



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Andreia de Moraes da Conceição Rocha da Silva

**Caracterização de amostras de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae* isoladas de colonização de nasofaringe em crianças atendidas em um hospital universitário do  
Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2016

Andreia de Moraes da Conceição Rocha da Silva

**Caracterização de amostras de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae* isoladas de colonização de nasofaringe em crianças atendidas em um hospital universitário do Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior

Rio de Janeiro

2016

UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A  
CATALOGAÇÃO NA FONTE

S586 Silva, Andreia de Moraes da Conceição Rocha da.

Caracterização de amostras de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae* isoladas de colonização de nasofaringe em crianças atendidas em um hospital universitário do Rio de Janeiro Andreia de Moraes da Conceição Rocha da Silva – 2017.

109 f.

Orientadora: Vânia Lúcia Carreira Merquior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Infecções respiratórias - Teses. 2. Crianças - Teses. 3. *Haemophilus influenzae* - Teses. 4. *Moraxella catarrhalis* – Teses. 5. *Streptococcus pneumoniae* – Teses. 6. Nasofaringe. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.2-053.2

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Andreia de Moraes da Conceição Rocha da Silva

**Caracterização de amostras de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae* isoladas de colonização de nasofaringe em crianças atendidas em um hospital universitário do Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 31, de maio de 2016

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mara Lucia Penna Queiroz  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Angela Correa Freitas-Almeida  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rachel Leite Ribeiro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação, a Deus que em sua infinita bondade me guiou até o fim, e a Nossa Senhora por ter intercedido ao seu filho em todas as minhas súplicas, aos meus pais, meu esposo e meus filhos pelo companheirismo, confiança e sobre tudo paciência.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me carregar no colo diversas vezes para que eu pudesse atingir meu objetivo final e a Nossa Senhora Aparecida por sempre acolher as minhas muitas súplicas de força.

Aos meus amados pais Jair e Lenira, por sempre estar ao meu lado fazendo com que meus sonhos possam se concretizar. Vocês são tudo que um filho pode querer ter na vida.

Ao meu esposo Marcelo, por sempre embarcar nas minhas loucas aventuras, pela paciência para os momentos de ausência e pela dedicação a nossa família. Tenho certeza que a nossa estrela sempre há de brilhar, Amo você.

Aos meus filhos Daniel e João Pedro obrigado por dividir a mamãe com o computador e as descobertas da ciência, ao meu filho Junior um agradecimento especial, pelo companheirismo e entusiasmo, mesmo quando o cansaço me alcançava você sempre estava ao meu lado.

Às tias Sônia, Célia e Jandira, aos primos e primas e a todos os membros da família Moraes, Conceição e Rocha pelo carinho e torcida.

Às minhas irmãs de coração Marisa Rocha e Isabel Delgado pelas palavras de incentivo, carinho e amizade.

Ao Comandante Do Hospital Central do Exército o Excelentíssimo Sr General de Brigada Médico Alexandre Falcão Correa pela confiança.

À Tenente Coronel QCO Enfermagem Simone Chaves de Moura Chefe da Divisão de enfermagem, um agradecimento especial. “A gratidão é memória do coração.”

Ao Excelentíssimo Sr General de Brigada Médico R1 Ivam da Costa Garcez Sobrinho, Chefe do Departamento de Ensino e Pesquisa, por sua luta para que essa missão chegasse ao fim

Ao Coronel Médico R1 Celso Luiz Muhlethaler Chouim e ao Major médico Sávio Reder de Souza, pelo apoio incondicional nessa batalha.

Às amigas Tenente Coronel QCO Enfermagem Sônia Ramada, Capitães QCO Enfermagem Marcia Nunes e Liliam Fragoso, Tenente OTT Enfermagem Carolina, as Sargentos STT Adriana Reis e Gislene e as Servidoras civis enfermeiras Cristiane, Lorena, Renata e Claudia, pelo apoio em todas as horas difíceis, a amizade de vocês fez toda a diferença.

Às queridas Major Médica Cinthya França e a Capitão Médica Danielle La Porta meu mais que muito obrigado pela disponibilidade e carinho.

A todos os oficiais enfermeiros, pela amizade e parceria sempre dispensadas.

Aos amigos da UTI Infantil do HCE, pelo apoio e compreensão pela minha ausência.

Em especial ao meu grupo de enfermeiros e técnicos da UTI Infantil, pela lealdade e camaradagem.

Aos amigos do LAC HCE Capitão Barreto, pela troca de conhecimentos e orientações

Aos amigos da Pediatria enfermagem e ambulatório do HUPE, pela amizade e colaboração em todas as etapas de execução do projeto.

À minha coordenadora Renata Maciel, que especialmente e gentilmente corroborou para que fosse possível atingir com êxito todos os objetivos.

Às minhas grandes amigas Adriana Oliveira e Lucila Rosa, pela parceria infinita e cooperação extrema. Sem a ajuda de vocês o sonho não se tornaria realidade.

À minha amiga Ana Claudia Manguiera, sempre dando um jeito carinhoso de me socorrer

Aos companheiros da melhor turma de mestrado de Microbiologia UERJ, Fabrina, Manuela, Mila, Eliane, Rogério, Leonardo, Renata e Dayane e Lara, por fazer a jornada mais agradável. Nossas aulas eram as melhores.

Aos amigos do laboratório 27, pelo carinho e disponibilidade, em especial aos amigos Rachel, Mariana, Tatiane, Andreia, Beatriz e Laura por todos os ensinamentos.

Às amigas Luciana e Jéssyca, pelas gargalhadas nas madrugadas. O nosso bom humor afasta qualquer negatividade.

Às amigas e fiéis escudeiras Adriana Rocha e Stephanie Rodrigues pelo companheirismo e parceria para com essa humilde enfermeira, sem vocês a caminhada seria muito mais difícil. Os nossos vídeos e risadas à tarde me mantiveram firme e confiante de que o caminho certo é inferindo sempre. Tenham certeza que mesmo sendo uma o positivo e a outra o negativo, as duas fazem a dupla mais incrível com quem já tive o prazer de trabalhar, vocês são as melhores, sem palavras pra agradecer tudo o que vocês fizeram por mim.

À minha querida amiga Sabrina Colodette que conduziu meus primeiros passos no mundo do laboratório. Seus ensinamentos foram primordiais para essa jornada.

À Carla, secretária do Departamento de Microbiologia, pelo carinho e dedicação.

A todos os meus amigos que de longe ou bem de perto torceram por mim e pela minha vitória.

À Professora. Vânia Merquior em especial pela sua compreensão, amizade, disponibilidade e carinho comigo e para com minha família. Sou grata pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por você fazer esse mestrado se tornar realidade.

À Professora Lúcia Teixeira, pela sua generosidade e acolhida em seu laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Coordenação de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.



Acho que os sentimentos se perdem nas palavras. Todos deveriam ser transformados em ações, em ações que tragam resultados.

*Florence Nightingale.*

## RESUMO

SILVA, Andreia de Moraes da Conceição Rocha da, **Caracterização de amostras de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae* isoladas de colonização de nasofaringe em crianças atendidas em um hospital universitário do Rio de Janeiro**. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A colonização da nasofaringe é uma importante etapa de desenvolvimento das infecções do trato respiratório. As espécies bacterianas *Haemophilus influenzae*(Hi), *Moraxella catarrhalis*(Mc) e *Streptococcus pneumoniae*(Sp) destacam-se na população pediátrica. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar amostras bacterianas pertencentes a estas espécies, a partir de colonização nasofaríngea de crianças atendidas no HUPE/UERJ. Durante o ano de 2015, foram realizadas oito coletas de material clínico no total de 204 crianças. Os espécimes (*swabs* de nasofaringe) foram semeados, em meio de ágar sangue de carneiro a 5% e ágar chocolate suplementado com hemina e NAD, e as placas incubadas por até 48 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras bacterianas foram caracterizadas em gênero e espécie por MALDI-TOF e testes fisiológicos convencionais. Definidos os tipos capsulares de Hi por metodologia de aglutinação Látex e de Sp por PCR, utilizando-se um conjunto de iniciadores da vacina PCV10. Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos foram determinados nas amostras de Hi e de Sp. Fenótipos de resistência a eritromicina e clindamicina foram identificados pelo teste duplo disco, amostras resistentes a oxacilina e a eritromicina, em Sp, foi determinada a CIM pelo teste E. Amostras de Hi resistentes aos beta-lactâmicos e as amostras de Mc foram avaliadas quanto expressão de beta-lactamase. Espectros obtidos por MALDI-TOF MS avaliaram a diversidade, empregando-se algoritmos para o agrupamento das amostras e construção de árvores de similaridade. Os resultados revelaram, taxa de colonização 40,2% (82/204), sendo 15,7% Hi, 25,5% Mc e 21,1% Sp. O isolamento das espécies, nas estações do ano, revelou valores mais expressivos de Mc na primavera; enquanto as demais no verão. A maioria das amostras de Hi foi não tipável (HiNT; 83,3%). Apenas uma amostra identificada como Hib e quatro outras como não-Hib. Da mesma forma, para Sp, apenas cinco amostras foram tipadas por PCR, sendo quatro 6A/B e uma 23F, 87,5% não apresentaram produtos de amplificação. Dentre os fenótipos de resistência aos antimicrobianos, destacam-se à oxacilina e à eritromicina em Sp e à ampicilina em Hi. Valores de CIM para penicilina e eritromicina corroboraram os achados nas amostras de Sp. Todas as amostras de Hi resistentes a ampicilina eram HiNT produtoras de beta-lactamase, amostras Mc 96,0% também foram produtoras desta enzima. O agrupamento das análises dos espectros por MALDI-TOF MS revelou diversidade das amostras, agrupamentos prevalentes e subgrupos definidos. Ressaltamos a frequência de 87,7% em crianças vacinadas, com destaque aos novos fenótipos em percentuais. A associação de novos fenótipos com resistência aos antimicrobianos refletiu a necessidade do monitoramento dessas espécies na busca de estratégias de controle. Este estudo pretendeu contribuir com dados nacionais, para o entendimento da circulação desses patógenos respiratórios nessa população.

Palavras chave: Beta-lactâmicos. Fenótipos. Infecções do trato respiratório.

## ABSTRACT

SILVA, Andreia de Moraes da Conceição Rocha da. **Characterization of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from nasopharyngeal colonization in children attending at a university hospital in Rio de Janeiro.** 2016. 109 f Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Colonization of the nasopharynx is an important stage in the development of respiratory tract infections. The bacterial species *Haemophilus influenzae* (Hi), *Moraxella catarrhalis* (Mc) and *Streptococcus pneumoniae* (Sp) stand out in the pediatric population. The objective of this study was to isolate and characterize bacterial samples belonging to these species, from nasopharyngeal colonization of children treated at HUPE / UERJ. During the year 2015, eight collections of clinical material were carried out for a total of 204 children. The specimens (nasopharynx swabs) were seeded in 5% sheep blood agar and chocolate agar supplemented with hemin and NAD, and the plates incubated for up to 48 h at 37 ° C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Bacterial samples were characterized in genus and species by MALDI-TOF and conventional physiological tests. The capsular Hi types were defined by Latex and Sp agglutination methods by PCR using a set of PCV10 vaccine primers. Antimicrobial susceptibility profiles were determined in the Hi and Sp samples. Resistance phenotypes to erythromycin and clindamycin were identified by the double-disc test, oxacillin-resistant samples and erythromycin, in Sp, the MIC was determined by the E test. Beta-lactam resistant samples of Hi and Mc samples were evaluated for beta-lactamase expression. Spectra obtained by MALDI-TOF MS evaluated the diversity, using algorithms for the grouping of samples and construction of similarity trees. The results showed colonization rate 40.2% (82/204), being 15.7% Hi, 25.5% Mc and 21.1% Sp. The isolation of the species, in the seasons of the year, revealed more expressive values of Mc in the spring; While the others in the summer. Most of the Hi samples were non-typing (HiNT, 83.3%), only one sample identified as Hib and four others as non-Hib. Likewise, for Sp, only five samples were PCR-typed, four of which were 6A / B and one 23F, 87.5% did not show amplification products. Among the antimicrobial resistance phenotypes, oxacillin and erythromycin in Sp and ampicillin in Hi are the most important. MIC values for penicillin and erythromycin corroborate the findings in Sp. All ampicillin-resistant Hi samples were HiNT beta-lactamase producing, 96.0% Mc samples were also producers of this enzyme. The cluster analysis of the spectra by MALDI-TOF MS revealed diversity of the samples, prevalent clusters and defined subgroups. We emphasize the frequency of 87.7% in vaccinated children, with emphasis on the new phenotypes in percentages. The association of new antimicrobial resistance phenotypes reflects the need to monitor these species in the search for control strategies. This study aimed to contribute with national data to understand the circulation of these respiratory pathogens in this population.

Key words: Beta-lactam. Phenotypes. Respiratory tract infections.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição dos sintomas respiratórios(em número de pacientes) na população pediátrica avaliada neste estudo.....	57
Figura 2-	Frequência de culturas positivas(N= 160) e negativas (N=44) em relação às diferentes variáveis avaliadas na população pediátrica (N=204) incluída neste estudo .....	58
Figura 3-	Distribuição dos valores de escores obtidos por metodologia de MALDI-TOF em relação 32 amostras de <i>Haemophilus influenzae</i> e 52 de <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	61
Figura 4-	Comparação entre a metodologia de caracterização por espectrometria de massas MALDI-TOF e testes fisiológicos convencionais para amostras de <i>S. pneumoniae</i> .....	63
Figura 5-	Distribuição de <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> e <i>S. pneumoniae</i> , isolados separadamente ou de forma concomitante, a partir de 82 pacientes pediátricos que apresentaram cultura positiva para essas espécies.....	64
Figura 6-	Frequência de isolamento de <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> e <i>S. pneumoniae</i> em relação à faixa etária de 204 crianças atendidas no HUPE/UERJ .....	66
Figura 7-	Distribuição das frequências de isolamento das amostras de <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> e <i>S. pneumoniae</i> de acordo com a data de isolamento (A) e estação do ano correspondente (B) .....	67
Figura 8-	Gel representativo da detecção dos tipos capsulares de <i>S. pneumoniae</i> por reação em cadeia da polimerase .....	70
Figura 9-	Correlação entre os halos de inibição para oxacilina, em amostras consideradas resistentes por metodologia e difusão em ágar, e os valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos por teste E .....	75
Figura 10-	Distribuição das amostras de <i>S. pneumoniae</i> multirresistentes em relação à estação do ano.....	76
Figura 11-	Agrupamento por similaridade <sup>1</sup> resultante do arranjo gerado pelos espectros obtidos por metodologia de MALDI-TOF de amostras de <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> e <i>S. pneumoniae</i> .....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, respectivas concentrações e tamanho do produto de amplificação, relativos ao protocolo utilizado nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos tipos capsulares das amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> avaliadas neste estudo.....	49
Tabela 2 -	Características da população avaliada neste estudo, correspondente a 204 crianças atendidas no Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ.....	56
Tabela 3 -	Distribuição dos gêneros e espécies bacterianos a partir de 256 amostras bacterianas isoladas neste estudo e caracterizadas por metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF.....	59
Tabela 4 -	Correlação entre a presença de sintomas respiratórios e a detecção de <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> e <i>S. pneumoniae</i> em pacientes pediátricos avaliados neste estudo.....	68
Tabela 5 -	Perfis de susceptibilidade <sup>1</sup> de 30 amostras de <i>H. influenzae</i> e correlação com a produção de beta-lactamase e sorotipagem.....	71
Tabela 6 -	Perfis de susceptibilidade e demais características associadas a 40 amostras de <i>S. pneumoniae</i> avaliadas neste estudo.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AChVx – ágar chocolate suplementado com vitox
- ASgC– ágar sangue de carneiro
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- CIM –concentração inibitória mínima
- CLSI –Clinical and Laboratory Standards Institute
- CONEP –Comitê de Ética em Pesquisa
- DNA –ácido desoxirribonucleico
- dNTP– desoxirribonucleotídeo trifosfatado
- HCCA –ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
- Hi –*Haemophilus influenzae*
- Hib –*Haemophilus influenzae* tipo b
- HiNT– *Haemophilus influenzae* não tipável
- HTM –*Haemophilus* Test Agar
- HUPE/UERJ – Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro
- L – litro
- MALDI-TOF MS – Assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry
- MHSg– ágar Müeller Hinton acrescido de sangue de carneiro a 5%
- NaCl– Cloreto de Sódio
- pb– Pares de Base
- PCR –*Polymerase Chain Reaction*
- PCV7 –vacina anti-pneumocócica heptavalente
- PCV10 –vacina anti-pneumocócica decavalente
- PCV13 –vacina anti-pneumocócica tridecavalente
- seg– Segundos
- STGG –Skim Milk, Tryptone, Glucose Transport Medium
- Taq*–DNA Polimerase derivada de *Thermus aquaticus*
- TBE –Tampão composto de Tris, Ácido Bórico e EDTA
- TCLE –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TDA – teste de difusão em Agar
- TDD- teste de disco difusão

## LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
°C	Graus Celsius
>	Maior que
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
%	Porcentagem
+	Positivo
V	Volts

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
2.1	<b>Desenho do estudo</b> .....	38
2.2	<b>Coleta do material clínico</b> .....	38
2.3	<b>Isolamento das amostras bacterianas</b> .....	39
2.4	<b>Caracterização das amostras bacterianas por espectrometria de massa</b> .....	40
2.5	<b>Caracterização das amostras bacterianas por testes fisiológicos convencionais</b> .....	41
2.5.1	<i>Haemophilus influenzae</i> .....	42
2.5.1.1	Prova de satelitismo.....	42
2.5.1.2	Teste da oxidase.....	43
2.5.1.3	Teste da catalase .....	43
2.5.1.4	Crescimento em presença dos fatores X (hemina) e V (NAD).....	43
2.5.2	<i>Moraxella catarrhalis</i> .....	44
2.5.2.1	Teste da oxidase.....	44
2.5.2.2	Teste da catalase .....	44
2.5.2.3	Detecção de desoxirribonuclease – teste da DNase.....	44
2.5.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	45
2.5.3.1	Susceptibilidade à optoquina.....	45
2.5.3.2	Bile solubilidade.....	46
2.5.3.3	Caracterização da espécie por teste de aglutinação pelo látex .....	46
2.6	<b>Caracterização dos tipos capsulares de <i>H. influenzae</i> e <i>S. pneumoniae</i></b> .....	47
2.6.1	<u>Serotipagem para <i>H. influenzae</i></u> .....	47
2.6.2	<u>Determinação dos Tipos Capsulares de <i>S. pneumoniae</i></u> .....	48
2.6.2.1	Obtenção do DNA cromossômico.....	48
2.6.2.2	PCR.....	48
2.6.2.3	Detecção dos produtos de amplificação.....	50



2.7	<b>Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos</b> .....	50
2.7.1	<u>Difusão em Ágar – TDA</u> .....	50
2.7.1.1	TDA para <i>H. influenzae</i> .....	51
2.7.1.2	TDA para <i>S. pneumoniae</i> .....	51
2.7.1.3	Leitura e interpretação dos resultados.....	51
2.7.2	<u>Determinação do fenótipo de resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas</u> .....	52
2.7.3	<u>Determinação da CIM</u> .....	52
2.8	<b>Detecção da expressão de beta-lactamase por <i>H. influenzae</i> e <i>M. catarrhalis</i></b> .....	53
2.9	<b>Análises dos agrupamentos formados pela metodologia de MALDI-TOF MS com emprego de algoritmos matemáticos</b> .....	53
2.10	<b>Testes estatísticos</b> .....	54
3.	<b>RESULTADOS</b> .....	55
4.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	79
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	80
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
	<b>ANEXO A - Instrumento de coleta de dados</b> .....	106
	<b>ANEXO B -Termo de consentimento livre esclarecido</b> .....	108

## INTRODUÇÃO

O trato respiratório superior (TRS) exerce funções fisiológicas importantes, como filtragem, umidificação e aquecimento do ar inalado e consiste em um sistema de comunicação (compreendido das narinas até a laringe) entre o ambiente externo e o trato respiratório inferior e o gastrintestinal. As superfícies mucosas do TRS são colonizadas por uma grande variedade de espécies microbianas e diferenças marcantes são observadas entre os perfis microbianos encontrados nos diferentes nichos que compreendem o TRS (HENDAUS, JOMHA & ALHAMMADI, 2015; PITERS *et al.*, 2015). Entretanto, as infecções do trato respiratório se configuram como uma das mais frequentes doenças humanas, particularmente na população pediátrica, estando relacionadas a significantes índices de morbidade e mortalidade (BERMAN, 1991; MONTO, 1995; DAS *et al.*, 2013; LANATA *et al.*, 2004; WHO, 2015).

A maior parte desses casos são infecções autolimitadas do trato respiratório superior, no entanto, os casos que culminam com internação afetam mais frequentemente crianças de países em desenvolvimento, principalmente por pneumonia. As doenças respiratórias agudas podem ser denominadas de acordo com a ocorrência de um processo inflamatório infeccioso (resfriado comum e pneumonias, por exemplo) ou não-infeccioso (rinite alérgica, por exemplo). As infecções respiratórias agudas mais frequentes compreendem a resfriados comuns, faringoamigdalites, otites, sinusites, rinite e pneumonias (SELVARAJ *et al.*, 2014; ROTH *et al.*, 2015)

De acordo com uma análise recente em metagenômica, foram identificadas sequências correspondentes a 13 filos bacterianos e cerca de 250 tipos de unidades taxonômicas operacionais (OTU, do inglês *Operational Taxonomic Unit*) em nível de espécie, compondo o microbioma da nasofaringe humana, a partir de 96 crianças saudáveis. Os cinco filos predominantes foram *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* e *Proteobacteria*; predominando os gêneros *Corynebacterium*, *Dolosigranulum*, *Flavobacteria*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Neisseria* e *Streptococcus* (BOGAERT *et al.*, 2011).

Além disso, a co-colonização, determinando interações entre essas ou dessas com outras espécies bacterianas, também ocorre em percentual elevado em crianças saudáveis (HOBAN *et al.*, 2001; XU & PICHICHERO, 2013). Tais interações podem ter caráter sinérgico, promovendo a persistência da colonização. Ou ainda, ser

competitiva e acarretar a redução na taxa de colonização de uma determinada espécie, privilegiando o estabelecimento de outra, resultando muitas vezes em uma infecção subsequente (XU *et al.*, 2012; PEREZ *et al.*, 2014).

Dentre os principais quadros clínicos causados por *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* estão pneumonias, sinusite, otite média e exacerbações na bronquite aguda. Os quadros se agravam diante da atual emergência da resistência aos antimicrobianos, desenvolvida por estes microrganismos, que se apresenta como um problema global. Destaca-se o contínuo aumento das taxas de resistência à penicilina, observadas para *S. pneumoniae*, desde os anos 1990. Além disso, a maioria das amostras de *M. catarrhalis* também exibe importantes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, como a produção de beta-lactamases (HOBAN, 2001; ESEL, 2007). Da mesma forma, para *H. influenzae* tem sido observado um aumento da frequência da resistência em amostras associadas a diversos quadros infecciosos, sobretudo nas infecções do trato respiratório (JESUS, 2010; XU *et al.*, 2012).

