed in Brazil (7) and Latin America (4). We used 32 pairs of primers divided into six reactions (rx): [rx1 [14, 6/(6A/6B/6C), 23F, 19A, 9V/9A]; rx2 (19F, 3, 15B/15C, 18/(18A/18B/18C/18F), 10A, 7F/7A); rx3 (1, 5, 11A/11D, 9L/9N, 17F); rx4 [7C/7B, 12F/912A/44/46), 4, 38/25F, 23A]; rx5 (8, 2, 34, 20, 22F/22A, 31); rx6 (33F/33A/37, 15A, 35F/47F, 35B, 16F)]. Serotype 6C-specific primers were used to screening 6A/B/C positive isolates. The 6 reactions included corresponding serotype controls from the CDC collection and the internal control *cpsA* common to most encapsulated pneumococci. Gel electrophoresis and results interpretation were performed as described by Pai et al. (9). Quellung reaction was used for typing isolates serotypes 6A, 6B, 18C and the isolates not typed by multiplex PCR.

RESULTS

Serotypes were deduced for 177/217 (81.6 %) of the pneumococcal, with serotype distributions shown on Table 1. The most frequent serogroups/serotypes were 14, 6, 23F, 19F, and 18, accounting for 161 (74%) the isolates. Multiple serotypes were detected in 13 specimens with two different serotypes detected in nine samples [(6: 14, 6A); (1: 14, 18C); (1: 14, 6B); (1: 14, 6C)] and three serogroups in four [(14, 6A/B, 19A); (14, 6A, 15A); (14, 6A/B, 15A) (14, 6A/B, 18C)]. Forty (18.4%) isolates were not serotyped by the multiplex PCR and all non-typeable by Quellung reaction. Using the first reaction, serogroups/serotypes were deduced for 151 (69.6%) isolates. Sequential PCR reactions 2 to 6 increased the percentage of isolates successfully typed through this approach to 81.6% (177/217). The *cpsA* internal positive control was not detected in four serotype 14 isolates. The serogroup/serotype distribution while three colonies were analyzed (84 colonies) from 28 NP swabs were: 6A/6B (29.8%), 14 (23.8%), 4 (10.7%), 10A (7.1%), 23F (4.8%), and 1.2% of each (9V/9L and 19F). The NT pneumococcal was detected in 8 NP swabs [18

colonies (21.4%)], but in three of these samples a typeable colony were also identified; a non-typed and a typeable pneumococcal were found in 3 [(2: 14, NT), (1: 6A/6B, NT)]. A total of 7/28 (25%) NP samples showed the presence of multiples serotypes while the three colonies were analyzed, and two different serotypes were detected in 3 samples [(6A/6B, 14); (6A/B, 19F); (9L/9N, 14)]; and in one sample were detected 3 different serotypes (6A/6B, 14, and 23F).

We found 19 MLST types (Table 1) and two new ST, within a sample of 55 isolates representing 12 serotypes and nontypeable with different penicillin susceptibility patterns.

DISCUSSION

Multiples strains of pneumococcal can colonize the NP simultaneously (3), however the identification of multiple serotypes from a single specimen is laborious and often inefficient. Nonetheless, in this study, using the multiplex PCR we were able to identify multiple serotypes in 13 NP samples. The analysis of 3 colonies from the same NP permitted the detection of different serotypes in 7/28 (25%) samples. We acknowledge that our success in identifying multiple serotypes in this study relied upon successful resolution of multiple pneumococcal strains. This procedure is often very difficult due to colony morphologies that are often shared and marked differences in colonization densities. We and others are pursuing alternative PCR approaches that eliminate the pneumococcal isolation step, which may serve to alleviate these limitations. However, one advantage of using resolved pneumococcal isolates is that through altering the sequence of individual multiplexed PCR reactions we targeted the most prevalent serotypes in Brazil (4,7) in the first and second reactions. Using only the first reaction we could serotype about 70% of the isolates, thus saving the time and labor of employing all 6 multiplex reactions. The serotype distribution among the NP pneumococcal isolates recovered during this study was similar to that found during previous invasive and carriage studies in Brazil (4,7).

The same MLST types detected were found for susceptible and nonsusceptible penicillin pneumococcal, and more than one MLST type were found among the isolates serotypes 14, 23F, 6B, 19A, 15A. Three isolates presented a new ST type and were submitted to mlst.net.

Five of the most frequent pneumococcal serotypes (14, 23F, 19F, 6B, 18C) found during this study are included in the PCV7, representing 134 (61.7%) isolates. Among PCV7-related types, serotypes 6A, 6C and 19A were prevalent. Recent studies have documented an increase in incidence of serotype 19A invasive disease (6), and to a lesser degree an increase of 6C invasive disease (10). To summarize our findings, the multiplex PCR is a powerful tool to detect pneumococcal serotype diversity in carriage.