Apesar de já ter sido registrada a redução dos índices de colonização por *H. influenzae* do tipo b e *S. pneumoniae*, aparentemente decorrente de uma maior atenção às políticas de vacinação, a observação de alterações na epidemiologia destes microrganismos tem sido motivo de preocupação mundial. Aparentemente, o emprego mais abrangente das vacinas tem favorecido a emergência de fenótipos que não estão cobertos nas formulações vacinais disponíveis, bem como de outros patógenos que compartilham o mesmo nicho ecológico (FACTOR *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2012; ADEGBOLA *et al.*, 2014).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Haemophilus* são Gram negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, não formadores de esporos. Apresentam morfologia de cocabacilos ou bacilos curtos e, por isso, os membros do gênero são considerados caracteristicamente pleomórficos. Esses microrganismos são fastidiosos, necessitando de meios de cultura enriquecidos. Nesse sentido, dependendo da espécie, a adição ao meio de cultura de precursores de heme, especificamente os fatores X (hemina), V (NADP ou NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não) ou ambos, é essencial para o crescimento *in vitro* (WARD & ZANGWILL, 1999; HARRISON *et al.*, 2008; LEDEBOER & DOERN, 2015).

*H. influenzae* é a principal espécie do gênero. Os membros desta espécie necessitam de meios enriquecidos com ambos os fatores X e V, sendo uma característica diferencial para as demais espécies do gênero. Podem ou não expressar

antígenos capsulares. As amostras capsuladas são classificadas em seis sorotipos (nomeados como a, b, c, d, e, f) antigenicamente e imunologicamente distintos. Geralmente, a cápsula polissacarídica está presente em amostras associadas a quadros clínicos invasivos, como bacteremia e meningite. As amostras não capsuladas são classificadas como não tipáveis e comumente designadas como HiNT- de *Haemophilus influenzae* Não Tipável. Estas amostras com frequência causam infecções não invasivas, como otite média, sinusite e conjuntivite (ADA & ISAAC, 2003; GARMENDIA *et al.*, 2014). Porém, cerca de 95% das infecções causadas por *H. influenzae* são atribuídas às amostras que apresentam cápsula polissacarídica do tipo b – Hib (KELLY *et al.*, 2004).

*H. influenzae* também podem ser classificados em oito biotipos (I a VIII), que estão associados a diferentes quadros infecciosos, fontes de isolamento, propriedades antigênicas e resistência aos antimicrobianos. A caracterização em biotipos é basicamente realizada de acordo com a resposta a três testes bioquímicos: produção de indol, presença de urease e atividade de ornitina descarboxilase (CAMPOS, 1999; LEDEBOER & DOERN, 2015).

Dentre os tipos capsulares e biotipos desses microrganismos destacam-se as amostras de *H. influenzae* biotipo I tipo b, que mais frequentemente são associadas aos quadros mais graves de meningite em crianças. Porém, após a introdução de uma vacina conjugada anti-Hib observou-se uma redução significativa das doenças invasivas por este microrganismo em diversos países. Entretanto, mais recentemente tem sido observado o aumento no número de casos que registraram a emergência dos demais biotipos, particularmente III, IV e VIII assim como, de amostras não b e HiNT (CAMPOS *et al.*, 2004; DE ALMEIDA *et al.*, 2005; DWORKIN *et al.*, 2007; HOWIE *et al.*, 2007; TSANG *et al.*, 2007; DESAI *et al.*, 2015; LUFELE *et al.*, 2015; GOLEBIEWSKA *et al.*, 2016).

Como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* é um agente etiológico de destaque em infecções do trato respiratório. Esta espécie é considerada como um patógeno restrito de humanos e é também um componente comum presente no trato respiratório superior, principalmente em crianças saudáveis. Entretanto, cerca de 3% a 7% de portadores assintomáticos podem albergar variantes patogênicas, o que contribui para a sua disseminação. Este microrganismo costuma ser causa importante de otite média aguda, meningite, pneumonia, epigloteite, sepse, sinusite e artrite séptica. Crianças menores de cinco anos, idosos e indivíduos imunocomprometidos são os mais atingidos por essas

infecções (PELTOLA, 2000; KELLY *et al.*, 2004). Apesar de causar várias doenças invasivas, apenas a meningite é enquadrada entre as doenças de notificação compulsória no Brasil (JESUS, 2010). Embora, seja passível de controle através de imunização eficaz, a meningite por *H. influenzae* ainda é considerada um problema mundial de saúde pública (WHO, 2014).

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência de *H. influenzae* é composta por unidades poliméricas repetidas contendo ribitol e fosfato. (CRISEL *et al.*, 1975). A cápsula apresenta propriedades antifagocíticas e não é capaz de ativar a via alternativa do complemento. Assim, a presença dessa estrutura favorece a invasão do microrganismo através da corrente sanguínea até o sistema nervoso central, sem atrair fagócitos ou provocar lise bacteriana mediada por complemento, resultando na efetiva redução da resposta inflamatória (ADA & ISAAC, 2003).

O trabalho de FOTHERGILL & WRIGHT, em 1933, foi pioneiro em associar a existência de algum fator no sangue humano que atuava como protetor contra a infecção por Hib. Posteriormente, foi identificado que esta proteção era decorrente da presença de anticorpos bactericidas produzidos contra a cápsula polissacarídica. Em sequência, foi também observada existência de uma relação entre a idade do paciente e infecção por *H. influenzae*. Foi atribuído que crianças de dois meses até três anos de idade apresentavam um maior risco para a aquisição das infecções mais graves, como meningite (*apud* MARRS *et al.*, 2001).

Na década de 1970, foi estabelecido que a cápsula polissacarídica de Hib era capaz de estimular a produção de anticorpos, o que contribuiu para o desenvolvimento da primeira vacina, cuja formulação era basicamente o polissacarídeo capsular PRP (poliribosilribitol fosfato) purificado. Entretanto, como já mencionado para *S. pneumoniae*, formulações vacinais constituídas unicamente de polissacarídeos (antígenos timo independentes) não são eficazes na promoção de memória imunológica. Assim, para estes microrganismos também foram desenvolvidas vacinas conjugadas (SCHNEERSON *et al.*, 1980; ADAMS *et al.*, 1993; MARRS *et al.*, 2001).

Diversas formulações de vacinas conjugadas para Hib já foram desenvolvidas. As vacinas conjugadas diferem pela proteína carreadora, o tamanho do polissacarídeo utilizado e o método de conjugação. Este último pode incluir ou não um peptídeo espaçador entre o PRP e a proteína carreadora. Dentre as vacinas conjugadas desenvolvidas contra Hib destacam-se aquelas onde o PRP é conjugado ao toxóide diftérico (PRP-D; ProHIBIT®, produzida por Connaught Laboratories/Sanofi Pasteur,

Toronto, Canadá), à proteína CRM<sub>197</sub> (HbOC; HibTITER®, produzida por Lederle-PraxisBiologicals/Pfizer Inc., New York, EUA), à uma proteína de membrana externa (OMP, do inglês *outermembraneprotein*) de *Neisseriameningitidis* (PRP-OMP; PedvaxHIB® ou COMVAX®, produzidas por Merck &Co., Pennsylvania, EUA) e ao toxóide tetânico (PRP-T; ActHIB®, produzida por Sanofi Pasteur, Toronto, Canadá ou HIBERIX®, produzida por GlaxoSmithKline PharmaceuticalsLtd, Middlesex, Reino Unido). Os quatro tipos de vacina conjugada anti-Hib (PRP-D, HbOC, PRP-OMP e PRP-T) apresentam o mesmo princípio antigênico, entretanto variam em função do periodicidade de aplicação, idade da criança e número de doses (WHO, 2006).

A vacina contendo PRP-D foi a primeira a ser licenciada (em 1987), mas como não apresentou uma resposta imune eficaz em crianças menores de 18 meses, não é mais recomendada nos Estados Unidos (CDC, 2006).

No Brasil, a vacinação contra Hib foi introduzida como parte do PNI/MS em 1999. Atualmente, prevê a aplicação de vacina conjugada anti-Hib em três doses: aos dois, quatro e seis meses de idade. Esta é combinada com a DTP (que protege contra difteria, tétano e coqueluche) e com a anti-hepatite B, configurando a vacina pentavalente (FIOCRUZ, 2007; JESUS, 2010). A vacina pentavalente aplicada no Brasil tem sido obtida de mais de um fabricante, sendo que PRP-T ou HbOc são as formulações mais frequentes anti-Hib (<http://pni.datasus.gov.br/>; acesso em Março 2016).

A introdução da vacina contra Hib conjugada resultou em uma redução na frequência de doenças invasivas por estes microrganismos, bem como de portadores assintomáticos, colonizados na nasofaringe, em diversas partes do mundo (PELTOLA *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2003; DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Entretanto, confrontou com um aumento das infecções por HiNT e a emergência de outros tipos não b (ANDRADE *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2003; DWORKIN *et al.*, 2007).

Diversos estudos, desenvolvidos em diferentes regiões geográficas, têm demonstrado que amostrasHiNT passaram a ocupar o nicho ecológico onde anteriormente a prevalência era de Hib. Alguns estudos apontam que a taxa de colonização por HiNT no primeiro ano de vida seja cerca de 20%; chegando a 50% em crianças entre cinco e seis anos de idade (PEERBOOMS *et al.*, 2002; MURPHY, 2003; WATANABE *et al.*, 2004; LIESE, 2009; O'BRIEN & LEVINE, 2006; DAGAN & FRASCH, 2009; VESIKARI *et al.*, 2009). No Brasil, ZANELLA e colaboradores (2015) avaliando 1.153 crianças até quatro anos e 11 meses de idade, saudáveis e vacinadas para Hib, residentes no município de São Paulo, SP, observaram uma taxa de

colonização em nasofaringe de 0,6% para Hib, 1,5% para não-Hib e 43% HiNT (em 54,9% das crianças avaliadas não foi identificada a presença de *Haemophilus*).

O aumento do número de casos de otite média aguda causados por amostras HiNT define a imperiosa necessidade na busca de medidas preventivas e de controle. Assim, uma das propostas consiste na ampliação do uso da vacina anti-pneumocócica decavalente (PCV10) que é conjugada a proteína D de *H. influenzae*. Por isso, PCV10 também é reconhecida como PHiD-CV (PRYMULA *et al.*, 2006; VESIKARI *et al.*, 2009; PLOSKER, 2014). A proteína D é uma lipoproteína de superfície, de 42 kDa, e encontrada em todas as amostras de *H. influenzae* (tipáveis e não tipáveis). Também, parece estar relacionada à patogênese das infecções do trato respiratório, aparentemente por causar danos funcionais ao epitélio ciliado, além de apresentar atividade de glicerol fosfodiesterase, acarretando a liberação de fosforil colina das células epiteliais do hospedeiro (FORSGREN, RIESBECK & JANSON, 2008).

Entretanto, ainda não é consenso de que esta vacina apresente resultados satisfatórios na redução dos casos de infecções por HiNT. Diversos estudos apontam uma baixa eficácia de PHiD-CV na prevenção das doenças e do estado de portador de *H. influenzae*, ao contrário do que é observado para *S. pneumoniae* pertencentes aos sorotipos que fazem parte da formulação desta vacina (PRYMULA *et al.*, 2011; O'GRADY *et al.*, 2013; VAN DEN BERGH *et al.*, 2013; FEAZEL *et al.*, 2015; SIGGINS *et al.*, 2015).

O papel de supostos fatores de virulência na patogênese da infecção por *H. influenzae* não está completamente elucidado. Não é conhecida a expressão de exotoxinas por esses microrganismos. No entanto, os membros do gênero *Haemophilus*, assim como em *Neisseria*, *Bordetella* e *Moraxella*, expressam LOS (lipoligossacarídeos) em sua membrana externa. LOS é uma molécula semelhante ao LPS (lipopolissacarídeo), porém não apresenta a fração do antígeno O. Isto é, mantém apenas a porção lipídica tóxica (lipídeo A) e o core oligossacarídico. Como LPS, a presença de LOS contribui sobremaneira para a virulência bacteriana (POLTORAK, 1998; JONES *et al.*, 2002; ALLEN *et al.*, 2005). A composição do LOS de *H. influenzae* é bastante variável, principalmente na porção oligossacarídica. Assim, a presença de uma população heterogênea reflete uma considerável diversidade de glicofomas dessa molécula. Variações que ocasionalmente mimetizam as estruturas do hospedeiro (como moléculas ricas em ácido siálico) facilitam a evasão do sistema imune. Como a proteína

D, o LOS também causa danos estruturais e funcionais ao epitélio ciliado do trato respiratório. Além disso, o LOS de *H. influenzae* é capaz de interagir com diversos receptores nas células do hospedeiro, mediando a colonização do microrganismo, particularmente em mucosas (SWORDS, JONES, APICELLA, 2003; KING, 2012).

*H. influenzae* também expressam neuroaminidase e uma IgA1 protease, mas a ação dessas enzimas extracelulares na invasão ainda é questionável. Adicionalmente, a presença de fímbrias específicas é importante na adesão do microrganismo às células de mucosa, além de fundamental nos processos de colonização da nasofaringe (GILSDORF *et al.*, 1992; VAN HAM *et al.*, 1995; GARMENDIA *et al.*, 2012; ULANOVA & TSANG, 2014).

A emergência de resistência aos antimicrobianos também tem sido observada entre amostras de *H. influenzae*. A resistência à ampicilina e a outros beta-lactâmicos é resultado de dois mecanismos distintos: (i) a expressão de beta-lactamases, que hidrolisam a ampicilina por ação enzimática, principalmente enzimas dos tipos TEM-1 e ROB-1 (BLPAR, do inglês *beta-lactamase positive ampicillin-resistant*; FARRELE *et al.*, 2005; YOKOTA *et al.*, 2009; KUVAT *et al.*, 2015); (ii) alteração conformacional de proteínas ligantes de penicilina (PBPs, do inglês *penicillinbindingproteins*), que são enzimas responsáveis pela síntese da peptidoglicana, resultando em redução da afinidade para penicilina, particularmente PBP3 (SANBONGI *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; TRISTAM, JACOBS & APPELBAUM, 2007). Estas últimas são conhecidas pela sigla BLNAR (do inglês, *beta-lactamase negative ampicillin-resistant H. influenzae*). Mais recentemente foi registrada a emergência de amostras denominadas BLPACR (do inglês, *beta-lactamase positive ampicillin-clavulanic acid resistant*) que, aparentemente alberga ambos os mecanismos de resistência (BAE *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013).

Amostras de *H. influenzae* resistentes a outras classes de antimicrobianos também já foram reportadas. Particularmente, a resistência ao cloranfenicol (mediada pela enzima cloranfenicolacetil-transferase, codificada pelo gene *cat*), tetraciclina (genes *tet*), macrolídeos (genes *mefA*, *ermB*, bombas de efluxo ou alterações em proteínas alvo ribossomais) e quinolonas (mutações no gene que codifica para DNA girases – genes *gyr*) (PÉREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2007; TRISTAM, JACOBS & APPELBAUM, 2007). No Brasil, já foi relatado o aumento da resistência aos antimicrobianos em amostras de *H. influenzae* associadas a diferentes infecções, principalmente as do trato respiratório (CASAGRANDE *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2002; DE ALMEIDA *et al.*, 2006).



A resistência aos antimicrobianos em *H. influenzae* torna-se ainda mais preocupante quando associada às amostras não pertencentes ao tipo b, cujas infecções não são preveníveis na formulação vacinal existente (BRYSKIER, 2005).

*M. catarrhalis* apresenta morfologia cocobacilar, ocorrendo predominantemente aos pares ou em cadeias curtas. São assacarolíticos e oxidase positiva. Existem poucas diferenças bioquímicas para a diferenciação das espécies que compreendem o gênero *Moraxella* (VANEECHOUTTE *et al.*, 2015).

Este microrganismo é reconhecido como patógeno exclusivamente humano e tem sido implicado como o terceiro mais frequente agente de infecções do trato respiratório inferior e superior, particularmente em crianças. *M. catarrhalis* causa importante de sinusites, além de estar, também, associado a uma pior evolução clínica nos casos de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em adultos, especialmente em idosos, provocando cerca de 10% das exacerbações inflamatórias. Também, responde por cerca de 20% dos casos de otite média aguda (BROIDES *et al.*, 2009; DE VRIES *et al.*, 2009; HAYS, 2009a; BERNHARD *et al.*, 2012).

A frequência do isolamento de *M. catarrhalis* da nasofaringe ou ouvido médio, em crianças, tem aumentado. Acredita-se que este fato também esteja relacionado às mudanças recentes na epidemiologia das infecções respiratórias, particularmente pediátricas, decorrentes da introdução de esquemas vacinais mais abrangentes contra os dois outros importantes patógenos já citados, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Assim, a redução dos índices de colonização por estes dois últimos, decorrente do emprego de vacinas conjugadas, tem favorecido que estes nichos passem a ser também ocupados por *M. catarrhalis* (BROOK *et al.*, 2006; SPIJKERMAN *et al.*, 2012).

Dentre os principais fatores de risco associados a uma maior frequência de colonização em crianças estão as condições ambientais e sociais precárias (HAYS, 2009a; JOURDAIN *et al.*, 2010). Eventos de colonização nasal e nasofaríngea podem ocorrer dentro dos primeiros anos de vida, frequentemente associados a diferentes genótipos, ao invés de colonização persistente com um único clone (HAYS, 2009a; MASAKI *et al.*, 2011). Além disso, existe uma aparente variação sazonal da incidência de infecção por *M. catarrhalis*, particularmente em regiões de clima temperado, onde as estações do ano são bem definidas. Nos meses de inverno e primavera, usualmente, são identificadas taxas de colonização mais elevadas. Este fato parece estar associado a condições predisponentes mais evidentes, como as viroses respiratórias sazonais (por exemplo, vírus sincicial respiratório, mas não adenovírus) e a rápida queda da

temperatura que induz eventos adaptativos em *M. catarrhalis*, aumentando sua expressão de virulência. Tais eventos são responsáveis pela transição da colonização assintomática, para o quadro de infecção do trato respiratório superior (SPANIOL *et al.*, 2009; 2013; PETTIGREW *et al.*, 2011).

A ocorrência de infecções invasivas graves (por exemplo, bacteremia, endocardite, meningite neonatal, artrite séptica, ventriculite) por *M. catarrhalis* é rara, com apenas poucos relatos na literatura, quase que exclusivamente associados a indivíduos imunocomprometidos. No entanto, não existe uma associação estreita entre uma imunodeficiência específica e a infecção por *M. catarrhalis* (ABUHAMMOUR *et al.*, 1999; AHMED *et al.*, 2008; MURPHY & PARAMESWARAN, 2009). A transmissão pessoa a pessoa e as fontes ambientais têm sido incriminadas na disseminação de infecções nosocomiais, por estes microrganismos. Estas são mais frequentes entre pacientes hospitalizados em enfermarias, com múltiplos leitos, e durante os meses de inverno (COOK *et al.*, 1989; DENAMUR *et al.*, 1989; RICHARDS *et al.*, 1993; MASAKI *et al.*, 2003; LEVY *et al.*, 2009; MURPHY & PARAMESWARAN, 2009).

*M. catarrhalis* é constituída por duas linhagens filogenéticas, definidas com base na sequência do gene que codifica o rRNA 16S, que determina a existência de subpopulações com as seguintes características fenotípicas: o tipo 1 soro-resistente, que sobrevive à ação do complemento e exibe significativa adesão às células epiteliais do trato respiratório; o tipo 2 soro-sensível, que exibe apenas características moderadas de virulência (BOOTSMA *et al.*, 2000; VERDUIN *et al.*, 2000; WIRTH *et al.*, 2007; HAYS, 2009b). Além disso, vários outros fatores de virulência já foram identificados e relacionados à interação com o hospedeiro e a promoção de doença (VIDAKOVICS & RIESBECK, 2009).

Esse microrganismo expressa uma variedade de adesinas e estruturas de superfície que são bem estabelecidos como determinantes de virulência na patogênese das infecções humanas, incluindo: UspA, família de proteínas ubiquitárias de *M. catarrhalis* (*ubiquitous surface protein*); MID/Hag, proteína ligante de IgD de *Moraxella*, também reconhecida como aglutinina para eritrócitos humanos; OMP CD, proteína CD de membrana externa (*outer-membraneprotein CD*); McaP, proteína de adesão de *M. catarrhalis*; TFP, pili tipo IV; e o LOS, lipoligossacarídeo (FORSGREN *et al.*, 2003; LIPSKI *et al.*, 2007; de VRIES *et al.*, 2009; MAWAS *et al.*, 2009; AEBI, 2011). A família UspA consiste em pelo menos três proteínas, com propriedades de

aderência importantes: UspA1 (88-kDa), UspA2 (62-kDa), e a proteína híbrida designada UspA2H (92-kDa). Estas são adesinas multifuncionais oligoméricas, que apresentam domínios para ligação às proteínas do complemento e de matriz extracelular, tais como a laminina, fibronectina e vitronectina (HILL *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2010; de VRIES *et al.*, 2013).

Aparentemente, o frio facilita a aderência de *M. catarrhalis* às células epiteliais da faringe e da laringe, por atuar no aumento da expressão e/ou a função de UspA1 e UspA2 (HEINIGER *et al.*, 2005; BROOKS *et al.*, 2008; BERNHARD *et al.*, 2012). O mecanismo exato ainda não está totalmente elucidado, mas é aceito que o frio regula positivamente a expressão destas adesinas, provavelmente, por prolongar a meia-vida do RNAm e aumentar a ligação à fibronectina, aquisição de ferro e, também, a atividade pro-inflamatória mediada por OMP (SPANIOL *et al.*, 2011). A proteína MID/Hag é uma OMP altamente conservada, multimérica e que, ao menos experimentalmente, é capaz de mediar a adesão de *M. catarrhalis* a diferentes tipos celulares (FORSGREN *et al.*, 2003). MID/Hag, também, é capaz de induzir a ativação de linfócitos humanos; porém, ao contrário de UspA1, sua expressão é negativamente regulada pelo frio. (MOLLENKVIST *et al.*, 2003; BULLARD *et al.*, 2005; SPANIOL *et al.*, 2013). *M. catarrhalis* expressa pelo menos oito OMPs (nomeadas de A até H). A função exata da maioria destas proteínas ainda é incerta. Sabe-se, entretanto, que a expressão de OMP B2 (ou CopB) aumenta em condições limitantes de ferro, sugerindo sua participação na captação desse elemento (AEBI *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2006). A proteína de membrana externa CD (originalmente considerada como duas proteínas distintas) desempenha um papel destacado na adesão às células epiteliais do ouvido médio humano e mucinas nasais (mas não as salivares) (AKIMANA & LAFONTAINE, 2007; LIU *et al.*, 2007) Além disso, anticorpos contra OMP CD oferecem proteção em crianças contra a otite média (LIU *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2013).

Três sorotipos de LOS (A, B e C) foram identificados em amostras de *M. catarrhalis*, baseadas em diferenças em sua estrutura química. Cada sorotipo contém um núcleo comum polissacarídico, apresentando diferenças nos grupamentos terminais de açúcar (HOLME *et al.*, 1999; AKGÜL *et al.*, 2005; PENG *et al.*, 2007). Além disso, LOS, UspA1 e, provavelmente, certas OMPs participam na invasão das células do hospedeiro (PENG *et al.*, 2007; BERNHARD *et al.*, 2012).

Proteínas de superfície (particularmente, os epítomos conservados), e associadas à adesão às células do hospedeiro, representam uma abordagem lógica como alvo

vacinal. Entretanto, considerando-se que *M. catarrhalis* é um patógeno humano estrito, um dos principais obstáculos ao desenvolvimento de vacinas tem sido falta de um modelo animal, que possa refletir as características da doença humana (TAN & RIESBECK, 2007; MAWAS *et al.*, 2009; MURPHY & PARAMESWARAN, 2009; BERNHARD *et al.*, 2012).

Entretanto, alguns alvos vacinais vêm sendo avaliados. Por exemplo, proteínas associadas ao sistema ABC de transporte, particularmente aquelas relacionadas à captação de aminoácidos foram apontadas como promissoras no desenvolvimento de vacinas. Neste sentido, a proteína designada SBP-2 relacionada à captação de arginina já foi apontada como estratégia vacinal promissora (OTSUKA *et al.*, 2015). Em um trabalho recente, YASSIN, AMIN & ATTIA (2016), utilizando ferramentas de imunoinformática, identificaram epítomos com elevada imunogenicidade na proteína ligante de lactoferrina de *M. catarrhalis* que, segundo os autores, podem vir a representar importantes alvos para o desenvolvimento de vacinas. Além destes, as proteínas de superfície de *M. catarrhalis* associadas à virulência do microrganismo também já foram indicadas em estudos anteriores para essa finalidade (CHEN *et al.*, 1996; McMICHAEL, 2000; MAWAS, HO & CORBEL, 2009; MURPHY, 2009; VERHAEGH *et al.*, 2011).

Praticamente todos os membros da espécie *M. catarrhalis* são resistentes à penicilina, ampicilina e amoxicilina devido à produção de três isotipos de  $\beta$ -lactamases BRO-1, BRO-2 e BRO-3 (ELIASSON *et al.*, 1992). BRO-1 é a mais comum, estando presente em cerca de 90% das amostras produtoras de  $\beta$ -lactamase (ESEL *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2010). As enzimas BRO produzidas por *M. catarrhalis* podem conferir proteção, à ação dos  $\beta$ -lactâmicos, para outros patógenos respiratórios presentes no mesmo sítio infeccioso, tais como *S. pneumoniae* e/ou *H. influenzae*. Este fenômeno tem sido referido como a “patogenicidade indireta” de *M. catarrhalis* (VERDUIN *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2010).

Outros mecanismos que podem estar presentes em *M. catarrhalis* envolve a resistência aos macrolídeos, lincosaminas, quinolonas e sulfonamidas (DIPERSIO *et al.*, 1998; COURTER *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012; SAITO *et al.*, 2012; NONAKA *et al.*, 2014; SHAIKH *et al.*, 2015). Dentre estes, destaca-se a emergência de resistência a níveis elevados de macrolídeos. Apesar da resistência a baixos níveis de aminoglicosídeos não ser uma característica frequente nesses microrganismos, a recente emergência de amostras exibindo resistência a níveis elevados é consideravelmente

preocupante, pois estes antimicrobianos fazem parte dos esquemas terapêuticos para infecções por *M. catarrhalis*. Neste caso, o mecanismo de resistência envolvido está relacionado a alterações na sequência de aminoácidos do RNA ribossomal 23S, molécula alvo da ação desses antimicrobianos (KASAI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; SAITO *et al.*, 2015).

Os microrganismos pertencentes à espécie *S. pneumoniae*, também reconhecidos como pneumococos, são cocos Gram positivos catalase negativa, cujas células apresentam morfologia comparável a “ponta de lança” ou “chama de vela”, normalmente dispostas aos pares (diplococos). São anaeróbios facultativos e apresentam necessidades nutricionais complexas (tornando necessário o uso de meios de cultura enriquecidos com sangue ou soro para o seu isolamento). São alfa-hemolíticos, pois em meio acrescido de sangue, observa-se um halo esverdeado ao redor das colônias, característico de uma hemólise dita parcial. Dentre os *Streptococcus*, a espécie *S. pneumoniae* é integrante do grupo dos viridans; e se diferencia das demais espécies deste grupo por ter a autólise estimulada em presença de sais biliares (teste da bile solubilidade) e por ser sensível ao cloridrato de etil-hidrocupreína (teste da optoquina) (FACKLAM, 1977; SPELLERBERG & BRANDT, 2015).

Esses microrganismos são importantes agentes de infecções adquiridas na comunidade, com destaque para aquelas frequentemente graves, tais como pneumonia, meningite e sepse. Além disso, é um dos principais agentes de doenças não invasivas, como a otite média e a sinusite, que atuam também como importante porta de entrada para o estabelecimento das infecções de caráter invasivo (HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013). A otite média aguda, manifestação clínica mais comum da infecção pneumocócica, corresponde de 30% a 50% do total das infecções do ouvido médio, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade (HALL, 1998; JACOBS *et al.*, 2002; FLETCHER; FRITZELL, 2012).

A ocorrência das infecções pneumocócicas é significativa em todo o mundo, particularmente, entre crianças abaixo de dois anos de idade e em adultos em faixas etárias mais elevadas, assim como em determinados grupos de risco (portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida e em doenças de evolução crônica). Estima-se que cerca de 1,6 milhões de pessoas morram a cada ano devido às infecções pneumocócicas nos países em desenvolvimento (WHO, 2015).

Também, dados recentes indicam que o Brasil está entre os 15 países com maior incidência de pneumonia bacteriana, registrando cerca de 1,8 milhões de casos por ano,

sendo *S. pneumoniae* o principal agente etiológico, exceto no período neonatal (SUZUKI *et al.*, 2014). Amostras pertencentes a esta espécie também circulam em frequência significativa entre as populações humanas, através de portadores, que passam a atuar como importantes reservatórios assintomáticos (HOSHINO *et al.*, 2002). Tal fato é explicado em decorrência da principal via de transmissão desse patógeno ser através de gotículas respiratórias, comumente eliminadas pela tosse ou espirro. Assim, tanto em locais onde haja aglomeração de pessoas, quanto o contato próximo, principalmente entre crianças frequentadoras de creches e escolas, observa-se o aumento nas taxas de colonização (VELAZQUES, 2009). Em estudo recente realizado na cidade de Niterói, RJ, foi observado que cerca de 50% das crianças menores de cinco anos eram portadores assintomáticos deste microrganismo (NEVES *et al.*, 2013). Por outro lado, *S. pneumoniae* são caracteristicamente sensíveis ao calor e ao ressecamento, sobrevivendo apenas por curtos períodos no ambiente (HOSHINO *et al.*, 2002).

Entretanto, é possível que a ocorrência de infecções pneumocócicas ainda esteja subestimada, particularmente, devido às dificuldades no diagnóstico confirmatório e no isolamento do agente a partir de hemocultura e de secreções normalmente não estéreis, bem como de pacientes que já tenham recebido algum tratamento antimicrobiano. Problemas relacionados a dificuldades na identificação desse microrganismo, mesmo após o isolamento, também são comuns. Por exemplo, os pneumococos são considerados sensíveis a optoquina, uma característica que permite diferenciá-los dos demais estreptococos. O teste de susceptibilidade à optoquina é utilizado em laboratórios clínicos como um importante método de rotina para caracterização desses microrganismos. Como esse teste costuma ser o único aplicado na rotina diagnóstica, o isolamento de amostras resistentes tende a acarretar erros de identificação. Assim, embora de ocorrência ainda rara, amostras de pneumococos resistentes à optoquina têm despertado atenção devido à possibilidade de inadequações nas estimativas de taxas de infecções ou de colonização e no tratamento de pacientes (TSAI *et al.*, 2000; PIKIS *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2007).

A resistência à optoquina (Opt-R) é decorrente de substituições pontuais no operon *atpCAB*, mais especificamente nos genes *atpC* ou *atpA*, que codificam para as subunidades *c* e *a*, respectivamente, da porção  $F_0$  do complexo  $F_0F_1$  da  $H^+$ ATPase, que é o alvo molecular deste antimicrobiano. As modificações devido à presença de mutações em *atpC* ou *atpA* resultam em troca de aminoácidos, que alteram o sítio de ligação do

antimicrobiano, garantindo a sobrevivência do microrganismo (FENOLL *et al.*, 1994; MUÑOZ *et al.*, 1996; PINTO *et al.*, 2013).

Durante um longo período, pneumococos foram considerados como naturalmente sensíveis à penicilina. Contudo, a partir da década de 70, a frequência no isolamento de amostras resistentes, tanto a partir de portadores sadios como de pacientes, tem demonstrado um aumento gradativo (RATTANAUMPAWAN *et al.*, 2005; VILA-CORCOLES *et al.*, 2009; GINSBURG *et al.*, 2013; MAMISHI *et al.*, 2014; SOTO-NOGUERÓN *et al.*, 2016).

No Brasil, o surgimento de amostras que somente foram inibidas por níveis de penicilina próximos ao da resistência intermediária, foi relatado no final da década de 80 (TEIXEIRA *et al.*, 1988). O surgimento e aumento progressivo dos níveis dessa resistência entre os pneumococos revestem-se de particular significado, uma vez que podem conduzir ao estabelecimento de populações bacterianas totalmente resistentes, num futuro próximo. Essas perspectivas se tornam mais preocupantes quando associada à resistência as cefalosporinas e aos macrolídeos, mais especificamente eritromicina (TEIXEIRA *et al.*, 1997a; WOLF *et al.*, 2000; MENDONÇA-SOUZA *et al.*, 2004; MANTESE *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2010; BARROSO *et al.*, 2012).

A resistência aos macrolídeos em pneumococos é normalmente mediada pelos seguintes mecanismos: alteração no alvo ribossômico (determinada por genes *erm*); efluxo ativo do antimicrobiano (característico da expressão de genes *mef*, principalmente *mefA* ou *mefE*); e mutações em alvos ribossômicos (como nos genes que codificam para o RNA 23S ou para as proteínas L4 e L22 da subunidade 50S). A aquisição dos genes *erm(A)* e *erm(B)* pode determinar a expressão de dois fenótipos de resistência, denominados M e MLS<sub>B</sub>, podendo este último ser constitutivo ou indutivo (cMLS<sub>B</sub> ou iMLS<sub>B</sub>, respectivamente). A expressão do fenótipo M determina resistência apenas aos macrolídeos; enquanto que MLS<sub>B</sub> determina a expressão de resistência também para lincosaminas e estreptogramina B (LECLERCQ & COURVALIN, 2002; JACOBS, 2008; SOTO-NOGUERÓN *et al.*, 2016).

A resistência à tetraciclina em pneumococos está associada à expressão de determinantes genéticos do tipo *tet*, particularmente a *tetM* e *tetO*, cuja expressão leva a um mecanismo de proteção ribossômica, impedindo a ação do antimicrobiano. Os genes *ermB* e *tetM* são carregados por um mesmo transposon conjugativo, o Tn1545 (DEL GROSSO *et al.*, 2007; BARROSO, 2012).

Outros mecanismos importantes de resistência encontrados em pneumococos incluem (i) ao cloranfenicol, mediada pelo gene *cat* que codifica para a enzima cloranfenicol acetiltransferase, que promove a acetilação do antimicrobiano inativando-o; (ii) à combinação trimetoprim-sulfametoxazol, determinada por mecanismos diversos, como: mutações no gene que codifica para a diidrofolato redutase, associada à via de síntese do ácido diidrofólico (resistência ao trimetoprim) ou diidropteroato sintetase, associada a síntese de ácido fólico (resistência às sulfanamidas); (iii) as fluoroquinolonas, determinada por mutações nos genes *gyr* e *par*, que codificam para as enzimas girase e topoisomerase, respectivamente, e que são os alvos desses antimicrobianos (HSUEH & LUH, 2002; QUIÑONES-FALCONI *et al.*, 2004; CORNICK & BENTLEY, 2012).

Dessa forma, sabe-se que em pneumococos a resistência aos antimicrobianos representa um fenômeno em ascensão nas mais diferentes regiões geográficas do mundo. Considerando o potencial epidêmico da resistência aos antimicrobianos, em 1997 foi estabelecida uma rede internacional para estudos de epidemiologia molecular de pneumococos, denominada de *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* – PMEN. Esta tem por objetivo contribuir com uma vigilância mundial de amostras resistentes aos antimicrobianos, estabelecendo uma padronização de metodologias, nomenclatura e critérios para a identificação e até mesmo descrição de clones resistentes encontrados nas diversas regiões (<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/>).

Os pneumococos possuem uma cápsula de natureza polissacarídica que é seu principal fator de virulência e que, devido a sua diversidade antigênica e estrutural, permite o reconhecimento de cerca de 90 sorotipos distintos. Os genes responsáveis pela biossíntese dos polissacarídeos capsulares estão dispostos em um único locus, o operon *cps*, que é peculiar para cada sorotipo. Assim, a determinação dos tipos capsulares, tanto em casos de infecção quanto em portadores sadios, possui importância para a vigilância epidemiológica de *S. pneumoniae* (GARCÍA *et al.*, 2000; KADIOGLU *et al.*, 2008; YUN *et al.*, 2014).

O método padrão de tipagem capsular, conhecido como reação de Quellung, tem como princípio a interação dos antígenos capsulares com anticorpos específicos. Entretanto, apresenta limitações que incluem o custo elevado dos antissoros, uma relativa subjetividade na interpretação dos resultados e a necessidade de profissionais bem treinados, limitando o seu uso à poucos laboratórios especializados (SLOTVED *et al.*, 2004; HABIB *et al.*, 2014). Assim, protocolos baseados na técnica de reação em



cadeia da polimerase (PCR), têm sido amplamente empregados nos últimos anos para a definição dos tipos capsulares de pneumococos. Tais protocolos demonstram excepcional sensibilidade e especificidade, sendo também mais acessível à vigilância e ao diagnóstico laboratorial (PAI *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007b; COSKUN-ARI *et al.*, 2012; LEUNG *et al.*, 2012; AYDEMIR *et al.*, 2016).

A distribuição dos sorotipos parece variar de acordo com a origem geográfica, a idade do paciente e o sítio clínico, e aparentemente pode também sofrer influência direta na distribuição de outras características, tais como virulência e resistência a antimicrobianos (RADDAOUI, 2015). Além disso, o levantamento de sorotipos prevalentes em níveis regional e global é fundamental para guiar a elaboração de vacinas que apresentem ampla cobertura (GARCÍA *et al.*, 2000; DI FABIO *et al.*, 2001; LAVAL *et al.*, 2006; HAMMITT *et al.*, 2014; NAVARRO TORNÉ *et al.*, 2014).

O polissacarídeo capsular dos pneumococos é utilizado no preparo de vacinas que conferem proteção contra as infecções. Dentre aquelas disponíveis para a prevenção de pneumococcias, a vacina 23-valente (PPV23 – *Pneumococcal polysaccharide vaccine*, Pneumovax®, produzida por Merck & Co., Inc. Pennsylvania, EUA), composta pelos polissacarídeos capsulares dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, cobre cerca de 85% dos tipos de maior circulação, principalmente nos Estados Unidos. Entretanto, apresenta limitações, sendo fracamente imunogênica em idosos e pacientes imunocomprometidos, além de pouco satisfatória em crianças menores de dois anos. Além disso, polissacarídeos são antígenos T-independentes, determinando uma resposta imune de curta duração e não indutora de memória imunológica (PLETZ, 2008).

Por outro lado, as vacinas conjugadas, cujas formulações são constituídas de antígenos polissacarídicos e proteicos, são as mais recomendadas por induzirem tanto à resposta mediada por células B quanto por células T, resultando em imunidade humoral e memória imunológica (WHITNEY *et al.*, 2006).

Dentre as vacinas anti-pneumocócicas conjugadas (PCV, *pneumococcal conjugate vaccine*) a heptavalente – PCV7 (Prevenar® ou Pevnar®, produzida por Wyeth Pharmaceuticals, New Jersey, EUA) é composta pelos polissacarídeos específicos dos tipos capsulares 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados à proteína recombinante denominada CRM<sub>197</sub>. Esta proteína é uma variante atóxica da toxina diftérica, obtida da cepa C7 de *Corynebacterium diphtheriae* e conjugada diretamente,

por reações de aminação redutiva, a cada um dos sete polissacarídeos, formando glicoconjugados (MOFFITT & MALLEY, 2011).

Após a introdução de PCV7 foi demonstrado que a população alvo (crianças menores de cinco anos) desenvolveu resposta mediada por anticorpos sorotipo-específicos. Adicionalmente, em decorrência da vacinação foi observado um declínio na incidência de doença pneumocócica invasiva (DPI). Também, foi evidenciado um decréscimo significativo de DPI na população não vacinada em geral (como, crianças maiores de cinco anos, adultos e idosos). Este efeito indireto foi denominado de “imunidade comunitária” ou “imunidade de rebanho” (WHITNEY *et al.*, 2006; MOFFITT & MALLEY, 2011; KLUGMAN, 2014).

Entretanto, mudanças importantes na prevalência de sorotipos colonizando a nasofaringe de crianças, e mesmo naqueles associados a infecções, foram destacadas na literatura, notando-se uma substituição de sorotipos vacinais por outros ausentes em PCV7 (GRIJALVA *et al.*, 2007; SINGLETON *et al.*, 2007; PLETZ *et al.*, 2008). A troca capsular (ou *capsular switching*) é decorrente de processos de transformação e recombinação genética, que determinam a alternância na expressão dos genes específicos e alteram a estrutura modular da cápsula (TEMIME *et al.*, 2008). A substituição (ou *serotype replacement*), referente à redução na prevalência dos sorotipos vacinais, é acompanhada do aumento dos casos de infecção e de colonização atribuídos àqueles não vacinais (WEIL-OLIVIER *et al.*, 2012; STEENS *et al.*, 2013).

Adicionalmente, alguns dos sorotipos emergentes estão associados com o aumento da resistência aos antimicrobianos e à alta probabilidade de causar infecções invasivas. Tais observações indicam que os problemas relacionados ao impacto das doenças pneumocócicas, embora minorados pela implantação de vacinas, ainda estariam distantes de uma solução efetiva (VAN GILS *et al.*, 2010; PICAZO *et al.*, 2011; SIMELL *et al.*, 2012; HAMMITT *et al.*, 2014).

Para aumentar o espectro de proteção, e reduzir os efeitos da ocorrência de alterações na predominância de sorotipos, atribuídos à aplicação de PCV7, foram implantadas novas vacinas conjugadas mais abrangentes: a decavalente – PCV10 (Synflorix®, produzida por Glaxo Smith Kline Pharmaceuticals Ltd, Middlesex, Reino Unido) e a tridecavalente – PCV13 (Prevenar® ou Pevnar®, produzida por Pfizer Inc., New York, EUA) (DURANDO *et al.*, 2012; HENRIQUES-NORMARK & TUOMANEN, 2013).

A PCV10 confere proteção aos sorotipos 1, 5 e 7F, além daqueles presentes em PCV7. No Brasil, PCV10 faz parte do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde (PNI/MS), desde 2010. De acordo com o PNI/MS, a PCV10 deve ser aplicada em duas doses (uma aos dois e outra aos quatro meses de idade), além de uma dose de reforço (aos 12 meses de idade, podendo ser administrado até os quatro anos) (MS/SVS, 2015). A utilização de PCV10 prevê uma cobertura vacinal para cerca de 80% dos sorotipos responsáveis por DPI, como também a redução indireta do número de casos de otite média aguda por amostras HiNT. Deve-se a isto o fato de que proteína D de HiNT é a carreadora de oito polissacarídeos dos sorotipos que compõe esta formulação vacinal (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F). Enquanto que, os polissacarídeos correspondentes aos sorotipos 18C e 19F são conjugados aos toxóides tetânico e diftérico, respectivamente (<http://ca.gsk.com/media/591956/synflorix.pdf>, acesso em Março / 2016).

A vacina PCV13 também conjugada com a proteína CRM<sub>197</sub> inclui os sorotipos presentes na PCV7 e PCV10, e acrescenta o 3, 6A e 19A, com o objetivo de ampliar a cobertura vacinal para valores próximos a 92% (PLOSKER, 2013; LEE *et al.*, 2014). Em 2010, PCV13 foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*, Maryland, EUA), que é órgão norte-americano responsável pela regulamentação de medicamentos e alimentos, para utilização em crianças entre seis semanas e cinco anos de idade. Posteriormente, em 2011 foi recomendada para uso em adultos maiores de 50 anos (<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm201667>, acesso em Março / 2016).

Também em 2011, a EMA (*European Medicines Agency*, Londres, Reino Unido) recomendou a comercialização de PCV13 para os países da União Européia. (EPAR, 2015). Posteriormente, a vacinação por PCV13 foi estendida para crianças e adolescentes na faixa etária de seis a 17 anos, tanto nos Estados Unidos, quanto nos países da Comunidade Européia (WEIL-OLIVIER *et al.*, 2012; TAN, 2012; CASTIGLIA *et al.*, 2014; FLEMING-DUTRA *et al.*, 2014 TRUCCHI, PAGANINO & ANSALDI, 2015). No Brasil, PCV13 também já foi aprovada pela ANVISA para os mesmos grupos etários (Ministério da Saúde, MS/Brasil, 2014).

Na tentativa de contornar os problemas inerentes às vacinas de constituição polissacarídica, um interesse particular tem sido dirigido às proteínas pneumocócicas que contribuem para a patogênese e que são comuns a todos os sorotipos, como futuros alvos vacinais. Dentre essas, destacam-se: proteína A de superfície pneumocócica

(PspA), autolisina (lytA), pneumolisina (Ply), hialuronidase (Hyl), neuraminidases (NamA e NamB), pululanase (SpuA), proteína ligadora de colina (CbpA) e o antígeno A de superfície (PsaA) (JEDRZEJAS, 2001; HAVA & CAMILLI, 2002; PIMENTA *et al.*, 2006; OGUNNIYI *et al.*, 2007; PÉREZ-DORADO *et al.*, 2012; VERNATTER & PIROFSKI, 2013). Adicionalmente, tipos diferentes de pili em *S. pneumoniae* também têm sido avaliados como possíveis componentes vacinais, tais como rlrA (também chamado de pilus 1) e o pilus 2 (BAGNOLI *et al.*, 2008; MOSCHIONI *et al.*, 2008; ZÄHNER *et al.*, 2010).

Amostras pertencentes a determinados sorotipos de pneumococos resistentes à penicilina e a outros antimicrobianos encontram-se mundialmente disseminadas, inclusive no Brasil. Entretanto, a frequência de infecções causadas por pneumococos não susceptíveis à penicilina (PNSP) pode variar entre regiões geográficas distintas. Em países da América do Sul como Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Uruguai e Venezuela, as taxas de resistência oscilam em torno de 20% (MANTESE *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2010; BONOFILIO *et al.*, 2011; QUINTERO *et al.*, 2011; HORTAL *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2015). Nos países do norte da Europa foram evidenciados níveis de PNSP de 5%; enquanto que, os países do sul e do leste europeu apresentaram índices acima de 25% (EARSS, 2008; NAVARRO TORNÉ *et al.*, 2014).