REFERENCES

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Approved standard M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
2. **Dagan, R. E., E. Leibovitz, D. Greenberg, P. Yagupsky, D. M. Fliss, and A. Leiberman.** 1998. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17:880–885.
3. **De Lencastre, H. A., and A. Tomaz.** 2002. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centers and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *Antim. Chemoth. J.* 50:75-81.
4. **Dias, C. A., L. M. Teixeira, Mda G. Carvalho, B. Beall.** 2007. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J. Med. Microbiol.* 56:1185-1188.
5. **Franco, C. M., A. L. S. S. Andrade, J. G. Andrade, S. A. Silva, R. M. Oliveira, F.C. Pimenta, J. Lamaro-Cardoso, A. P. Brandão, S. G. Almeida, J. J. Calix, M. H. Nahm, M. C. C. Brandileone.** 2010. Carriage and risk factors for penicillin

- nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **29**:77-79.
6. Hicks, L. A., L. H. Harrison, B. Flannery, J. L. [Hadler](#), W. [Schaffner](#), A. S. [Craig](#), D. [Jackson](#), A. [Thomas](#), B. [Beall](#), R. [Lynfield](#), A. [Reingold](#), M. M. [Farley](#), and C. G. [Whitney](#). 2007. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J. Infect. Dis.* **196**:1345-1354.
 7. Laval, C. A., A. L. S. S. Andrade, F. C. Pimenta, J. G. [Andrade](#), R. M. [de Oliveira](#), S. A. [Silva](#), E. C. [Lima](#), J. L. [Fabio](#), S. T. [Casagrande](#), M. C. [Brandileone](#). 2006. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:50-55.
 8. Morais, L., Mda G. Carvalho, A. Roca, B. [Flannery](#), I. [Mandomando](#), M. [Soriano-Gabarró](#), B. [Sigauque](#), P. [Alonso](#), B. [Beall](#). 2007. Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* **56**:1181-1184.
 9. [Pai, R.](#), R.E. Gertz, B. [Beall](#). 2006. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **44**:124-131.
 10. Park, I. H., M. R. Moore, J. J. Treanor, S. I. [Pelton](#), T. [Pilishvili](#), B. [Beall](#), M. A. [Shelly](#), B. E. [Mahon](#), M. H. [Nahm](#), [Active Bacterial Core Surveillance Team](#). 2008. Differential effects of pneumococcal vaccines against serotypes 6A and 6C. *J. Infect. Dis.* **198**:1818-1822.

11. World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention 1994.
Manual for the national surveillance of antimicrobial resistance of *S.pneumoniae* and *H. influenzae*: epidemiological and microbiological methods. Programme for control of acute respiratory infections. Geneva. Centers for Disease Control, Atlanta.http://who.int/child-adolescenthealth/New_publications/Childhealth/bact.htm

Table 1 - Pneumococcal nasopharyngeal carriage serotype distribution, MIC and MLST types isolated from healthy children less than 5 years old attending day care centers in Brazil central area

Serotype	Number of isolates	% of the serotype	Number of isolates tested by MLST	MIC ^a (number of isolates)	MLST type ^b
14	98	45.2	10	0.015 (1), 0.032 (1), 0.125 (2), 1.0 (1), 2.0 (5)	66, 156
6A	20	9.2	6	0.015 (1), 0.032 (1), 0.125 (1), 2.0 (3)	726, new*
23F	15	7.0	9	0.032 (2), 0.125 (2), 0.5 (1), 1.0 (1), 2.0 (2), 4.0 (1)	285, 698, 4024
19F	8	3.8	5	0.032 (2), 0.125 (2), 0.250 (1)	1203
2	7	3.2	3	0.032 (1), 0.125 (1), 1.0 (1)	595
6B	7	3.2	2	0.250 (2)	748, 751
6C	6	2.8	3	0.125 (1), 2.0 (2)	2777
18C	6	2.8	1	0.250 (1)	193
19A	5	2.3	5	0.032 (1), 0.125 (3), 0.250 (1)	810, 2880
15A	2	0.9	2	0.125 (1), 1.0 (1)	1058, 2216
11A	1	0.4	1	0.125 (1)	62
18B	1	0.4	nd	nd	nd
22F	1	0.4	1	0.032 (1)	285
NT	40	18.4	7	0.015 (1), 0.032 (1), 0.064 (1), 0.125 (2), 0.250 (1), 2.0 (1)	2315, new*
Total	217	100	55		

NT: non-typeable by conventional multiplex PCR and Quellung reaction

MLST: multilocus sequence typing

^a MIC: minimal inhibitory concentration for penicillin according CLSI 2007

^b Bolded entries indicate MLST types shared among nonsusceptible *S. pneumoniae*