Entretanto, os dados em nosso país ainda são escassos. Assim, devido à contínua importância das infecções pneumocócicas e à disseminação de resistência aos antimicrobianos, mesmo numa era de uso mais amplo de métodos de prevenção vacinal, tem havido um interesse renovado no entendimento dos processos de colonização e de patogênese dessas infecções e no desenvolvimento de estratégias mais efetivas para o seu controle. Além disso, o recente aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos, ou até mesmo a emergência de novos mecanismos de resistência, entre amostras do estudo, associado às evidências de alterações na epidemiologia das doenças respiratórias causadas por estes patógenos (proporcionada pelo uso mais comum de vacinas), indicam a necessidade do rastreamento contínuo das infecções e do estado de portador, particularmente na população pediátrica, que se configura como uma das mais atingidas. Portanto, a carência de dados nacionais, quanto à epidemiologia e as características gerais destes microrganismos, corrobora a importância de investigações contínuas a cerca desses patógenos.

## 1 OBJETIVOS

Foram objetivos primários deste estudo a obtenção de dados relativos aos patógenos *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae*, importantes agentes etiológicos de infecções respiratórias na infância, contribuindo com dados nacionais em relação à epidemiologia e características gerais destes microrganismos. Assim, foram objetivos específicos:

- Isolar e identificar amostras bacterianas pertencentes a estas espécies a partir de secreções nasofaríngeas de crianças atendidas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE/UERJ);
- Identificar essas espécies por métodos convencionais e por espectrometria de massas MALDI-TOF, comparando-se a eficácia de ambas as metodologias
- Caracterizar fenótipos atípicos nas espécies estudadas
- Determinar os tipos capsulares de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* por metodologia de aglutinação pelo látex e de reação em cadeia da polimerase, PCR, respectivamente;
- Avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos em amostras de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* por metodologia de difusão em ágar e pela determinação da concentração inibitória mínima para antimicrobianos de relevância clínica;
- Identificar a expressão de beta-lactamase em amostras de *H. influenzae* e de *M. catarrhalis*;
- Avaliar a formação de agrupamentos pela análise dos espectros obtidos em metodologia de MALDI-TOF como uma ferramenta na investigação da diversidade das amostras dessas espécies.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Desenho do Estudo

Para a avaliação da presença de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S.pneumoniae*, em nasofaringe, foi conduzido um estudo transversal com crianças de até cinco anos e 11 meses atendidas no Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE/UERJ).

O material clínico, *swabs* de secreção de nasofaringe, foi coletado por ocasião da consulta ambulatorial ou de crianças hospitalizadas nas enfermarias de Pediatria e Cirurgia Infantil, no período de fevereiro a outubro de 2015.

Dados demográficos e clínicos foram obtidos através do preenchimento de um instrumento específico (ANEXO1), por entrevista com o responsável legal pela criança hospitalizada ou no momento do atendimento ambulatorial, e também por consulta ao prontuário. O instrumento de coleta incluiu além de dados gerais de identificação do paciente, itens específicos relacionados à promoção a saúde, causa da internação ou atendimento, internações anteriores com suas causas e datas, queixas dos familiares no ato do atendimento, doenças preexistentes, manifestação clínica e medicações em uso no ato da coleta, histórico vacinal, dados nutricionais, dados de eliminações e trocas, atividades e repouso e realização de exame físico (apenas de pacientes hospitalizados).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CONEP) do HUPE/UERJ, com seguinte número de registro CAAE nº. 39465714.2.0000.5259.

### 2.2 Coleta do Material Clínico

Os materiais clínicos foram coletados nas dependências do Ambulatório de Pediatria ou das enfermarias de Pediatria e Cirurgia Pediátrica do HUPE/UERJ, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO 2) pelos representantes legais das crianças. Foram realizadas oito coletas no ano de 2015, nas seguintes datas: 5 e 25 de fevereiro; 9 e 30 de março; 27 de abril, 9 de julho; 20 de

agosto; e 20 de outubro. Sendo assim, foram obtidos materiais clínicos distribuídos em diferentes estações do ano.

A coleta das secreções de nasofaringe foi realizada com a utilização de *swabs* estéreis, finos, flexíveis e escovados (Copan Diagnostics Inc., Itália), próprios para esta finalidade e adequados à faixa etária da população avaliada. Para coleta, os *swabs* foram introduzidos em uma das narinas das crianças até encontrar resistência, devido ao encontro com a parede posterior da nasofaringe. Após movimentos rotatórios por 5 seg, os *swabs* foram removidos e imediatamente introduzidos em tubos tipo criogênicos (CryoTube ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), devidamente identificados, contendo 1 mL de meio de transporte STGG (*Skim milk, Tryptone, Glucose and Glycerol transport medium*), preparado de acordo com as recomendações de O'BRIEN *et al.* (2001). O material assim acondicionado foi mantido sob refrigeração até o processamento no laboratório, cujo tempo transcorrido entre a coleta e o processamento não foi superior a 4 h.

### 2.3 Isolamento das Amostras Bacterianas

O material presente nos *swabs*, imersos em STGG, foi eluído com auxílio de vortex (por 30 seg) e em seguida uma alçada foi semeada por esgotamento em uma placa contendo meio ágar sangue de carneiro a 5% v/v (ASgC, PlastLabor, Rio de Janeiro, RJ), visando o isolamento de *M. catarrhalis* e de *S. pneumoniae*, e em outra com meio ágar chocolate suplementado com Vitox 2% (AChVx, PlastLabor), para o isolamento de *H. influenzae*. As placas foram incubadas por 18-24 h a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> (em incubadora com controle automático de temperatura e CO<sub>2</sub>).

Após o período de incubação foram selecionadas colônias sugestivas para cada espécie bacteriana objeto do estudo. Todas as colônias que cresceram unicamente no meio AChVx, de tamanho variável, planas, mucoides e acinzentadas foram consideradas sugestivas de *H. influenzae*. Para *M. catarrhalis*, foram consideradas as colônias crescidas em meio ASgC que apresentaram tamanho médio, convexas, cor branca ou levemente rósea, opacas e de aparência seca (portanto, não mucoides) e que, preferencialmente, apresentaram o efeito “disco de hóquei” (*hockey puck sign*), ou seja,

que deslizavam inteiras sobre o meio (sem desmanchar) ao serem tocadas pela alça. Foram consideradas colônias sugestivas de *S. pneumoniae*, aquelas que apresentaram alfa-hemólise em meio ASgC, com ou sem depressão central, mucoides ou não mucoides.

As placas de semeadura primária que não apresentaram crescimento após 18-24h de incubação ou que não apresentaram colônias sugestivas a serem incluídas neste estudo, foram reincubadas pelo mesmo período e nas mesmas condições iniciais. Após este período, a total ausência de crescimento, nas condições de temperatura e atmosfera utilizadas, foi considerada como cultura negativa.

As colônias selecionadas foram subcultivadas sob as mesmas condições já mencionadas anteriormente, a saber: em meio ASgC para as suspeitas de *M. catarrhalis* ou *S. pneumoniae* e em meio AChVx para as sugestivas de *H. influenzae*, a 37°C por 18-24 h e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Cada colônia passou a ser considerada, então, uma amostra bacteriana que foi identificada de acordo com o número do paciente de origem.

Após o período de incubação, a pureza do crescimento bacteriano nos subcultivos foi avaliada visualmente, e estes foram então utilizados para os testes de caracterização das espécies por metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF MS. Também, a partir deste mesmo crescimento foram realizados estoques em criotubos (Nunc™ CryoTube® ThermoFisher Scientific), contendo leite desnatado a 10% (*Skim Milk*, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EUA) e glicerol a 10% em ultrafreezer a -80°C, para posterior reativação e utilização nos demais testes. Todos os demais testes foram realizados com culturas bacterianas recentes, caracterizadas como o subcultivo obtido a partir do crescimento oriundo da reativação dos estoques e semeados em condições de incubação e meios de cultura apropriados, como descritos anteriormente.

#### 2.4 Caracterização das Amostras Bacterianas por Espectrometria de Massa

As amostras foram caracterizadas quanto ao gênero e espécies por metodologia de espectrometria de massa – MALDI-TOF (do inglês, *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*).



Para a extração das proteínas, três a cinco colônias bacterianas foram depositadas no fundo de tubos plásticos, estéreis e descartáveis (*Protein LoBind Tubes*, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Sobre as colônias bacterianas foram adicionados 5µL de ácido fórmico a 70% v/v (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e 5µL de acetonitrila (Tedia Company Inc., Fairfield, OH, EUA). Após centrifugação por 3 min a 5.000 x g, 1µL do sobrenadante foi aplicado na placa de aço polido (*Target polished steel plate*, MSP 96 BC; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha) e, em seguida, deixado secar ao ambiente. Depois de seco, foi recoberto com 1µL de uma solução saturada da matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico). Esta matriz é um composto orgânico de baixo peso molecular, que funciona como um fornecedor de prótons para a ionização do material aplicado. O material foi analisado no espectrômetro de massa MALDI-TOF Microflex LT Bruker, utilizando o software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonik) no modo automático (MBT\_FC.par). Os espectros de massa foram coletados dentro da gama de 2.000 a 20.000m/z (massa/carga).

Os espectros foram gerados com auxílio do software Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik), utilizado para informar a proposta de identificação e os escores de confiabilidade, que foram interpretados de acordo com os seguintes critérios indicados pelo fabricante do equipamento: 2,3 a 3,0 – altamente provável a identificação de espécie; 2,0 a 2,29 – identificação segura para gênero e provável para espécie; 1,7 a 1,99 – identificação provável para gênero; 0,0 a 1,69 – não há segurança para identificação.

## **2.5 Caracterização das Amostras Bacterianas por Testes Fisiológicos Convencionais**

Todas as amostras identificadas por MALDI-TOF como pertencentes às espécies incluídas neste estudo e com escores de confiabilidade  $\geq 1,7$  foram avaliadas por testes fisiológicos convencionais específicos. As amostras também foram avaliadas por características morfotintoriais, através da coloração de Gram.

### 2.5.1 *Haemophilus influenzae*

Além dos resultados obtidos por espectrometria de massas, amostras de cocobacilos Gram negativos, e eventualmente pleomórficos, foram submetidas aos testes fisiológicos, conforme as recomendações de LEDEBOER & DOERN (2011).

#### 2.5.1.1 Prova do satelitismo

Suspensões bacterianas padronizadas, com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de Mc Farland, foram semeadas, com auxílio de *swabs*, em meio ASgC de modo a obter crescimento confluyente. Sobre o inóculo da amostra teste foi também semeada, sob a forma de uma única estria, a amostra de referência ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*. As placas foram incubadas a 37°C por 18-24 h e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, foram considerados como testes de satelitismo positivos, característico de *H. influenzae*, aqueles onde foi observado crescimento da amostra teste apenas ao redor da estria de *S. aureus*.

O teste do satelitismo é comumente utilizado como presuntivo para a caracterização de *Haemophilus*, onde a dependência dos fatores X e V para o crescimento destes microrganismos é superada pelo fornecimento do primeiro decorrente da lise das hemácias presentes no meio e pelo fornecimento do segundo em decorrência do crescimento da amostra de *S. aureus*.

#### 2.5.1.2 Teste da oxidase

A partir de um crescimento recente, em meio AChVx, foram retiradas duas a três colônias bacterianas que foram depositadas com auxílio de alça bacteriológica de material plástico e descartável em uma tira de papel de filtro. Uma gota do reagente N,N,N',N' tetrametil-p-fenileno diamina mono-hidrocloridrato a 1% p/v foi adicionada

diretamente sobre as colônias. O aparecimento de coloração púrpura indica a positividade do teste.

O teste positivo é baseado na produção da enzima citocromo oxidase, que provoca uma oxidação rápida do reativo, passando de incolor (quando reduzido) à cor púrpura (quando oxidado), característico de *H. influenzae*.

#### 2.5.1.3 Teste da catalase

Para a realização do teste, uma gota de uma suspensão bacteriana densa, confeccionada em solução salina fisiológica a partir de um crescimento recente, foi depositada sobre lâmina de microscopia. Em seguida, foi adicionada uma gota de uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% v/v.

Os testes positivos são caracterizados pela imediata emissão de bolhas (efervescência) decorrentes da liberação de oxigênio por ação da catalase na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, característico na diferenciação de algumas espécies de *Haemophilus*, incluindo *H. influenzae*.

#### 2.5.1.4 Crescimento em presença dos fatores X (hemina) e V (NAD)

Para realização deste teste, foram utilizados discos comerciais impregnados com os fatores de V, X ou ambos (Newprov Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR), que foram depositados sobre o inóculo bacteriano, confeccionado a partir de uma suspensão padronizada (com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de Mc Farland) e semeado com auxílio de *swabs* em meio TSA (*Trypticase Soy Agar*, BD Diag). Após incubação a 37°C por 18-24 h e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, foi observada a presença de crescimento ao redor dos discos.

Amostras da espécie *H. influenzae* são dependentes de ambos os fatores, crescendo apenas na região entre os discos X e V e/ou ao redor do disco combinado (com ambos os fatores no mesmo disco).

### 2.5.2 Moraxella catarrhalis

Foram realizados testes fisiológicos convencionais para caracterização de *M. catarrhalis*, complementares aos resultados obtidos por MALDI-TOF. Os testes foram realizados baseados nas recomendações de VANECHOUTTE *et al.* (2011).

#### 2.5.2.1 Teste da oxidase

A partir de crescimento recente em meio ASgC foi realizado o teste de oxidase conforme já especificado no item 3.5.1.2 para *H. influenzae*. Amostras de *M. catarrhalis* expressam de forma característica a oxidase, sendo positivas neste teste.

#### 2.5.2.2 Teste da catalase

Este teste foi realizado conforme já especificado para a caracterização de *H. influenzae* no item 3.5.1.3.

#### 2.5.2.3 Detecção de desoxirribonuclease – teste da DNase

A partir de um cultivo recente, as amostras foram semeadas sob a forma de *spots* em meio *DNase Test Agar* (BD Diag) e as placas incubadas a 37°C por 18-24 h e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as placas foram abertas e o crescimento recoberto com uma solução de ácido clorídrico a 1N (1N HCl). Após cerca de 2 min, tempo necessário para a difusão do HCl no meio, foram consideradas positivas, aquelas amostras onde foi possível observar um halo claro ao redor do crescimento.

Este meio apresenta ácido desoxirribonucleico de alto peso molecular em sua constituição, além de triptona que garante o crescimento do microrganismo, cloreto de sódio para manutenção do equilíbrio osmótico e ágar. O teste é baseado na capacidade do HCl(preparado a 1N) precipitar o DNA do meio deixando-o turvo. Entretanto, como a expressão de DNase nas amostras bacterianas leva a despolimerização do DNA do meio, é possível observar um halo claro ao redor do crescimento (teste positivo), característico de *M. catarrhalis*.

As amostras de referência *S. aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

### 2.5.3 *S. pneumoniae*

Amostras de cocos Gram positivos, catalase negativa e que apresentaram  $\alpha$ -hemólise em meio ágar sangue foram submetidas a testes adicionais, de acordo com as recomendações de SPELLERBERG & BRANDT (2011).

#### 2.5.3.1 Susceptibilidade à optoquina

Suspensões bacterianas, com turvação padronizada para o padrão 0,5 da escala de Mc Farland, foram preparadas em solução salina fisiológica (NaCl 0,85% p/v) e foram semeadas, com auxílio de *swabs* estéreis, em placas de ágar sangue de forma a obter crescimento confluyente. A seguir, discos impregnados com 5 $\mu$ g de cloridrato de etil-hidrocupreína (optoquina, BD BBL Sensi-disc, BD Diag) foram aplicados sobre a superfície dos meios inoculados, no centro da placa. Após incubação a 37°C por 18-24 h em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, as zonas de inibição ao redor do disco foram medidas. Amostras apresentando zonas de inibição do crescimento com diâmetro  $\geq 14$  mm foram consideradas susceptíveis à optoquina, sendo este o resultado esperado para *S. pneumoniae*. As amostras de referência *S. pneumoniae* ATCC 49619 (sensível à optoquina) e *S. mitis* SS-429 (resistente à optoquina) foram utilizadas como controles do teste.

### 2.5.3.2 Bile solubilidade

Para cada amostra foi preparada uma suspensão bacteriana, em 1,0 mL de solução salina fisiológica, com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de Mc Farland. A suspensão padronizada foi dividida em dois tubos, com 500µL cada. A um dos tubos foi adicionado o mesmo volume (500µL) de desoxicolato de sódio (tubo teste); e ao outro o mesmo volume de solução salina (tubo controle). Após incubação por 2 h a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, foi realizada a leitura comparando-se a turvação entre os tubos teste e controle. O resultado positivo (amostras bile solúveis), característico de *S. pneumoniae*, foi considerado quando a turvação no tubo teste (com adição de desoxicolato de sódio) foi visivelmente menor que o tubo controle. As amostras *S. pneumoniae* ATCC 49619 (bile solúvel) e *S. mitis* SS-429 (bile insolúvel) foram utilizadas como referências de testes positivo e negativo, respectivamente.

### 2.5.3.3 Caracterização da espécie por teste de aglutinação pelo látex

Foi utilizado o teste de aglutinação pelo látex SLIDEX® *Pneumo Kit* (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França), segundo as instruções do fabricante, para detecção específica de antígenos capsulares de pneumococos. Neste teste, as partículas de látex estão sensibilizadas com anticorpos para 82 tipos capsulares de *S. pneumoniae*. Este teste permite uma caracterização rápida e confirmatória da espécie.

A partir de um cultivo recente, foram realizadas suspensões bacterianas espessas em solução salina fisiológica. Uma gota da suspensão bacteriana foi depositada sobre uma lâmina de microscopia e em seguida foi adicionada uma gota do reagente contendo as partículas de látex sensibilizadas. Após leve homogeneização em movimentos circulares com a lâmina, a presença de aglutinação em até 3 min determinou a positividade do teste, caracterizando a espécie *S. pneumoniae*. Os controles, positivo e negativo, para este teste foram realizados com reagentes pertencentes ao kit comercial e conforme as recomendações do fabricante.

## 2.6 Caracterização dos Tipos Capsulares de *H. influenzae* e *S. pneumoniae*

### 2.6.1 Sorotipagem para *H. influenzae*

A caracterização do sorotipo do polissacarídeo capsular das amostras de *H. influenzae* foi realizada através de reação de aglutinação com a utilização dos seguintes kits comerciais: Difco *Haemophilus influenzae Antiserum Poly* e Difco *Haemophilus influenzae Antiserum Type b* (BD Diag). O primeiro inclui antissoro policlonal liofilizado produzido em coelho para os polissacarídeos capsulares dos tipos a, c, d, e, e f. Enquanto que, o *kit Type b* apresenta antissoro liofilizado produzido em coelho exclusivo para a identificação de Hib.

A partir de um crescimento recente em AchVx, a sorotipagem das amostras foi realizada pela mistura de uma alçada da cultura bacteriana com uma gota do antissoro específico, previamente depositada sobre lâminas de vidro novas, limpas e desengorduradas. Apenas padrões de aglutinação forte ( $\geq 75\%$  de aglutinação, com fundo totalmente límpido ou apenas ligeiramente turvo) e visualizados em até 1 min após a mistura, foram considerados como reações positivas, conforme as recomendações do fabricante.

Neste estudo, as amostras foram classificadas como tipo b, não b (tipos a, c, d, e, f) ou ainda, quando não aglutinaram com os antissoros testados, como não tipáveis (HiNT).

### 2.6.2 Determinação dos tipos capsulares de *S. pneumoniae*

Os tipos capsulares das amostras de *S. pneumoniae* foram identificados por metodologia de reação em cadeia da polimerase – PCR, em protocolos multiplex, de acordo com as recomendações de DIAS e colaboradores (2007), com modificações. Foram utilizados neste estudo, oligonucleotídeos iniciadores específicos apenas para detecção dos genes que codificam para os tipos capsulares incluídos como alvos na vacina decavalente (PCV10), que compõem o programa de vacinação brasileiro.

Os pares de nucleotídeos específicos para a amplificação dos tipos capsulares avaliados foram agrupados em duas reações de PCR, sendo que cada uma delas foi definida para a identificação de cinco tipos distintos. Assim, a Reação 1 foi constituída para caracterizar os tipos 6A/B, 9V, 14F, 19F e 23F; e a Reação 2 os tipos 1, 4, 5, 18 e 7F. Também foi incluído em ambas as reações de PCR, um par de oligonucleotídeos específicos para a amplificação de um segmento específico do gene *cpsA*, como controle positivo das reações, por ser detectado na quase totalidade das amostras da espécie *S. pneumoniae*.

#### 2.6.2.1 Obtenção do DNA cromossômico

A partir de cultivos recentes em meio ASgC, foram preparadas suspensões bacterianas em tubos tipo Eppendorf (Eppendorf AG) contendo 200 µL de uma solução aquosa da resina Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 5% p/v e 200 mg/mL de proteinase K (Invitrogen – ThermoFisher Scientific), como descrito por PINTO *et al.*(2013). As suspensões foram primeiramente, incubadas a 56°C por 1 h, em seguida homogeneizadas em vortex, por 10 seg, e submetidas a uma nova incubação a 95°C, durante 10 min. Após centrifugação a 10.000 x g por 3 min, o sobrenadante foi utilizado como DNA molde.

#### 2.6.2.2 PCR

A mistura de reação (para ambos os protocolos – Reações 1 e 2), para um volume final de 25 µL, foi constituída de tampão PCR 1X, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de *TaqPlatinum*(obtidos de Invitrogen Co.–ThermoFisher Scientific) e os oligonucleotídeos iniciadores nas concentrações e combinações específicas (Tabela 1), dependendo do protocolo. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL da suspensão de DNA molde.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems *Veriti 96-Well Thermal Cycler*–ThermoFisher Scientific), com a seguinte



programação: 1 ciclo inicial de 4 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 55°C (anelamento) e 1 min a 72°C (extensão); 1 ciclo final de 10 min a 72°C.

Foram utilizadas as seguintes amostras de referência como controles positivos das reações: Reação 1 – Sp1679, Sp1665, Sp1680, Sp1695 e Sp1736, representantes dos tipos 6A, 9V, 14F, 19F e 23F, respectivamente; Reação 2 – Sp1714, Sp1704, Sp1039, Sp837 e Sp1740, representantes dos tipos 1, 4, 5,7F e 18C, respectivamente. Além disso, todas apresentam produtos de amplificação para *cpsA*.

Tabela 1- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, respectivas concentrações e Tamanho do produto de amplificação, relativos ao protocolo utilizado nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos tipos capsulares das amostras de *Streptococcus pneumoniae* avaliadas neste estudo.