* Two isolates NT presented a new ST

nd: MLST not done

6 CONCLUSÕES

- O método multiplex PCR, neste estudo, foi adaptado para contemplar os sorotipos mais prevalentes no Brasil, demonstrando a flexibilidade do método geral que por alteração das combinações de sorotipos específicos nas reações, possibilita a detecção da diversidade de sorotipos na colonização.
- 81,6% dos isolados de pneumococos da nasofaringe de crianças de creche foram tipados pela técnica de multiplex PCR.
- Múltiplos sorogrupos foram detectados em 13 amostras de nasofaringe.
- A tipagem de três (3) colônias, neste estudo, foi determinante para detectar mais de um sorotipo em 25% das amostras de nasofaringe, o que aponta para a dinâmica da colonização deste microrganismo.
- Três cepas de *S. pneumoniae* (1 sorotipo 6A e 2 NT) apresentaram uma nova sequência (ST) e foram submetidos ao mlst.net.
- A técnica de PCR multiplex se mostrou altamente segura, custo-efetiva, além de representar valiosa ferramenta em investigações de vigilância de pneumococos.
- Os dados obtidos poderão também contribuir para a sustentação de novas recomendações ou estratégias de tratamento, prevenção e controle.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

[Andrade ALSS](#), [Pimenta FC](#), [Laval CA](#), [de Andrade JG](#), [Guerra ML](#), [Brandileone MC](#) 2004. Invasive pneumococcal infection in a healthy infant caused by two different serotypes. *J Clin Microbiol* 2 (5):2345-2346.

Bogaert D, Engelen MN, Timmers-Reker AJ 2001. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 39:3316-3320.

Brandileone MCC, Vieira VS, Casagrande ST, Zanella RC, Guerra ML, Bokermann S, De Moraes JC, Baldacci ER, Chamone CB, Oliveira MA, De Matos DG, Arruda TM, Coelho MF, D'Avila SM, Dos Santos AR, Di Fabio JL 1997. 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(2):141-146.

Brito DA, Ramirez M, de Lancastre H 2003. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 41:2378-2384.

Campos LC, Carvalho Mda G, Beall BW, Cordeiro SM, Takahashi D, Reis MG, Ko AI, Reis JN 2009. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C among invasive and carriage isolates in metropolitan Salvador, Brazil, from 1996 to 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65(2):112-115.

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

Crook DWM & Spratt BG 1998. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *British Medical Bulletin* 54:595-610.

De Lencastre H & Tomasz A 2002. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *Antim Chemother J* 50:75-81.

Dias R & Caniça M 2007. Invasive pneumococcal disease in Portugal prior to and after the introduction of pneumococcal heptavalent conjugate vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:35-42.

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

Enright MC, Spratt, BG 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144: 3049-3060.

Ferreira, LLM, Carvalho ES, Berezin EM, Brandileone MC 2001. Nasopharyngeal colonization and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with acute rhinopharyngitis. *J Pediatr* 77(3):227-234.

Franco CM, Andrade ALSS, de Andrade JG, Silva AS, Oliveira RM, Pimenta FC, Lamaro-Cardoso J, Brandão AP, Almeida SCG, Calix JJ, Nahm MH, Brandileone MCC 2010. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 29:77-79.

Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo Martinez MJ 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 59-74.

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

Givon-Lavi N, Fraser D, Porat N, Dagan R 2002. Spread of *Streptococcus pneumoniae* and antibiotic-resistant *S. pneumoniae* from day-care center attendees to their younger siblings. *J Infect Dis* 186:1608-1614.

Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 142:923-933.

Gums JG 2003. NCCLS perspectives in changing susceptibility breakpoints for antimicrobial drugs. *Internat J Antimicrob Agents* 22:S13-S13.

Hill, PC, Akisanya A, Sankareh K, Cheung Y, Saaka M, Lahai G, Greenwood B, Adegbola R 2006. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. *Clin Infect Dis* 43:673-679.

Hoge CW, Reichler MR, Dominguez EA 1994. An epidemic of pneumococcal disease in an overcrowded, inadequately ventilated jail. *N Engl J Med* 331:643-648.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC 2001. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5ª ed, Editora Medsi, Rio de Janeiro - RJ, p.1465.

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

Lawrence ER, Griffiths DB, Martin SA, George RC, Hall LMC 2003. Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J Clin Microbiol* 41:601-607.

Leiberman A, Dagan R, Leibovitz E, Yagupsky P, Fliss DM 1999. The bacteriology of the nasopharynx in childhood. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 49 Suppl 1: S151-153.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou K, Zurth DA, Caugant I, Feavers M, Spratt BG 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3140-3145.

Marimon JN, Peres-Trallero E, Ercibengoa M, Gonzalez A, Fenol A. 2006. Molecular epidemiology and variants of the multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain 14-5 international clone among Spanish clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 57:654-660.