<i>Tipo / Gene</i>	<i>Oligonucleotídeo / Sequência (sentido 3' – 5')</i>	<i>Tamanho do produto (em pb)</i>	<i>Concentração de uso(em µM)</i>
<i>Reação 1:</i>			
<i>6A/B</i>	<i>F: AATTGTATTTTATTCATGCCTATATCTGG R: TTAGCGGAGATAAATTTAAAATGATGACTA</i>	250	0,5
<i>9V</i>	<i>F: CTTCTAGTTAAAAATTCTAAATTTTCTAAG R: GTCCCAATACCAGTCCTTGCAACACAAG</i>	753	1,5
<i>14F</i>	<i>F: GAAATGTTACTTGGCGCAGGTGTCAGAATT R: GCCAATACTTCTTAGTCTCTCAGATGAAT</i>	189	1,0
<i>19F</i>	<i>F: GTTAAGATTGCTGATCGATTATTGATATCC R: GTAATATGCTTTTAGGGCGTTTATGGCGATAG</i>	304	1,5
<i>23F</i>	<i>F: GTAACAGTTGCTGTAGAGGGAATTGGCTTTTC R: CACAACACCTAACACACGATGGCTATATGATTC</i>	384	1,5
<i>Reação 2:</i>			
<i>1</i>	<i>F: CTCTATAGAATGGAGTATATAAACTATGGTTA R: CCAAAGAAAATACTAACATTATCACAATATTGG</i>	208	1,0
<i>4</i>	<i>F: CTGTTACTTGTCTGGACTCTCGATAATTGG R: GCCCACTCCTGTTAAAATCCTACCCGCATTG</i>	430	1,5
<i>5</i>	<i>F: ATACCTACACAACCTTCTGATTATGCCTTTGTG R: GCTCGATAAACATAATCAATATTTGAAAAAGTA</i>	362	1,5
<i>7F</i>	<i>F: CCTACGGGAGGATATAAAATTATTTTGTAG R: CAAATACACCACTATAGGCTGTTGAGACTAAC</i>	826	2,0
<i>18C</i>	<i>F: CTTAATAGCTCTCATTATTCITTTTTTAAGCC R: TTATCTGTAAACCATATCAGCATCTGAAAC</i>	573	1,25
<i>cpsA</i>	<i>F: GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC R: GAATATTTTCATTATCAGTCCAGTC</i>	160	1,5

Legenda: , Sorotipos da espécie *Streptococcus pneumoniae*; 6A, 9V, 14F, 19F e 23F, 1, 4, 5,7F e 18C e gene *cpsA* .

Fonte: CDC (2014).

### 2.6.2.3 Detecção dos produtos de amplificação

Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% (Invitrogen Co.–ThermoFisher Scientific), em tampão TBE 0,5X (Ambion *10X TBE, Tris-borate-EDTA*–ThermoFisher Scientific) por 1 h a 100 V. Padrões de pares de bases (*100pb DNA Ladder*,Invitrogen Co.–ThermoFisher Scientific) foram incluídos às corridas eletroforéticas, para estimar o tamanho dos produtos de amplificação.

Após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/ml, Bio-Rad Labs.), os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com auxílio de um sistema de captação de imagens *MiniBis Pro* (DNR Bio-Imaging Systems, Israel) e avaliados visualmente.

## 2.7 Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Para a determinação de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados testes de difusão em disco (TDD) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando-se fitas de teste E (*E-test*®, bioMérieux), para as amostras de *S. pneumoniae*.

As amostras de referência ATCC 49247 e ATCC 49619 de *H.influenzae* e *S. pneumoniae*, respectivamente, foram utilizadas como controle da qualidade dos testes.

### 2.7.1 Difusão em Ágar – TDA

A partir de cultivos recentes (em AchVx, para as amostras de *H. influenzae*; e em ASgC, para *S. pneumoniae*) foram confeccionadas suspensões bacterianas em solução salina fisiológica, com turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland, que foram semeadas em três direções, com auxílio de *swab*sestéreis, em meios de cultura específicos, a fim de se obter um crescimento confluyente.

#### 2.7.1.1 TDA para *H. influenzae*

Para as amostras de *H.influenzae*, as suspensões padronizadas foram semeadas no meio HTM – *Haemophilus Test Agar* (PlastLabor), segundo recomendações do CLSI, 2015. Sobre o inóculo, foram depositados discos de papel de filtro (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) impregnados com os seguintes antimicrobianos nas respectivas concentrações: ampicilina 10µg; cefotaxima 30µg; cloranfenicol 30µg; imipenem 10µg; e rifampicina 5µg.

#### 2.7.1.2 TDA para *S. pneumoniae*

As suspensões padronizadas foram semeadas em meio ágar Müeller Hinton acrescido de 5% de sangue de carneiro (v/v) (MHSg, PlastLabor), conforme recomendações do CLSI, 2015. Após semeadura, sobre o inóculo foram depositados discos de papel de filtro (Oxoid) com os seguintes antimicrobianos e concentrações: eritromicina 15µg; levofloxacina 5µg; tetraciclina 30µg; oxacilina 1µg; e sulfametazol/trimetoprim 21,25µg/23,75µg.

#### 2.7.1.3 Leitura e interpretação dos resultados

Após semeadura e aplicação dos discos, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os halos de inibição do crescimento foram medidos com auxílio de paquímetro e os resultados interpretados segundo as recomendações do CLSI 2015, para as categorias sensível, intermediário (quando cabível) ou resistente.

### 2.7.2 Determinação do fenótipo de resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas

As amostras que apresentaram resistência à eritromicina no TDA foram caracterizadas quanto aos seus fenótipos de resistência e presença de resistência induzida à clindamicina, através do teste de duplo-disco (CLSI, 2015). Para tal, suspensões bacterianas padronizadas para o padrão 0,5 da escala de McFarland, confeccionadas em solução salina fisiológica, foram semeadas, com auxílio de swabsestéreis, em meio MHSg, conforme especificado no item 3.7.1. Discos de papel de filtro (Oxoid) impregnados com eritromicina (15µg) e clindamicina(2µg) foram depositados sobre o inóculo, respeitando-se uma distância de 12mm entre eles. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após incubação, os resultados foram avaliados de acordo com as recomendações do CLSI (2015) e de PÉREZ-TRALLERO *et al.* (2001). Os demais fenótipos de resistência são caracterizados como: (i) MLS<sub>B</sub>, quando as amostras demonstram resistência concomitante eritromicina e a clindamicina (induzível ou não); (ii) M, quando as amostras são sensíveis a clindamicina e resistentes à eritromicina.). A presença de resistência indutiva à clindamicina é identificada quando se observa um achatamento no halo de inibição deste antimicrobiano (zona D), na região adjacente ao disco de eritromicina.

### 2.7.2 Determinação da CIM

Foram determinados os valores de CIM para eritromicina e penicilina, para amostras de *S. pneumoniae*, que apresentaram resistência ou categoria intermediária no TDA para eritromicina e oxacilina.

Os testes foram realizados a partir de suspensões bacterianas, em solução salina fisiológica estéril, padronizadas para o padrão 0,5 de McFarland, confeccionadas a partir de cultivos recentes, e semeadas em seguida em meio de cultura específico (MHSg). Sobre os inóculos bacterianos foram depositadas fitas de teste E do respectivo antimicrobiano testado. As fitas de teste E continham as seguintes faixas de

concentração: eritromicina 0,016µg/mL a 256µg/mL; penicilina de 0,002 µg/mL a 32 µg/mL. Após incubação a 37°C por 24 h em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, o valor da CIM para cada antimicrobiano foi determinado pela leitura da concentração correspondente no ponto de interseção entre a origem da elipse de inibição do crescimento bacteriano e a fita, segundo recomendações do fabricante. A interpretação dos resultados seguiu as recomendações do CLSI (2015).

## 2.8 Detecção da expressão de beta-lactamase por *H. influenzae* e *M. catarrhalis*

Todas as amostras pertencentes à espécie *M. catarrhalis* e as de *H. influenzae* que apresentaram resistência a ampicilina no TDA foram avaliadas para a expressão de beta-lactamase. Os testes foram realizados com a utilização do kit comercial *Beta-Lactamase Identification Sticks* (Oxoid). Neste teste, são utilizados pequenos bastões plásticos que apresentam uma das extremidades impregnada com nitrocefim, uma cefalosporina cromogênica.

A partir de cultivos recentes, uma pequena quantidade de massa bacteriana foi recolhida com a ponta do bastão com nitrocefim, em seguida deixado por até 15 min (com observação periódica a cada 5 min), em temperatura ambiente e câmara úmida. A beta-lactamase hidrolisa a molécula de nitrocefim liberando o cromógeno e acarretando, nos testes positivos, mudança de cor para rosa forte ou púrpura.

## 2.9 Análises dos agrupamentos formados pela metodologia de MALDI-TOF MS com emprego de algoritmos matemáticos

Os espectros gerados por metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF foram utilizados para avaliar o potencial discriminatório desta metodologia no agrupamento por similaridade das amostras pertencentes às espécies incluídas neste estudo.

Os extratos bacterianos foram preparados como descrito no item 3.4 de Materiais e Métodos. Os espectros foram adquiridos no modo linear e a uma frequência de 20Hz (2.000-20.000 Da) e a partir de três medidas em cada *spot*. Os espectros de

massa foram editados pelo software *Flex Analysis* (Bruker) aplicando a opção *baseline subtraction* para retirada de “ruídos”. Arquivos na forma .txt e representativos dos espectros de massa obtidos foram, então, importados para um banco de dados específico construído no software BioNumerics (Applied Math, Bélgica).

A análise do agrupamento (*cluster analysis*) das amostras de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e de *S. pneumoniae* foi realizada aplicando-se o coeficiente linear de Pearson, para geração de graus de similaridade, e do algoritmo *Neighbor Joining* utilizado para construção de árvores representativas das distâncias entre as amostras.

## 2.10 Testes estatísticos

Para análise da significância dos resultados frente às diversas variáveis apresentadas (idade dos pacientes, estação do ano para coleta do material clínico, presença de microrganismos no plantio primário, doenças de base, sintomas respiratórios, uso prévio de antimicrobianos, entre outros) foi aplicado o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

### 3 RESULTADOS

Foram avaliadas 204 crianças atendidas no HUPE/UERJ por ocasião da consulta ambulatorial (N=174) ou hospitalizadas (N=30) nas enfermarias de Pediatria e Cirurgia Infantil, no período de fevereiro a outubro de 2015.

As coletas foram realizadas nas seguintes datas: (i) no verão (N=73) – 5 de fevereiro (18 pacientes), 25 de fevereiro (29 pacientes) e 9 de março (26 pacientes);(ii) no outono (N=60 pacientes) – 30 de março (28 pacientes) e 27 de abril (32 pacientes);(iii) no inverno (N=47 pacientes) – 9 de julho (17 pacientes) e 20 de agosto (30 pacientes); e (iv) na primavera (N=24pacientes) – 20 de outubro.

A população que fez parte deste estudo foi reunida de acordo com a faixa etária em sete grupos conforme apresentado na Tabela 2. O maior número de crianças avaliadas foi concentrado na faixa etária de  $> 6$  meses a  $\leq 2$  anos, reunindo dois dos grupos etários (42,2%; 86/204).

Dentre as outras características avaliadas, 34,3% (70/204) dos pacientes apresentavam alguma doença de base e/ou alterações hereditárias ou congênitas no momento da coleta do material clínico, destacando-se as relacionadas ao trato urinário (5,9%; 12/204), seguido de sistema nervoso central e trato respiratório (5,4%; 11/204 cada). Também, 10,8% (22/204) eram acometidos por doenças de infectocontagiosas, de etiologia bacteriana, viral ou parasitária, destacando-se principalmente, síndrome da imunodeficiência humana adquirida (3,4; 7/204) e sífilis (2,9; 6/204), sendo nestes casos ambas de origem congênita.

Dentre a população avaliada, 30 pacientes (14,7%) estavam em uso de um ou mais antimicrobianos, principalmente cefalosporinas (9,8%; 20/204), e dois outros (0,9%) de antivirais. A maioria das crianças (87,7%; 179/204) apresentou cartão de vacinação atualizado. A vacinação com PCV10, visando à prevenção de infecções por *S. pneumoniae*, e a tetravalente ou a pentavalente, para a prevenção das infecções por *H. influenzae* tipo b foram às consideradas nas análises que compuseram este estudo. Treze pacientes (6,4%) não portavam cartão de vacinação no momento da coleta do material clínico. Adicionalmente, 12 crianças (5,9%) apresentavam idade inferior ao preconizado para o início dos protocolos vacinais.

As características da população avaliada estão discriminadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características da população avaliada neste estudo, correspondente a 2014 crianças atendidas no Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ.

Característica	Pacientes nº (%)
<b>Atendimento ambulatorial</b>	174 (85,3)
<b>Hospitalizado</b>	30 (14,7)
<b>Idade:</b>	
≤ 2 meses	19 (9,3)
> 2 meses ≤ 4 meses	14 (6,9)
> 4 meses ≤ 6 meses	14 (6,9)
> 6 meses ≤ 1 ano	43 (21,1)
> 1 ano ≤ 2 anos	43 (21,1)
> 2 anos ≤ 4 anos	51 (25,0)
> 4 anos < 6 anos	20 (9,8)
<b>Doenças de base, alterações hereditárias ou congênitas:</b>	70 (34,4)*
Trato urinário	12 (5,9)
SNC	11 (5,4)
Trato respiratório	11 (5,4)
Trato gastrointestinal	6 (2,9)
Sistema circulatório / sanguíneo / linfático	6 (2,9)
Genética	7 (3,4)
Outros	17 (8,3)
<b>Doenças infecciosas e parasitárias:</b>	22 (10,8)
HIV	7 (3,4)
Sífilis	6 (2,9)
Toxoplasmose	2 (0,9)
CMV	2 (0,9)
Síndrome da pele escaldada	2 (0,9)
Hepatite	1 (0,5)
Enterocolite necrotizante	1 (0,5)
Sinusite	1 (0,5)
<b>Uso de antibacterianos:</b>	30 (14,7)**
Amoxicilina	6 (2,9)
Azitromicina	1 (0,5)
Benzilpenicilina / Penicilina	3 (1,5)
Cefalosporinas	20 (9,8)
Ciprofloxacina	2 (0,9)
Clindamicina	2 (0,9)
Meropenem	1 (0,5)
Neomicina	1 (0,5)
Oxacilina	1 (0,5)
Trimetoprim-sulfametoxazol	6 (2,9)
<b>Uso de antivirais</b>	2 (0,9)
<b>Vacinação:</b>	
Anti-pneumocócica (PVC10)	179 (87,7)
Tetravalente / Pentavalente	179 (87,7)
Não vacinado	12 (5,9)
Não declarado	13 (6,4)

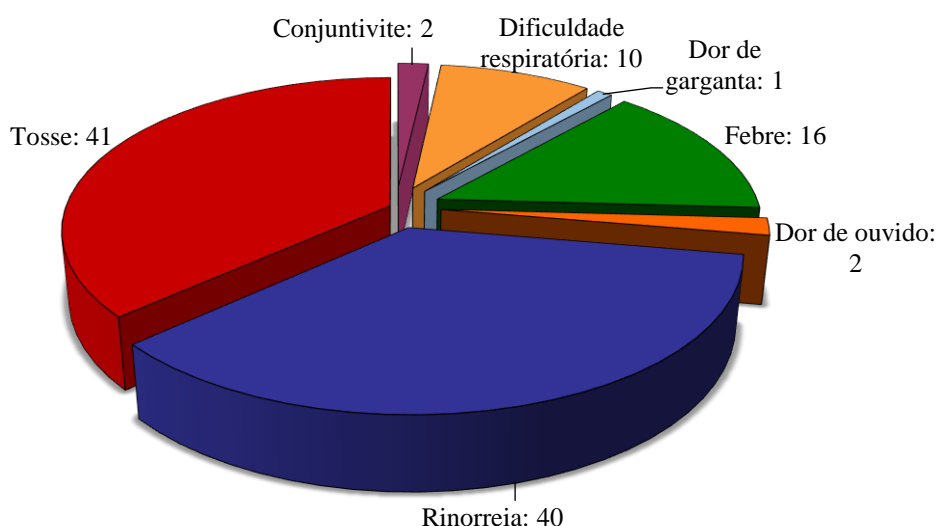
Legenda: SCN, Sistema Nervoso Central: hidrocefalia, HIV, vírus da imunodeficiência humana, CMV citomegalovírus.

Fonte : A Autora, 2016.



A presença de sintomas respiratórios durante a coleta do material clínico também foi um parâmetro avaliado neste estudo. Em 78 pacientes (38,2%) foram relatados sintomas respiratórios. Destes, os principais foram tosse (20,1%; 41/204) e rinorreia (19,6%; 40/204), seguidos de febre (7,8%; 16/204). Em alguns pacientes foi observada a presença concomitante de mais de um sintoma como: tosse e rinorreia (14 pacientes) e febre (7 pacientes); tosse e febre (1 paciente) e dor de ouvido (1 paciente); tosse e dificuldade respiratória (1 paciente); febre e dor de ouvido (1 paciente); febre e dificuldade respiratória (1 paciente). A Figura 1 apresenta a frequência dos sintomas respiratórios na população avaliada.

Figura 1 - Distribuição dos sintomas respiratórios<sup>1</sup>(em número de pacientes) na população pediátrica avaliada neste estudo.



Legenda: tosse 41 pacientes, conjuntivite 02 pacientes, dificuldade respiratória 10 pacientes, dor de garganta 01 paciente, febre 16 pacientes, dor de ouvido 02 pacientes e rinorreia 40 pacientes.

Nota: Em alguns pacientes foi identificada a presença de mais de um sintoma respiratório.

Fonte: O Autor, 2016.

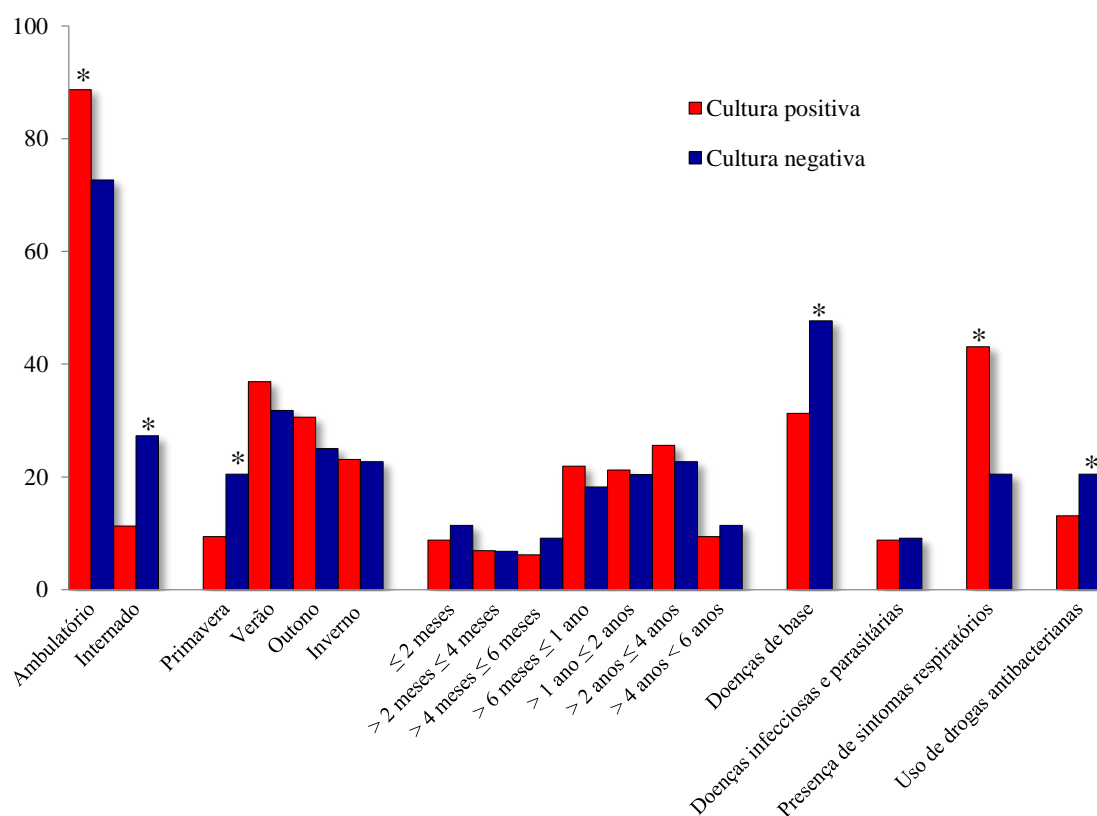
Dos 204 pacientes avaliados, 44 (21,6%) apresentaram cultura negativa. Foram consideradas como culturas negativas a ausência de crescimento bacteriano em meio ASg ou AChVx por até 48h de incubação a 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Dentre os pacientes que apresentaram cultura negativa, 20,5% (9/44) estavam em uso de antimicrobianos e 40% (12/30) estavam hospitalizados.

A Figura 2 demonstra as características dos pacientes que apresentaram cultura negativa em relação aos pacientes com cultura positiva (definida como qualquer

crescimento bacteriano). A aplicação do teste T de Student revelou significância ( $p < 0,01$ ) para as diferenças observadas nas seguintes variáveis: (i) para prevalência de culturas positivas – origem do paciente (ambulatorial) e presença de sintomas respiratórios; para prevalência de culturas negativas – origem do paciente (hospitalizado), período da coleta do material clínico (primavera apenas), presença de doenças de base e uso de drogas antibacterianas.

Figura 2 - Frequência de culturas positivas<sup>1</sup>(N= 160) e negativas<sup>2</sup>(N= 44) em relação às diferentes variáveis avaliadas na população pediátrica (N= 204) incluída neste estudo.



Notas: <sup>1</sup>Cultura positiva – presença de qualquer crescimento bacteriano no plantio primário em até 48 h de incubação a 37°C e em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e em ambos os meios de cultura utilizados (ágar sangue de carneiro e ágar chocolate suplementado com Vitox); <sup>2</sup>Cultura negativa – ausência de crescimento em até 48h de incubação nas mesmas condições. As diferenças observadas nas variáveis indicadas com asteriscos foram estatisticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Fonte: A Autora, 2016.

A partir das 160 culturas positivas, foram selecionadas 256 colônias (amostras bacterianas distintas) que apresentaram características sugestivas de interesse. Todas essas amostras foram inicialmente avaliadas por metodologia de MALDI-TOF.

Das 256 amostras bacterianas, 10 não foram caracterizadas por espectrometria de massas, sendo excluídas do estudo nesta etapa. As demais foram caracterizadas com escores de confiança variáveis. Os principais gêneros identificados foram: *Streptococcus*, *Moraxella*, *Corynebacterium* e *Haemophilus* (Tabela 3).

Cabe ressaltar que as amostras não pertencentes às espécies alvo deste estudo foram selecionadas ao acaso, por apresentarem semelhanças coloniais. Não refletindo, portanto, sua real frequência na população avaliada. Entretanto, consideramos importante o registro do isolamento desses microrganismos. Cabe ressaltar que a maioria dessas espécies faz parte da microbiota de nasofaringe, podendo atuar como oportunistas.

A Tabela 3 demonstra os gêneros e espécies caracterizados por MALDI-TOF. Foram consideradas todas as identificações determinadas pelo equipamento, que apresentaram escores  $\geq 1,7$

Tabela 3- Distribuição dos gêneros e espécies bacterianos a partir de 256 amostras

Bacterianas isoladas neste estudo e caracterizadas por metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF. (Continua)

Gênero / Espécies	Nº de amostras	Escores
<b><i>Streptococcus</i></b>	<b>79</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	72	1,930 – 2,573
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3	1,921 – 1,958
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	1,885; 2,054
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	1,736
<i>Streptococcus oralis</i>	1	2,311
<b><i>Moraxella</i></b>	<b>64</b>	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	52	1,945 – 2,526
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	12	1,773 – 2,365
<b><i>Corynebacterium</i></b>	<b>52</b>	
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	39	1,704 – 2,488
<i>Corynebacterium propinquum</i>	12	1,818 – 2,517
<i>Corynebacterium accolens</i>	1	2,056
<b><i>Haemophilus</i></b>	<b>33</b>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	32	1,944 – 2,516
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1	2,071
<b><i>Staphylococcus</i></b>	<b>10</b>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	2,032 – 2,302
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	2	2,212; 2,030
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	2,211
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	2,208

Tabela 3- Distribuição dos gêneros e espécies bacterianas a partir de 256 amostras Bacterianas isoladas neste estudo e caracterizadas por metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF. (Conclusão)

<b><i>Acinetobacter</i></b>	<b>3</b>	
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	2	1,786; 1,929
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	2,514
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	2,075; 2,101
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1	2,124
<i>Neisseria flavescens</i>	1	1,894
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	1	1,949

Nota: Considerados os escores com valores >1,7.

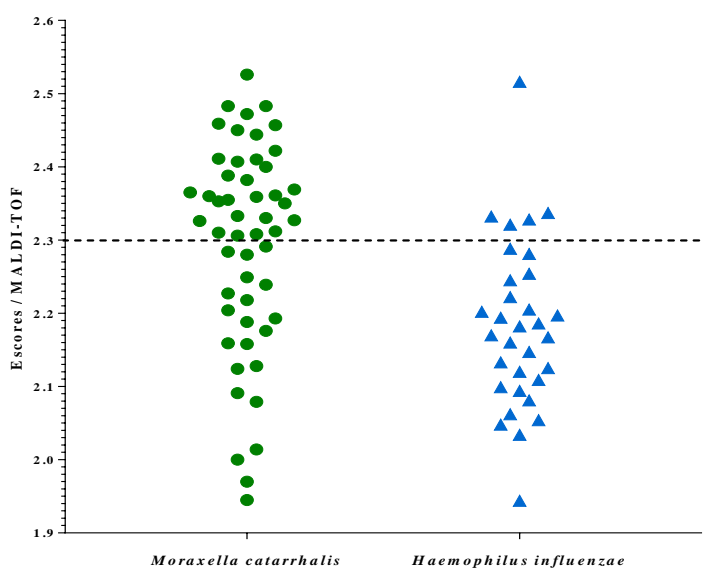
Fonte : A Autora, 2016.

As amostras caracterizadas por MALDI-TOF como *H. influenzae* (N=32), *M. catarrhalis* (N=52) e *S. pneumoniae* (N=72) foram submetidas a testes fisiológicos convencionais para confirmação dos dados.

Todas as amostras caracterizadas como *H. influenzae* por espectrometria de massas MALDI-TOF (valores de escores de 1,944 – 2,516) foram positivas nos testes de catalase, oxidase e satelitismo. Também, cresceram apenas na presença de ambos os fatores X e V. Os testes fisiológicos confirmaram a identificação proveniente de espectrometria de massas. Entretanto, como observado na Figura 3, uma maioria significativa (84,4%; 27/32) de amostras, caracterizadas como *H. influenzae*, apresentou escores >1,9 <2,3.

Da mesma forma, em relação à espécie *M. catarrhalis*, todas as 52 amostras cujos escores obtidos por MALDI-TOF variaram de 1,945 a 2,526, foram positivas nos testes de catalase, oxidase e DNase. Estes dados também confirmaram a identificação por metodologia de MALDI-TOF. Para *M. catarrhalis*, os resultados referentes aos escores de 31 amostras (59,6%) foram superiores a 2,3; enquanto que, 21 amostras (40,4%) apresentaram valores >1,9 <2,3. A distribuição das amostras em relação aos valores dos escores pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 - Distribuição dos valores de escores obtidos por metodologia de MALDI TOF em relação 32 amostras de *Haemophilus influenzae* e 52 de *Moraxella catarrhalis*.



Nota: A linha tracejada ressalta o valor padronizado pelo fabricante do equipamento de MALDI-TOF como determinante de identificação segura para gênero e espécie (Ver Materiais e Métodos item 3.4).

Fonte: A Autora, 2016.

Assim sendo, para as amostras classificadas como pertencentes às espécies *H. influenzae* e *M. catarrhalis* com escores superiores a 1,9 (determinados como obtidos pela metodologia de MALDI-TOF) pode ser observada uma concordância de 100% com a caracterização por testes fisiológicos convencionais.

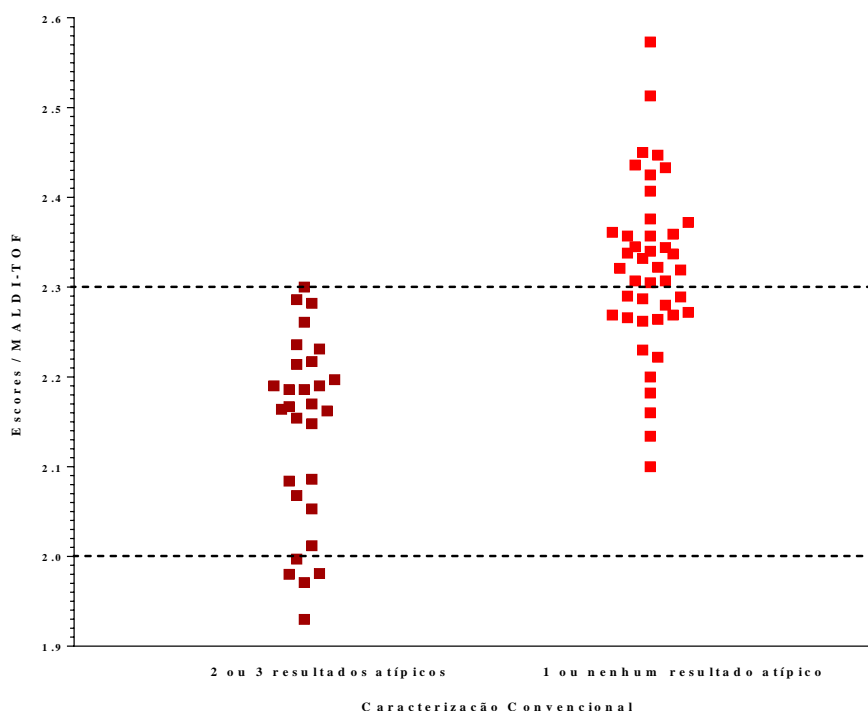
Para as 72 amostras caracterizadas como pertencentes à espécie *S. pneumoniae* por MALDI-TOF, os resultados dos testes fisiológicos convencionais foram variados e diversas amostras demonstraram comportamento atípico ou não usual. Para estabelecer uma correlação de ambas as metodologias, as amostras foram divididas em dois grupos: (i) as que apresentaram resultados atípicos em dois ou três testes, correspondendo a 40,3% (29/72); e (ii) as que apresentaram resultado atípico em apenas um dos testes (susceptibilidade à optoquina) ou que apresentaram resultados compatíveis nos três testes (59,7%; 43/72). Dentre as incluídas no primeiro grupo (N=29), cinco amostras (17,2%; 5/29) apresentaram escores < 2,0; 23 amostras (79,3%; 23/29) entre 2,0 e 2,29; e uma (3,5%; 1/29) igual a 2,3. Em relação às do segundo grupo, 39,5% (17/43) apresentaram escore  $\geq 2,1 < 2,3$ ; e 60,5% (26/43)  $> 2,3$  (Figura

4). Não foi observada uma relação direta entre o valor do escore obtido por MALDI-TOF e uma determinada característica atípica.

De acordo com os resultados obtidos, foi considerada uma baixa correlação entre as metodologias de identificação utilizadas para as amostras da espécie *S. pneumoniae*. Considerando a metodologia de caracterização convencional como padrão ouro, apenas as amostras que atenderam ao critério estabelecido de no máximo uma atipia (43 amostras), sendo esta a resistência a optoquina, foram consideradas como pertencentes à espécie *S. pneumoniae* e, portanto, incluídas nas demais análises deste estudo.

Assim, das 43 amostras incluídas neste estudo como pertencentes à espécie *S. pneumoniae*, cinco (11,6%; 5/43) foram resistentes à optoquina. Essas amostras foram isoladas em coletas realizadas no verão (duas amostras), outono (uma amostra) e inverno (duas amostras), de crianças em diferentes faixas etárias, vacinadas e atendidas em ambulatório. Os escores obtidos por MALDI-TOF para as amostras resistentes a optoquina foram: 2,266; 2,287; 2,307; 2,433 e 2,447.

Figura 4 - Comparação entre a metodologia de caracterização por espectrometria de massas MALDI-TOF e testes fisiológicos convencionais para amostras de *S. pneumoniae*



Notas: As linhastracejadas ressaltam os limites padronizados pelo fabricante do equipamento de MALDI-TOF como determinante de identificação segura para gênero e espécie e apenas para gênero e provável para espécie. Testes fisiológicos utilizados foram susceptibilidade à optoquina, bile-solubilidade e aglutinação pelo látex espécie-específico (Ver Materiais e Métodos item 3.4 e A linha tracejada resalta o valor padronizado pelo fabricante do equipamento de MALDI-TOF como determinante de identificação segura para gênero e espécie (Ver Materiais e Métodos item 3.4 e 3.5). Os asteriscos localizam as amostras que apresentaram resistência à optoquina.

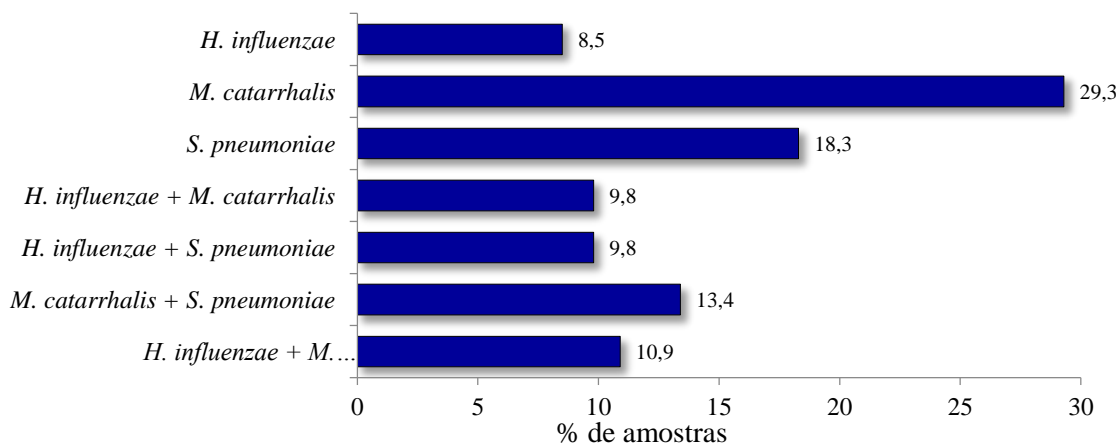
Fonte: A Autora, 2016.

Dessa forma, foram consideradas para as demais análises que compuseram este estudo 32 amostras de *H. influenzae*, 52 de *M. catarrhalis* e 43 de *S. pneumoniae*, obtidas de um total de 82 pacientes. Portanto, a taxa de isolamento dessas espécies foi de 40,2% (82/204); sendo, 15,7% para *H. influenzae* (32/204), 25,5% *M. catarrhalis* (52/204) e 21,1% (43/204) *S. pneumoniae*.

Dentre os 82 pacientes, a maioria (54,8%, 45/82) apresentou apenas uma das espécies incluídas neste estudo. Enquanto que, em 37 pacientes (45,1%, 37/82) foi identificada a presença concomitante de duas ou de todas as três espécies bacterianas estudadas. A Figura 5 apresenta a frequência de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* em

separado ou quando isolados de maneira concomitante a partir da população pediátrica avaliada.

Figura 5- Distribuição de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae*, isolado Separadamente ou de forma concomitante, a partir de 82 pacientes pediátricos que apresentaram cultura positiva para essas espécies.



Notas: Os números acima das barras representam a frequência de cada categoria.

Fonte: A Autora, 2016.

A quase totalidade das amostras foi obtida de pacientes ambulatoriais: 31 amostras de *H. influenzae*, 48 de *M. catarrhalis* e 42 de *S. pneumoniae*. Considerando-se o total de pacientes de origem ambulatorial, os resultados demonstraram uma frequência de 17,8% (31/174) de *H. influenzae*, 27,6% (48/174) de *M. catarrhalis* e 24,1% (42/174) de *S. pneumoniae*.

A presença de doenças de base, ou alterações hereditárias ou congênitas foi observada em 18,8% (6/32) dentre pacientes portadores de *H. influenzae*, 25,0% (13/52) de *M. catarrhalis* e 20,9% (9/43) de *S. pneumoniae*. Considerando-se a frequência de doenças infecto-parasitárias entre esses pacientes, os dados compilados demonstraram que esta variável pode ser identificada em dois pacientes (6,3%; 2/32) portadores de *H. influenzae* (um apresentando CMV e o outro, toxoplasmose); em três (5,8; 3/52) de *M. catarrhalis* (um caso de sinusite e dois de CMV, sendo um deles com isolamento concomitante de *H. influenzae*); e dois (4,7%; 2/43) de *S. pneumoniae* (um paciente apresentando toxoplasmose e outro sífilis).

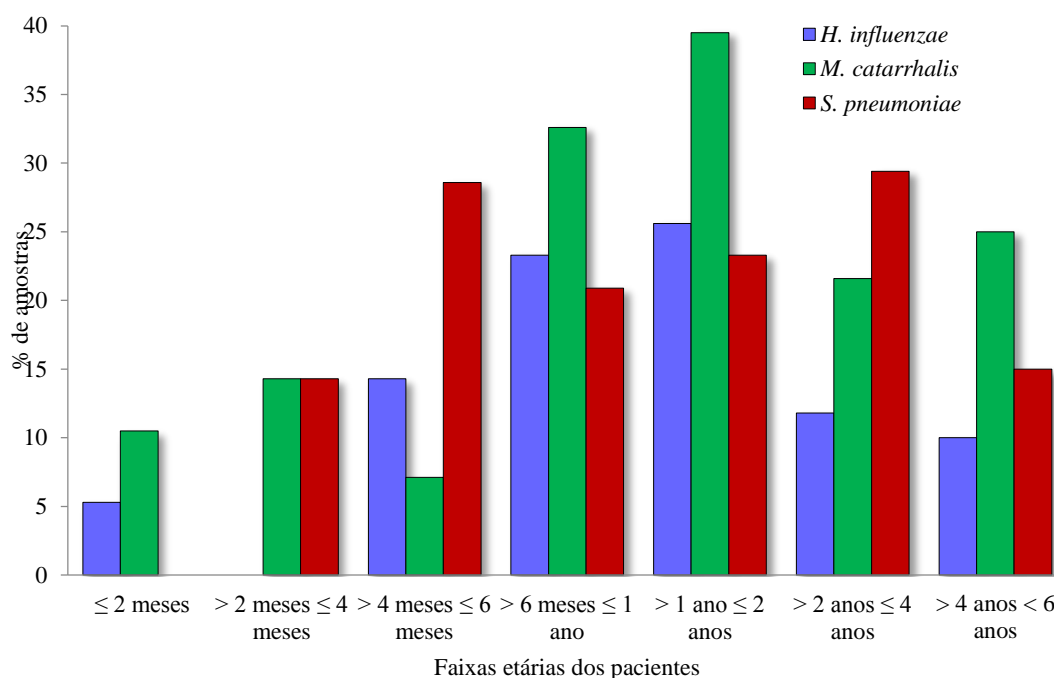


Com relação à vacinação, a quase totalidade dos pacientes dos quais foram isoladas as espécies bacterianas em estudo foram vacinados com PCV10 e com a tetravalente ou pentavalente (30 pacientes com *H. influenzae*, 49 com *M. catarrhalis* e 49 com *S. pneumoniae*, para ambos os esquemas vacinais).

Por outro lado, nenhum paciente portador de *S. pneumoniae* estava em uso de antibioticoterapia, e apenas dois com *H. influenzae* e três com *M. catarrhalis* faziam uso de antimicrobianos no momento da coleta do espécime clínico. Os dois pacientes em que foi isolado *H. influenzae* estavam em uso de amoxicilina. Os outros dois pacientes que apresentaram *M. catarrhalis* utilizavam cefalosporinas (cefalexina e cefepime) e o terceiro, amoxicilina.

Pode ser observada uma maior frequência de *M. catarrhalis* e de *H. influenzae* em pacientes com idade maior que seis meses a igual ou menor que dois anos. Já em relação aos portadores de *S. pneumoniae* as maiores taxas de isolamento foram relacionadas a dois grupos etários: (i) maior que quatro meses a igual ou menor que seis meses; (ii) maior que dois anos a igual ou menor que quatro anos. Cabe ressaltar que, *S. pneumoniae* não foi isolado de crianças com idade igual ou menor que dois meses. Da mesma forma, *H. influenzae* não foi identificado em crianças na faixa etária maior que dois meses a igual ou menor que quatro meses. A Figura 6 demonstra os resultados obtidos quanto à frequência das amostras em relação à faixa etária dos pacientes.

Figura 6- Frequência isolamento<sup>1</sup> de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* em relação à faixa etária de 204 crianças atendidas no HUPE/UERJ.



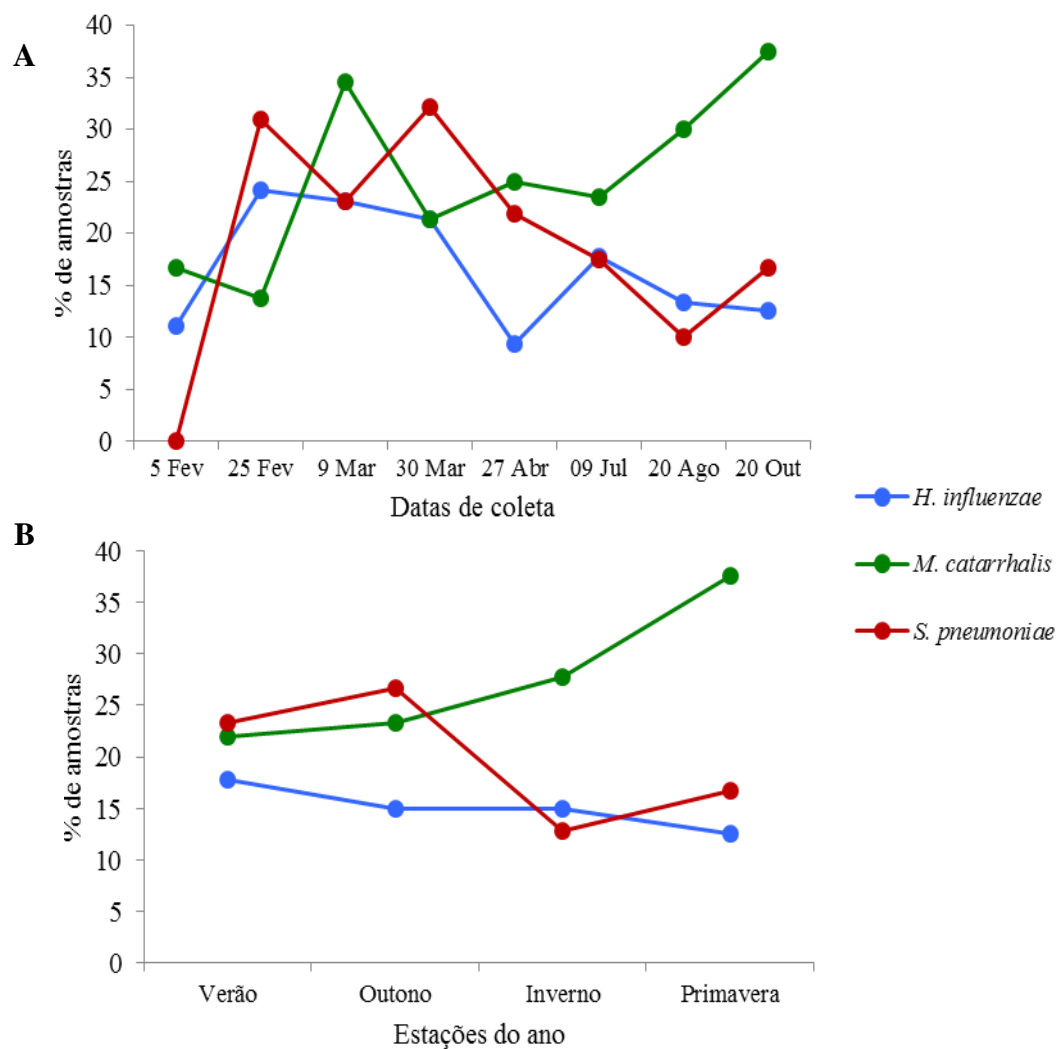
Nota: Os percentuais foram calculados considerando-se o número total de crianças por faixa etária.

Fonte: A Autora, 2016.

Considerando-se as datas de coleta do espécime clínico (Figura 7A), foi observado que as frequências de isolamento de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* foram menores nas coletas de abril a outubro. Por outro lado, os maiores valores de frequência para *S. pneumoniae* foram identificados a partir das coletas realizadas em 25 de fevereiro, 9 e 30 de março. Entretanto, nenhuma amostra desta espécie foi recuperada da coleta realizada em 5 de fevereiro. Em geral, perfil semelhante foi observado para as amostras de *H. influenzae*. Entretanto, para *M. catarrhalis* os resultados apontaram um padrão inverso. Na coleta realizada no dia 9 de março foi observado um aumento na sua frequência de isolamento, que após este período sofreu uma redução significativa. Nas datas seguintes, foi identificado um aumento progressivo nas taxas de isolamento desta espécie.

Todavia, o agrupamento das datas de coleta do material clínico de acordo com a estação do ano possibilitou identificar padrões de frequência diferentes entre as espécies. Os resultados desta análise sugeriram que a frequência de *H. influenzae* se manteve semelhante durante todo o período analisado, com um pequeno destaque no verão. Enquanto que, *M. catarrhalis* foi mais frequente na primavera e *S. pneumoniae*, no outono (Figura 7B).

Figura 7- Distribuição das frequências de isolamento das amostras de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* de acordo com a data de isolamento (A) e estação do ano correspondente (B).



Fonte: A Autora, 2016.

Foi avaliada também a presença de sintomas respiratórios nos pacientes portadores de uma ou mais espécies em estudo. Dos 82 pacientes que apresentaram uma ou mais de uma das espécies bacterianas alvos deste estudo, 47,6% (39/82) apresentaram uma ou mais sintomas respiratórios no momento da coleta do espécime clínico. A Tabela 4 demonstra os resultados obtidos com essa análise.

Tabela 4- Correlação entre a presença de sintomas respiratórios e a detecção *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* em pacientes pediátricos avaliados neste estudo.

Espécies	Nº (%)	Sintomas Respiratórios									
		C	DR	F	F+DR	RN	T	T+F	T+RN	T+F+DO	T+RN+F
<i>H. influenzae</i> (N=7)	5 (71,4)	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>M. catarrhalis</i> (N=24)	11 (45,8)	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>S. pneumoniae</i> (N=15)	6 (40,0)	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i> (N=8)	5 (62,5)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>H. influenzae</i> + <i>S. pneumoniae</i> (N=8)	4 (50,0)	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>M. catarrhalis</i> + <i>S. pneumoniae</i> (N=11)	5 (45,5)	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i> + <i>S. pneumoniae</i> (N=9)	3 (33,3)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+

Notas: Sintomas respiratórios: C, conjuntivite; DR, dificuldade respiratória; F, febre; T, tosse; RN, rinorreia; DO, dor de ouvido. +, presença; -, ausência.