Millar MR, Brown NM, Tobin GW, Murphy PJ, Windsor AC, Speller DC 1994. Outbreak of infection with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a hospital for the elderly. *J Hosp Infect* 27:99-104.

Moreno J, Hernandez E, Sanabria O, Castaneda E 2005. Detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal samples by PCR-based multiplex assay. *J Clin Microbiol* 43:6152-6154.

MLST. Multilocus sequence typing (<http://www.mlst.net>).

Musher DM 2000. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease. 5th ed. Churchill, Livingstone, p. 2128-2146.

Musher DM 2005. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease 6th ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, p. 2392-2411.

[Nunes S, Valente C, Sá-Leão R, de Lencastre H](#) 2009. Temporal trends and molecular epidemiology of recently described serotype 6C of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* 47(2):472-474.

Obaro S & Adegbola R 2002. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 51:98-104.

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

Pai R, Gertz RE, Whitney CG, Beall B 2005. Clonal association between *Streptococcus pneumoniae* serotype 23A, circulating within the United States, and an internationally dispersed clone of serotype 23F. *J Clin Microbiol* 43:5440-5444.

Pai R, Gertz RE, Beall B 2006. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiology* 44:124-131.

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

Pettigrew MM, Gent JF, Revai K, Patel JA, Chonmaitree T 2008. [Microbial interactions during upper respiratory tract infections](#). *Emerg Infect Dis* 14(10):1584-1591.

Porat N, Trefler R, Dagan R 2001. Persistence of two invasive *Streptococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in southern Israel. *J Clin Microbiol* 39(5):1827-1832.

Principi N, Marchisio P, Schito GC, Mannelli S 1999. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascarius Project Collaborative Group. *Pediatr Infect Dis J* 18:517-523.

Reinert RR, Van der Linden M, Seegmuller I, Al-Lahham A, Siedler A, Weissmann B, Toschke AM, Von Kries R 2007. Molecular epidemiology of penicillin non susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Germany. *Clin Microbiol Infect* 13:363-368.

Rey LC, Wolf B, Moreira JLB, Verhoef J, Farhat CK 2002. Nasopharyngeal isolates of *S. pneumoniae* from healthy carriers and children with pneumonia: colonization rates and antimicrobial susceptibility. *J Pediatr* 78(2):105-112

Ruoffs KL, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover PH 1995. *Streptococcus*. *Man Clin Microbiol* 6:299-307.

Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Alves CR, Carriço JA, Saldanha J, Almeida JS, Sanches IS, de Lencastre H 2008. High rates of transmission and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. *J Clin Microbiol* 46:225-234.

Smith A, Klugman KP 1998. Alterations in PBP 1 A essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1329-1333.

Smith AJ, Jefferies J, Clarke SC, Dowson C, Edwards GF, Mitchell TJ 2006. Distribution of epidemic antibiotic-resistant pneumococcal clones in Scottish pneumococcal isolates analysed by multilocus sequence typing. *Microbiology* 152:361-365.

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

Sousa NG, Sa-Leao R, Crisostomo MI, Simas C, Nunes S, Frazao N, Carrico JA, Mato R, de Lencastre H 2005. Properties of novel international drug-resistant pneumococcal clones identified in day care centers of Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol* 43:4696-703.

Vestrheim DF, Hoiby EA, Aaberge IS, Caugant DA 2008. Phenotypic and Genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing children attending day-care centers in Norway. *J Clin Microbiol* 46:2508-2518.

World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention 1994. Manual for the national surveillance of antimicrobial resistance of *S.pneumoniae* and H. Influenzae: epidemiological and microbiological methods. Programme for control of acute respiratory infections. Geneva. Centers for Disease Control Atlanta. Available from: http://who.int/child-adolescent-health/New_publications/Childhealth/bact.htm.

World Health Organization 1999a. Young Infants Study Group. Conclusions from the WHO multicenter study of serious infections in young infants. *Pediatr Infect Dis J* (10):32S-34S.

World Health Organization 1999b. Young Infants Study Group. Bacterial etiology of serious infections in young infants in developing countries: results of a multicenter study. *Pediatr Infect Dis J* 10:17S-22S.

World Health Organization 2002. Acute Respiratory Infections. The World Health Report. Available from: http://www.who.int/whr/2002/whr2002_annex3.pdf.

World Health Organization 2008. Weekly epidemiological Record. 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine – WHO position paper. N°42: 373-384. Available from: <http://www.who.int/wer>

8 Anexos



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

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 054/05

Goiânia, 18/07/2005.

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

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

Área Temática: Grupo III

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

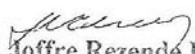
Senhor Pesquisador,

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

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

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

publicação(ões).


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

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 269 83 38 - FAX: 269 84 26