Fonte: A Autora, 2016.

A sorotipagem das amostras de *H. influenzae* foi realizada por metodologia de aglutinação pelo látex. Os resultados revelaram que 83,3% (25 amostras) foram HiNT (não tipáveis), 13,3% (quatro amostras) não-Hib (reagiram com o conjunto não b, podendo ser a, c, d, e ou f) e 3,3% Hib (uma amostra).

As amostras não capsuladas ((HiNT) foram isoladas em diferentes períodos de coleta. As amostras não-Hib foram isoladas a partir das coletas de 25 de fevereiro (duas amostras), 30 de março e 20 de outubro de 2015, correspondendo às estações do verão, outono e primavera. A única amostra Hib foi isolada em 28 de agosto de 2015, no período de inverno.

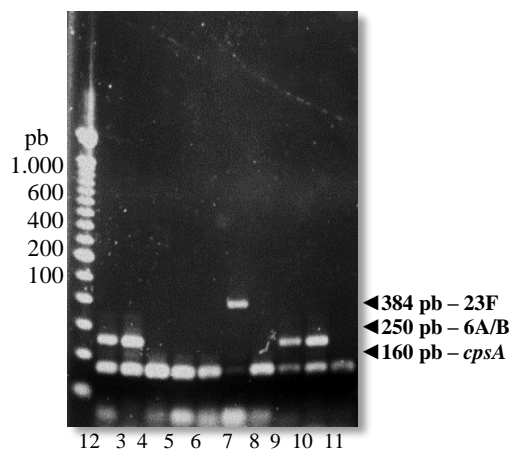
Os pacientes portadores das amostras capsuladas não-Hib eram de origem ambulatorial, apresentaram idade que variou de seis meses a três anos; todos vacinados com PCV10; um deles também vacinado com a tetravalente e três com a pentavalente. Dois deles apresentavam sintomas respiratórios no momento da coleta do material clínico (um dispneia e ou outro coriza) e, em todos eles, a presença de *H. influenzae* foi concomitante a outro patógeno (três em associação à *S. pneumoniae*; um com *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae*). Dentre os pacientes dos quais foram isoladas amostras HiNT, apenas dois não apresentavam registros de vacinação. Um deles por ainda não estar no período de vacinação (com um mês de idade) e o outro que não apresentou o cartão vacinal no momento da coleta do espécime clínico (não determinado).

O paciente portador da amostra Hib foi atendido em ambulatório, tinha idade de um ano e nove meses, apresentava sequelas de CMV congênito e havia sido vacinado com PCV10 e pentavalente. Também, não apresentava sintomas de acometimento do trato respiratório no momento da coleta do espécime clínico. A amostra Hib foi isolada concomitantemente a uma amostra de *M. catarrhalis*.

Os tipos capsulares de *S. pneumoniae* foram avaliados por PCR com um conjunto de iniciadores que contemplou aqueles presentes em PCV10. Dentre 40 amostras avaliadas (três amostras não puderam ser reativadas a partir do estoque mantido a -80°C), 35 (87,5%; 35/40) não apresentaram produto de amplificação com o conjunto de iniciadores utilizados para detecção dos tipos constantes na PCV10. Além disso, uma dessas amostras também não apresentou produto de amplificação para o gene *cpsA*. Essa amostra apresentou escore de 2,2 por metodologia de MALDI-TOF e todos os testes fisiológicos convencionais foram compatíveis com a caracterização da espécie *S. pneumoniae*. Esta amostra foi sensível a todos os antimicrobianos testados por TDA.

Das cinco amostras restantes, quatro (10%; 4/40) apresentaram reação positiva para 6A/6B e uma (2,5%; 1/40) para 23F. A quase totalidade (94,3%; 33/35) dos pacientes que apresentaram amostras de *S. pneumoniae* não tipáveis, pela metodologia empregada, haviam sido vacinados com PCV10. A Figura 8 apresenta um gel representativo da detecção de tipos capsulares de *S. pneumoniae* por PCR.

Figura 8 - Gel representativo da detecção dos tipos capsulares de *S. pneumoniae* por ação em cadeia da polimerase



Notas: Linhas 2, 3, 9, 10, amostras 6A/B; Linha 7, amostra 23F; Linhas 4, 5, 6 e 11, amostras não tipáveis.

Fonte: A Autora, 2016.

Dentre os cinco pacientes dos quais foram isoladas amostras tipáveis pelo conjunto de iniciadores utilizados, três (60,0%; 3/5) haviam sido vacinados. Para os demais não foi possível obter essa informação (não portavam cartão de vacinação no momento da coleta da amostra).

Das amostras pertencentes ao tipo 6A/6B, duas foram provenientes de pacientes gêmeos, com idade superior a três anos e vacinados. Uma destas amostras foi isolada concomitantemente a *H. influenzae* e, neste caso, o paciente apresentava sintoma respiratório no momento da coleta (dificuldade respiratória). Estas amostras foram isoladas no período de verão (coleta de 25 de fevereiro de 2015) e apresentaram biotipo típico, frente aos testes fisiológicos convencionais utilizados.

As demais amostras pertencentes ao tipo 6A/6B foram isoladas no período de inverno. Em uma delas, o paciente não apresentava sintomas respiratórios e não pode ser considerado vacinado por não apresentar o cartão vacinal no momento da coleta. A outra amostra apresentou resistência à optoquina, foi isolada de paciente vacinado e com sintomas respiratórios (tosse). A idade dos pacientes era de três meses e de quatro anos e meio, respectivamente. A amostra do tipo 23F foi isolada no período do outono, de um paciente sem comprovação de vacinação, que não apresentava sintomas respiratórios e com idade de quatro anos.

Um total de 30 amostras de *H. influenzae* e todas as 43 amostras de *S. pneumoniae* foram avaliadas quanto aos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos por metodologia de difusão em ágar.

Os resultados obtidos para *H. influenzae* indicaram que 83,3% (25/30) foram sensíveis a todos os cinco antimicrobianos testados. As taxas de resistência identificadas para essas amostras foram: 16,7% (5/30) para ampicilina; 3,3% para cloranfenicol, cefotaxima e imipenem (1/30 de cada). Todas as cinco amostras resistentes à ampicilina foram produtoras de beta-lactamase. Os dados obtidos com estes testes foram utilizados para a construção de perfis de susceptibilidade (Tabela 5).

O perfil I foi o prevalente e reuniu as amostras sensíveis a todos os antimicrobianos testados, incluindo as amostras não-Hib e a única amostra Hib isolada neste estudo. Esses resultados estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfis de susceptibilidade<sup>1</sup> de 30 amostras de *H. influenzae* e correlação com a produção de beta-lactamase e sorotipagem.

Perfil de Susceptibilidade	Fenótipo	Produção de $\beta$ -lactamase	% de amostras (nº/total)
Hi-I	AMP <sup>S</sup> , CLO <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IPM <sup>S</sup> , RIF <sup>S</sup>	NA	80,0% HiNT (20/25); 100% não-Hib (4/4); 100% Hib (1/1)
Hi-II	AMP <sup>R</sup> , CLO <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IPM <sup>S</sup> , RIF <sup>S</sup>	+	12,0% HiNT (3/25)
Hi-III	AMP <sup>R</sup> , CLO <sup>R</sup> , CTX <sup>S</sup> , IPM <sup>S</sup> , RIF <sup>S</sup>	+	4,0% HiNT (1/25)
Hi-IV	AMP <sup>R</sup> , CLO <sup>S</sup> , CTX <sup>R</sup> , IPM <sup>R</sup> , RIF <sup>S</sup>	+	4,0% HiNT (1/25)

Legendas: testes de difusão em ágar (TDA), AMP, ampicilina; CLO, cloranfenicol; CTX, cefotaxima; IPM, imipenem; RIF, rifampicina. S, sensível; R, resistente. HINT, *H. influenzae* não tipável; não-Hib, *H. influenzae* pertencentes a sorotipos não b (a, c, d, e ou f); Hib, *H. influenzae* tipo b.

Notas: Construídos com os resultados obtidos em testes de difusão em ágar (TDA) nos Antimicrobianos, AMP, CLO, CTX, IPM, RIF, os quais apresentaram –se . S, R.

Fonte: A Autora, 2016.

As amostras de *H. influenzae* que apresentaram resistência aos antimicrobianos (N=5) foram isoladas no período do verão (N=2) e inverno (N=3). Dois destes pacientes

estavam em uso de antimicrobianos (ambos com amoxicilina) no período da coleta do espécime clínico. Na caracterização por espectrometria de massas, os escores obtidos com essas amostras foram 2,328 (perfil IV); 2,147 (perfil III); e 2,186, 2,254 e 2,337 (perfil II). A idade dos pacientes que apresentaram amostras de *H. influenzae* resistentes aos antimicrobianos foi de nove meses (dois pacientes), um ano (um paciente) um ano e seis meses (um paciente) e dois anos e nove meses (um paciente). Destes, quatro (80,0% 4/5) apresentavam sintomas respiratórios (tosse, dificuldade respiratória, conjuntivite e febre associada à dificuldade respiratória) no momento da coleta do material clínico. Além disso, em dois pacientes *H. influenzae* foi a única espécie identificada (dentre as que são alvo deste estudo), em dois outros foi isolada concomitantemente à *M. catarrhalis* e em um paciente foi identificada em associação à *S. pneumoniae*.

Não foram realizados testes de susceptibilidade para as amostras de *M. catarrhalis* em decorrência de dificuldades técnicas. Entretanto, foi avaliada a expressão de beta-lactamase nessas amostras. Os resultados apontaram que dentre 50 amostras de *M. catarrhalis* (pois duas amostras não foram recuperadas do estoque a -80°C), 96,0% (48/50) foram produtoras desta enzima.

Dois pacientes estavam em uso de antimicrobianos durante a coleta do material clínico (cefalexina e cefepime). As duas amostras negativas neste teste, foram isoladas como única espécie alvo e nas coletas de inverno e primavera. Ambos os pacientes estavam apresentando sintomas respiratórios (tosse e rinorreia).

Em relação à espécie *S. pneumoniae*, foram realizados testes de susceptibilidade a cinco antimicrobianos para 40 amostras (dentre as 43 isoladas). Três amostras não foram incluídas nesta etapa, pois não foram recuperadas do estoque a -80°C. Os resultados obtidos por metodologia de difusão em ágar revelaram que as taxas mais elevadas de resistência ocorreram para oxacilina (35,0%;14/40), seguido de eritromicina (30,0%; 12/40). Entretanto, todas as amostras foram sensíveis à levofloxacina (Tabela 6). Dentre as amostras resistentes à oxacilina, duas foram resistentes à optoquina.



As amostras resistentes à eritromicina foram selecionadas para avaliação do fenótipo de resistência aos macrolídeos com a inclusão de discos contendo clindamicina. Os resultados revelaram que das 12 amostras resistentes a eritromicina, 11 (91,7%) expressaram o fenótipo cMLS<sub>B</sub> (resistência constitutiva a ambos os antimicrobianos) e uma (8,3%) o fenótipo M (resistência a eritromicina e susceptibilidade à clindamicina). Nenhuma amostra apresentou fenótipo de resistência induzida à clindamicina (Tabela 6).

Foram identificados nove perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos, que foram nomeados neste estudo de SpI a SpIX. Dentre estes, cinco corresponderam a perfis de multirresistência, definidos como a presença de resistência a três ou mais classes de antimicrobianos no TDA, que agruparam 30,0% (12/40) das amostras avaliadas. Duas amostras que apresentaram resistência à optoquina foram agrupadas em perfis de multirresistência (Tabela 6).

Adicionalmente, foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) para penicilina das amostras que apresentaram resistência à oxacilina no TDA, e, também, para eritromicina. Em ambos os casos a CIM foi determinada pelo emprego do teste E. Os resultados revelaram valores de CIM na faixa de 0,19 µg/mL a 32 µg/mL para penicilina; e de 12 µg/mL a >256 µg/mL para eritromicina (Tabela 6).

Na prática, a definição dos pontos de corte para caracterização da resistência à penicilina em amostras de *S. pneumoniae* é dependente do tipo de infecção (meningite ou outras) e da via de administração do antimicrobiano durante a terapia. Como este estudo avaliou apenas o estado de portador nasofaríngeo, a Figura 9 apresenta a distribuição das amostras *S. pneumoniae* comparando-se os halos de inibição que definiram resistência à oxacilina ( $\leq 20$ mm, obtidos por TDA) e os valores de CIM (determinados por teste E), em relação aos pontos de corte definidos pelo CLSI (2015).

Tabela 6 - Perfis de susceptibilidade e demais características associadas a 40 amostras de *S. pneumoniae* avaliadas neste estudo.

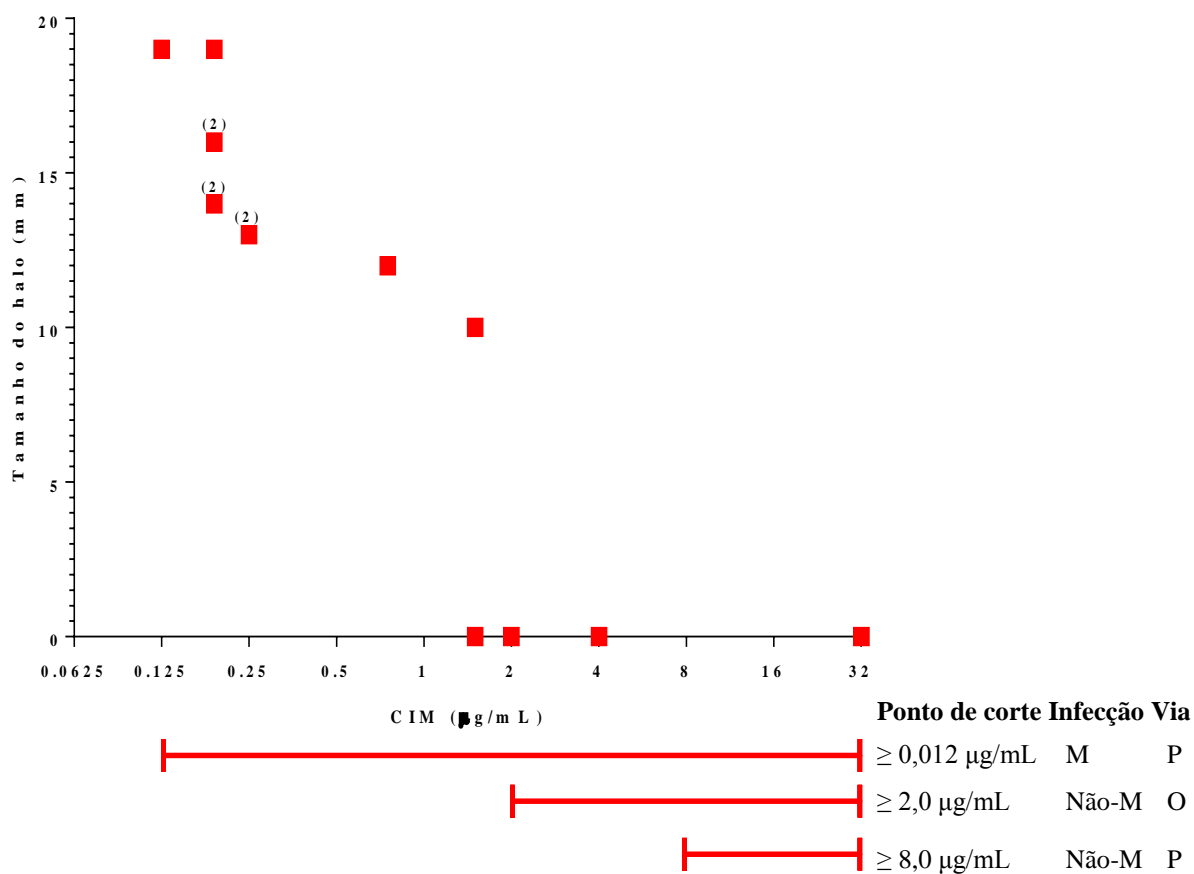
Perfil	Fenótipo	Nº amostras (%)	CIM em µg/mL (Nº de amostras)		MLS <sup>R</sup>	Tipos capsulares (Nº de amostras)	OPTQ Nº amostras (%) N=5
			PEN	ERI			
Sp-I	OXA <sup>S</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>S</sup> , TET <sup>S</sup> , ERI <sup>S</sup> , CLI <sup>S</sup>	20 (50,0%)	NA	NA	NA	NT (19); 6A/B (1)	3 (60,0%)
Sp-II	OXA <sup>S</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>R</sup> , TET <sup>S</sup> , ERI <sup>S</sup> , CLI <sup>S</sup>	6 (15,0%)	NA	NA	NA	6 NT	-
Sp-III	OXA <sup>R</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>S</sup> , TET <sup>S</sup> , ERI <sup>R</sup> , CLI <sup>S</sup>	1 (2,5%)	1,5	12	M	NT	-
Sp-IV*	OXA <sup>R</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>S</sup> , TET <sup>S</sup> , ERI <sup>R</sup> , CLI <sup>R</sup>	2 (5,0%)	0,19 (1); 32 (1)	>256	cMLS <sub>B</sub>	NT	1 (20,0%)
Sp-V*	OXA <sup>R</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>S</sup> , TET <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , CLI <sup>R</sup>	6 (15,0%)	0,19 (4); 0,125 (1); 0,25 (1)	>256	cMLS <sub>B</sub>	6A/B (3); NT (3)	1 (20%)
Sp-VI	OXA <sup>R</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>R</sup> , TET <sup>S</sup> , ERI <sup>S</sup> , CLI <sup>S</sup>	1 (2,5%)	0,25	NA	NA	23F	-
Sp-VII*	OXA <sup>R</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>R</sup> , TET <sup>S</sup> , ERI <sup>R</sup> , CLI <sup>R</sup>	2 (5,0%)	1,5 (1); 4,0 (1)	>256	cMLS <sub>B</sub>	NT	-
Sp-VIII*	OXA <sup>R</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , ERI <sup>S</sup> , CLI <sup>S</sup>	1 (2,5%)	0,75	NA	NA	NT	-
Sp-IX*	OXA <sup>R</sup> , LEV <sup>S</sup> , SXT <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , ERI <sup>R</sup> , CLI <sup>R</sup>	1 (2,5%)	2,0	32	cMLS <sub>B</sub>	NT	-

Legenda: S, Sensível; R, Resistente. Antimicrobianos: OXA, oxacilina; LEV, levofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; TET, tetraciclina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; PEN, penicilina. CIM, concentração inibitória mínima. MLS<sup>R</sup>, fenótipos de resistência a macrolídeos, lincosaminas e streptograminas: M, resistência a eritromicina/susceptibilidade à clindamicina; cMLS<sub>B</sub>, resistência constitutiva à eritromicina e clindamicina. NT, não tipável. OPTQ, teste de susceptibilidade à optoquina. NA, não aplicável; -, nenhuma amostra. Os asteriscos indicam os perfis de multirresistência (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos no teste de difusão em ágar).

Fonte: A Autora, 2016.

Os resultados demonstraram que todas as 14 amostras (35,0%; 14/40), que apresentaram resistência a oxacilina, foram consideradas resistentes à penicilina, considerando-se o ponto de corte para casos de meningite e antibioticoterapia parenteral. Por outro lado, considerando-se os pontos de corte para outros quadros clínicos (excetuando-se meningite), foram consideradas resistentes à penicilina: três amostras (7,5%; 3/40) no caso de antibioticoterapia oral; ou apenas uma amostra (2,5%; 1/40) em situações de administração do antimicrobiano por via parenteral.

Figura 9- Correlação entre os halos de inibição para oxacilina ,em amostras consideradas resistentes por metodologia e difusão em ágar e os valores de concentração inibitória mínima (CIM),que foram obtidos por teste E.

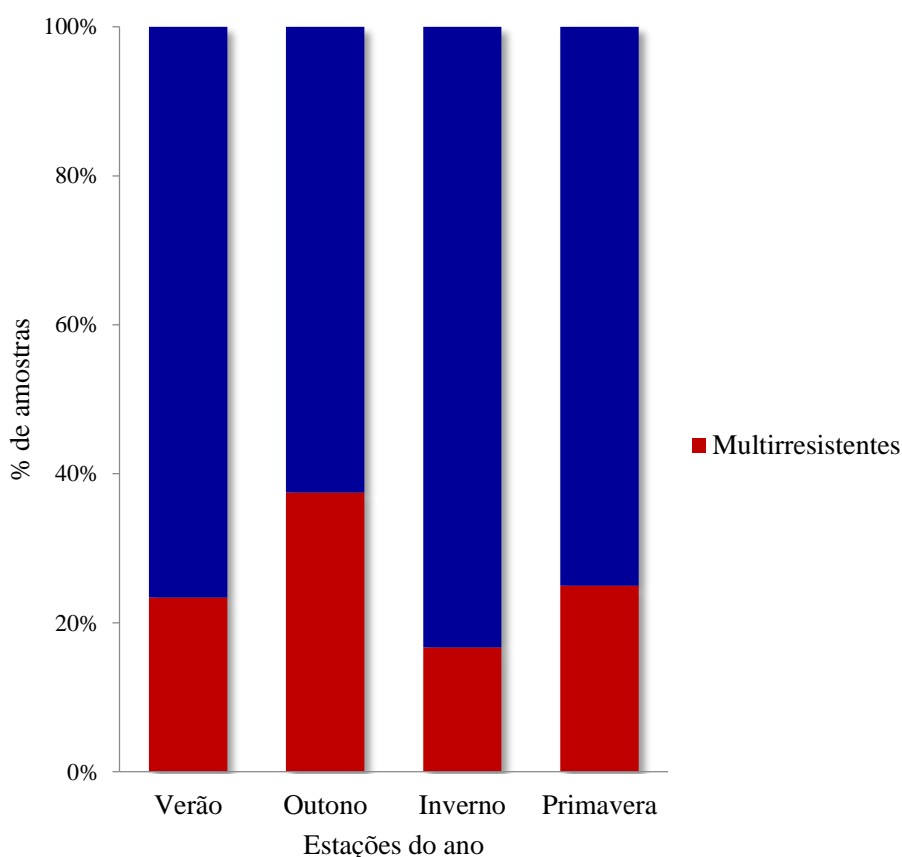


Legenda: M, meningite; Não- M, outros quadros clínicos excetuando-se meningite; P, via parenteral; O, via oral; (2) duas amostras nesta categoria.

Fonte: A Autora, 2016.

Os resultados baseados nos testes TDA também demonstraram que foi observado um percentual ligeiramente mais elevado na frequência de amostras multirresistentes no período do outono (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição das amostras de *S. pneumoniae* multirresistentes em relação à estação do ano.



Fonte: A Autora, 2016.

A análise do agrupamento (*cluster analysis*) das amostras incluídas neste estudo foi realizada pelo emprego de algoritmos matemáticos específicos, utilizando-se o software BioNumerics e os espectros obtidos por MALDI-TOF.

Os graus de similaridade foram determinados pelo emprego do coeficiente linear de Pearson e os arranjos definidos por *Neighbor Joining* para construção de árvores de similaridade. Foi considerado um mesmo grupo ou *cluster* os arranjos de no mínimo duas amostras partindo de uma origem comum em um ramo principal da árvore.

As amostras de *H. influenzae* foram reunidas em seis grupos e um perfil único (apenas uma amostra isolada). Os agrupamentos obtidos com as amostras de *H. influenzae* foram nomeados neste estudo de Hi-A a Hi-F e o perfil único. O grupo prevalente reuniu 14 amostras e os demais com duas a três amostras. Não foi observada uma correlação entre a distribuição obtida por análise de *clusters* e características fenotípicas observadas nessas amostras, como por exemplo, sorotipos, resistência aos antimicrobianos ou produção de beta-lactamase.

Entre as amostras de *M. catarrhalis* foram identificados cinco grupos, nomeados de Mc-A a Mc-E, e três perfis únicos. O prevalente reuniu 18 amostras e apresenta diversas ramificações, sugerindo a separação em subgrupos. As duas amostras que não expressaram beta-lactamase foram alocadas em grupos distintos (Mc-C e Mc-B).

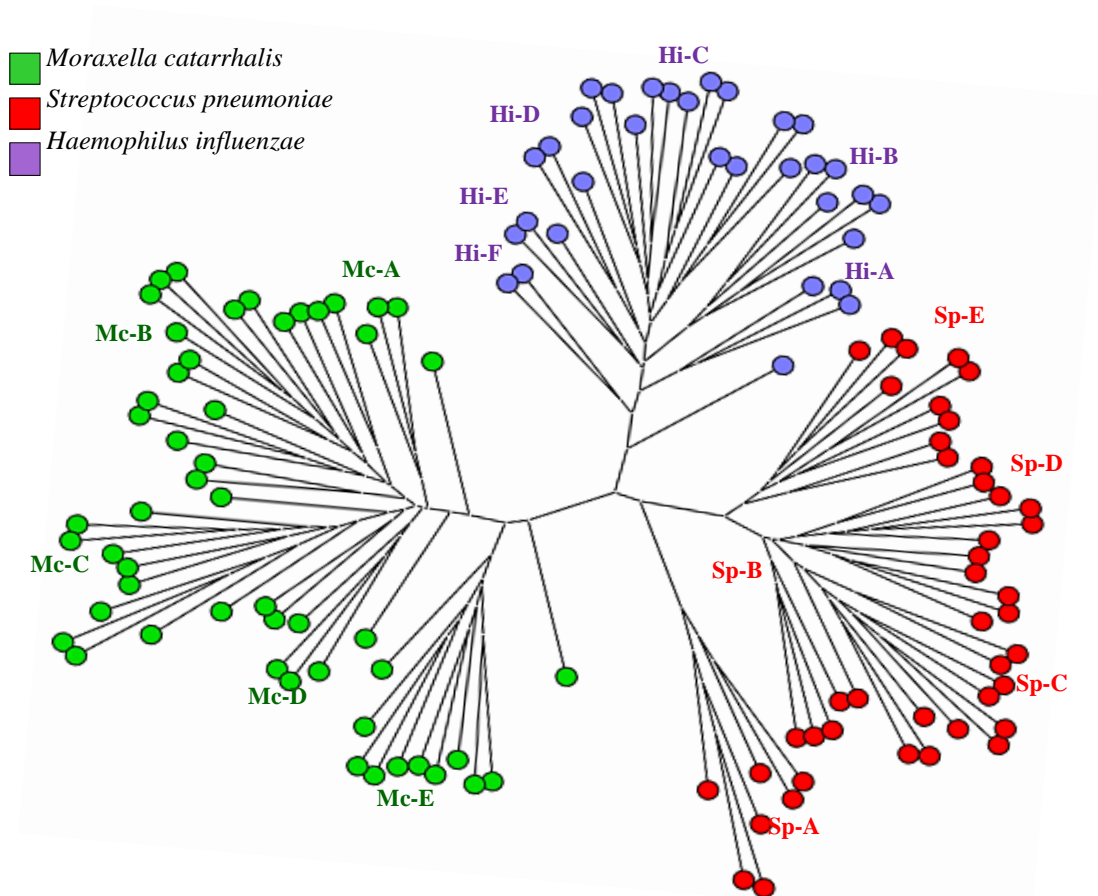
Com relação às amostras de *S. pneumoniae*, foram identificados cinco agrupamentos, nomeados Sp-A a Sp-E. No grupo Sp-A foram alocadas sete amostras; sendo duas pertencentes aos tipos 6A/B e três multirresistentes, incluindo a resistência à oxacilina e eritromicina (todas MLS<sub>B</sub>).

O grupo Sp-B reuniu cinco amostras, sendo três resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol e uma a oxacilina e a tetraciclina. Os grupos Sp-C e Sp-D reuniram 11 amostras cada. No primeiro, todas foram NT; enquanto que, no segundo duas amostras foram 6A/B e uma 23F.

Em Sp-C, três amostras foram resistentes a oxacilina e exibiram fenótipo MLS<sub>B</sub>. Já em Sp-D quatro amostras foram resistentes a oxacilina e três a eritromicina (MLS<sub>B</sub>). Todas as amostras em Sp-E foram não tipáveis; quatro foram resistentes à oxacilina e a eritromicina (sendo três MLS<sub>B</sub> e uma M).

A Figura 11 mostra o arranjo formado por MALDI-TOF, construído pelo software BioNumerics, com o emprego de algoritmos específicos (correlação linear de Pearson e *Neighbor Joining*).

Figura 11 - Agrupamento por similaridade<sup>1</sup> resultante do arranjo gerado pelos espectros obtidos por metodologia de MALDI-TOF de amostras de *H. influenzae*, *catarrhalis* e *S. pneumoniae*.



Fonte: Adaptada da Análise realizada com auxílio do software BioNumerics (Applied Math) pelo emprego da correlação linear de Pearson e agrupamento realizado por *Neighbor Joining*

## 4 DISCUSSÃO

A colonização da nasofaringe é uma importante etapa para o desenvolvimento de infecções do trato respiratório. Microrganismos da espécie *S. pneumoniae* tem sido responsabilizados por aproximadamente 14,5 milhões de casos de quadros infecciosos respiratórios graves, com mais de 800 mil óbitos anualmente, entre crianças menores que seis anos em todo o mundo (O'BRIEN *et al.*, 2009; WHO, 2015). Além disso, estes microrganismos compartilham o nicho nasofaríngeo com membros das espécies *H. influenzae* e *M. catarrhalis*, que se destacam, particularmente, como importantes agentes responsáveis pela exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (MACKENZIE *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, importantes alterações epidemiológicas estão sendo observadas em relação à colonização da nasofaringe por essas espécies, bem como a sua ocorrência nas infecções do trato respiratório. Tais alterações têm sido resultado tanto da emergência da resistência aos antimicrobianos, quanto da introdução da vacinação anti-*S. pneumoniae* e anti-Hib. Os efeitos benéficos da vacinação, com a redução do número dos casos de infecções graves, ainda mais evidentes com a introdução das vacinas conjugadas anti-pneumococos, têm sido ameaçados face às alterações na prevalência dos tipos capsulares, que passaram a não ser contemplados pelas vacinas disponíveis (KELLNER *et al.*, 2009; SIMELL *et al.*, 2012).

A redução nas taxas de colonização e de infecção por amostras pertencentes aos tipos capsulares de *S. pneumoniae* presentes nas formulações vacinais, como também de amostras Hib, tem sido acompanhada pelo aumento da frequência de tipos pneumocócicos não vacinais, de HiNT e de *M. catarrhalis*; como também de *Staphylococcus aureus* e *Neisseria meningitidis* (VERDUIN *et al.*, 2002; WERTHEIM *et al.*, 2005; CHRISTENSEN *et al.*, 2010; AGRAWAL *et al.*, 2011; PEREZ *et al.*, 2014). Assim, considera-se que a introdução da vacinação teve como resultado a criação de nichos ecológicos que favoreceram a implantação de tipos não vacinais e de outros patógenos. Também, a vacinação anti-pneumocócica alterou a epidemiologia das otites médias em crianças. A prevalência de *S. pneumoniae* nesses quadros clínicos tem sido suplantada pela ocorrência cada vez maior de casos associados à HiNT (CASEY *et al.*, 2010; WIERTSEMA *et al.*, 2011; PLOSKER *et al.*, 2014).

No presente estudo avaliamos a ocorrência de amostras das espécies *H.*

*influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* em colonização nasofaríngea de 204 crianças, com idade de até seis anos incompletos, atendidas no ambulatório ou hospitalizadas no Hospital Pedro Ernesto da UERJ. A maioria da população avaliada (87,7%) estava em dia com o calendário nacional de vacinação estabelecido pelo Ministério da Saúde. Foram realizadas oito coletas de secreção de nasofaringe distribuídas pelos meses de fevereiro, março, abril, julho, agosto e outubro de 2015, contemplando as diferentes estações do ano.

Dentre as 204 culturas avaliadas, 44 foram negativas. A aplicação de análise estatística considerou significativa a associação entre cultura negativa e algumas variáveis avaliadas como: origem do paciente (hospitalizado), período de coleta (primavera), presença de doenças de base e uso de antimicrobianos. Neste estudo, cultura negativa foi definida pela ausência de crescimento de microrganismos aeróbios ou facultativos em até 48h de incubação em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e em meio ágar sangue e ágar chocolate suplementado (com hemina e NAD).

De maneira geral, consideramos importante ressaltar a redução do número de microrganismos na nasofaringe da população pediátrica avaliada, associada à coleta realizada na primavera. Mesmo sabendo-se que as variações de temperatura em nosso país são extremamente mais brandas do que em países de clima temperado, nossos dados foram semelhantes aos já observados em outros estudos realizados em países do hemisfério norte (HARRISON *et al.*, 1999; CHO & BLASER, 2012; NUMMINEN *et al.*, 2015). De qualquer forma, o maior número de infecções respiratórias em nosso meio, também, permanece mais relacionado às estações de inverno e outono, resultando em uma maior prevalência de microrganismos residentes e patogênicos nesses sítios durante esses períodos.

BOGAERT e colaboradores (2011) avaliando o microbioma de nasofaringe de crianças de até dois anos, identificou uma variação qualitativa e quantitativa durante coletas realizadas nos meses de inverno e outono, em relação à primavera. Segundo os autores, nos meses de primavera, a prevalência foi de membros dos gêneros *Flavobacterium*, *Bacteroides* e de outros anaeróbios; além de *Bacillus*. Os autores concluíram que foi observada uma considerável variação sazonal na microbiota da nasofaringe e apenas um pequeno e limitado core microbioma foi obtido durante todo o período de análise. Os mesmos autores justificaram que os gêneros bacterianos mais frequentes nos meses de primavera estão mais relacionados à manutenção do equilíbrio da microbiota local, como em outras superfícies mucosas (trato gastrintestinal e



genitourinário). Por outro lado, o impacto da maior frequência de infecções virais e o uso de antimicrobianos pode contribuir para uma maior diversidade nos períodos de inverno e outono (SEVILLANO *et al.*, 2008). Este último corrobora os nossos achados quanto à significância entre um maior número de culturas positivas e as variáveis relacionadas ao uso de antimicrobianos e a presença de sintomas respiratórios.

As amostras bacterianas foram caracterizadas por espectrometria de massas MALDI-TOF e por testes fisiológicos convencionais. Avaliações por MALDI-TOF têm sido empregadas nos laboratórios de Microbiologia, como uma metodologia para a identificação rápida de microrganismos. Consistem num sistema no qual material biológico é depositado sobre uma placa de metal, recoberto com uma matriz polimérica e irradiado com um feixe de laser, resultando na ionização de várias moléculas. Estas são aspiradas num tubo de vácuo até um detector, que, conforme suas características e o tempo de chegada ao detector (TOF, *time of flight*) geram espectros diferentes. Tais espectros são espécie-específicos e imediatamente comparados com um banco de dados disponível em um software, que interpreta e fornece o resultado (BENAGLI *et al.*, 2011; SINGHAL *et al.*, 2015). Entretanto, os dados obtidos neste estudo apresentaram pouca correlação entre essa metodologia, considerando-se os padrões determinados pelo equipamento utilizado, e os resultados obtidos com testes fisiológicos convencionais. Os escores obtidos para a maioria das amostras de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* foram abaixo do valor considerado para uma classificação segura em nível gênero e espécie (escore  $\geq 2,3$ ).

Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo de LÓPEZ-FABAL *et al.* (2015) avaliando amostras clínicas de *H. influenzae* (64 amostras), *M. catarrhalis* (44 amostras) e *S. pneumoniae* (43 amostras). Os autores compararam os resultados obtidos por MALDI-TOF com testes fisiológicos convencionais e relataram uma concordância de 75%, 100% e 86% para estas espécies, respectivamente.

ZHU e colaboradores (2013) avaliaram a caracterização de amostras de *H. influenzae* e *H. haemolyticus* por MALDI-TOF, em comparação com resultados obtidos por sequenciamento dos genes que codificam para o RNA 16S (*rrs*) e para a recombinase A (*recA*). Os autores indicaram que apenas 23,1% (12/52) das amostras de *H. influenzae* e nenhuma (0/20) de *H. haemolyticus* foram caracterizadas em gênero e espécie por esta metodologia.

Em relação a *S. pneumoniae*, KÄRPÄNOJA e colaboradores (2014) relataram um elevado potencial de caracterização das amostras por MALDI-TOF (94%; 51/54

amostras). Entretanto, os autores relataram que no mesmo estudo a partir de um grupo de 97 amostras de estreptococos viridans isolados de casos de bacteremia, 36 foram erroneamente caracterizadas como pertencentes a essa espécie.

Assim, consideramos imperiosa a necessidade da contínua alimentação do banco de dados original do equipamento, com representantes obtidos de uma coleção maior de amostras para que possa atender, particularmente, a diversidade intraespecífica como observada em nosso estudo e já apontada em estudos anteriores. Entretanto, em relação ao MALDI-TOF consideramos inegáveis tanto a praticidade, rapidez e a boa relação custo benefício, quanto seu potencial na caracterização de diferentes patógenos, desde que, de forma criteriosa, representantes de variações dentro de uma mesma espécie possam vir a fazer parte do banco de dados do equipamento.

Conjugando-se os dados obtidos por MALDI-TOF e a caracterização suplementar por metodologia convencional, foi evidenciado que dos 204 pacientes avaliados, 82 estavam colonizados com uma ou mais das espécies que compuseram este estudo. Assim a taxa de colonização geral foi de 54,8%; sendo 15,7% para *H. influenzae*, 25,5% *M. catarrhalis* e 21,1% *S. pneumoniae*. A taxa de colonização onde foi identificada a presença concomitante de mais de uma espécie foi de 45,1%. A combinação prevalente foi *M. catarrhalis* associado a *S. pneumoniae*(13,4%). Enquanto que, a frequência mais expressiva de colonização por apenas uma das espécies em estudo foi de 29,3% para *M. catarrhalis*. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que registram frequências de 30% a 60% (PFALLER *et al.*, 2001; ZEMLINCKOVÁ *et al.*, 2006; TSAI *et al.*, 2015).

Estudos anteriores traçaram essas variações considerando que a associação entre as principais espécies mais comuns na microbiota permanente e/ou transitória de nasofaringe exibem aspectos peculiares que influenciam no desenvolvimento das doenças respiratórias. Sabe-se que diversos fatores, influenciam o perfil microbiano em um dado sítio anatômico, como por exemplo, a mucosa de nasofaringe, são eles: variações climáticas, idade, sexo, ambientes de confinamento (como creches, escolas e asilos), aleitamento materno e tabagismo no domicílio (PEREZ *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2012; XU & PICHICHERO, 2013).

Dentre as 43 amostras de *S. pneumoniae* isoladas neste estudo, foi observada uma atipia fenotípica que tem sido relatada em alguns estudos como uma característica emergente nesses microrganismos, que é a resistência à optoquina. Como já mencionado anteriormente, o teste de susceptibilidade optoquina é rotineiramente

aplicado ao diagnóstico de amostras de pneumococos em laboratórios clínicos. O teste de susceptibilidade à optoquina é considerado importante na diferenciação da espécie *S. pneumoniae* dos demais estreptococos viridans, sendo muitas vezes empregado como único para o diagnóstico de rotina. A emergência de amostras resistentes, embora ainda em frequência baixa, pode estar acarretando em erros diagnósticos significativos. A resistência à optoquina é decorrente de mutações pontuais nos genes *atpC* ou *atpA* que codificam para subunidades de uma ATPase alvo deste antimicrobiano. Estudos anteriores têm relatado uma frequência que variou de 0,3% a 3,2% de amostras de pneumococos resistentes à optoquina (AGUIAR *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007; CORTES *et al.*, 2008; NAGATA *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2013; IKRYANNIKOVA *et al.*, 2015). Em nosso estudo, este valor foi consideravelmente mais alto (11,6%). Para essas amostras existe a necessidade da caracterização do tipo de mutação e sua localização na sequência dos genes alvo. Portanto, estas etapas certamente farão parte da continuação destes estudos.

A distribuição das amostras de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* na população pediátrica avaliada, em relação à idade dos pacientes, indicou padrões variáveis de frequência. Para *H. influenzae* foi observado um aumento progressivo da frequência de isolamento até a idade de dois anos (excetuando-se a faixa etária entre maior que dois meses de idade e igual ou menor que quatro meses de idade), quando foi observada uma queda da frequência. A maioria das amostras de *H. influenzae* isoladas neste estudo foi não capsulada, portanto HiNT. As cinco amostras capsuladas, identificadas foram isoladas de crianças em diferentes faixas etárias e vacinadas. Apenas uma delas foi caracterizada como Hib. Estudos anteriores realizados no Brasil (SILVA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2011; ZANELLA *et al.*, 2015) indicaram taxas de isolamento de amostras Hib que variaram de 0,7% a 1,5%, estando de acordo com os nossos resultados (apenas 1 amostra). Já foi demonstrado (JESUS *et al.*, 2010) que a ocorrência de casos de pacientes portadores de Hib ou de não-Hib é devido a vacinação incompleta (o que não parece ter sido o caso em nosso estudo) ou a uma baixa resposta à vacina, normalmente determinada por fatores relacionados aos paciente ou baixa resposta imune.

Por outro lado, estudos anteriores indicaram que a colonização por *H. influenzae* determina um aumento contínuo em sua frequência de isolamento até a idade adulta (PELTOLA *et al.*, 2000; KELLY *et al.*, 2004; BROOK *et al.*, 2008). Em um estudo recente KRESS BENNET *et al.* (2016) demonstraram que 20% dos bebês são

colonizados no primeiro ano de vida e isso aumenta progressivamente ao longo do tempo, chegando a uma frequência de 50% das crianças com idade entre cinco e seis anos e atingindo uma taxa de colonização de 75% dos indivíduos adultos. Entretanto, em nosso estudo, observamos uma redução nas taxas de isolamento a partir de dois anos de idade. Pode-se admitir que seja um reflexo imediato do período pós-vacinal. Entretanto, apenas uma avaliação com um número maior de pacientes e em uma faixa de idade mais ampla poderia ser suficiente para definir mais precisamente tal situação.

O aumento da frequência de isolamento de amostras HiNT em populações pediátricas vacinadas tem sido uma preocupação frequente. Aparentemente, a vacinação contra Hib favoreceu a emergência de cepas HiNT e não-Hib (DWORKING *et al.*, 2007; LIESE *et al.*, 2009; VESSIKARI *et al.*, 2009; JACUPS *et al.*, 2011). Dentre as amostras de *H. influenzae*, as não tipáveis HiNT são predominantes nas infecções do trato respiratório. Essas amostras expressam mecanismos que as permite evadir do sistema imune e causar infecções invasivas, tendo importância destacada nas exacerbações da doença obstrutiva pulmonar crônica (PETTIGREW *et al.*, 2008).

Com relação à frequência de *M. catarrhalis* em relação à idade dos pacientes, foi observado um aumento considerável na taxa de isolamento desta espécie bacteriana entre as crianças na faixa etária de seis meses a dois anos. Sabendo-se que esta faixa etária relaciona-se ao período imediatamente seguinte ao término do protocolo vacinal para *S. pneumoniae*, consideramos a hipótese de que estes eventos estejam relacionados. De fato, observamos uma redução na frequência de isolamento de *S. pneumoniae* neste período. Estudos anteriores já apontaram mudanças nos padrões de epidemiologia das infecções respiratórias, devido a utilização da vacinação conjugada para prevenção de *S. pneumoniae*, como mencionado anteriormente, resultando na acentuada redução do isolamento de amostras apresentando os tipos presentes nas formulações vacinais, bem como no favorecimento da colonização por *M. catarrhalis* (SPIJKERMAN *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012; PEREZ *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2016). O aumento da sua frequência em nasofaringe tem favorecido a emergência de casos de infecção, principalmente otite média, em crianças menores de três anos (MURPHY & PARAMESWARAN, 2009; ARYA *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, as taxas de isolamento de *S. pneumoniae* foram mais elevadas nos pacientes na faixa etária maior que quatro meses e menor ou igual a seis meses e na de maiores que dois anos de idade. Os resultados obtidos neste estudo apontaram taxas de isolamento de *S. pneumoniae* comparáveis ou relativamente menores do que já foi

divulgado por outros autores. Para exemplificar este fato, pode-se destacar os estudos realizados nos Estados Unidos (CARVALHO *et al.*, 2010), Polônia (KORONA-GLOWNIAK & MALM, 2012) e Marrocos (BOUSKRAOUI *et al.*, 2011), que identificaram frequências de 29%, 44% e 46%, respectivamente, de portadores dessas espécies em nasofaringe. Um estudo recente, conduzido no estado do Rio de Janeiro, divulgou uma taxa de colonização por *S. pneumoniae* em criança (58,3%, RODRIGUES *et al.*, 2014), que se mostrou bem superior a encontrada neste estudo. Este fato pode ter sido relacionado a diversos fatores como, por exemplo, um número menor de pacientes do que o divulgado nos demais estudos e diferenças do agrupamento das faixas etárias selecionadas para estudo.

Ressalta-se que a maioria dos pacientes avaliados neste estudo foram vacinados com a PCV10. O tipo capsular das amostras de *S. pneumoniae* foi avaliado por metodologia de PCR com um conjunto de iniciadores específicos para a detecção daqueles pertencentes à formulação de PCV10. Assim, de 40 amostras avaliadas apenas cinco foram tipadas por essa metodologia. Dentre estas, quatro pertenciam ao tipo 6A/B e uma a 23F e dois desses pacientes não apresentaram cartão de vacinação (um portador de uma amostra 6A/B e o outro de 23F). Todas as demais amostras certamente pertencem a tipos não incluídos na vacina recomendada no calendário brasileiro. Estudos complementares serão empregados para definição dos tipos capsulares de todas as amostras não tipadas neste estudo.

Entretanto, considerando-se a população comprovadamente vacinada (N=179) com a PCV10 e a taxa de isolamento de tipos de *S. pneumoniae* incluídos na vacina (N=3), pode-se estimar uma excelente cobertura vacinal (98,1%). Porém, a frequência de amostras que possivelmente pertencem a tipos não contemplados por nessa vacina é preocupante. Como já relatado em outros estudos, a pressão exercida pela vacinação anti-pneumocócica tem levado a crescente emergência de tipos não vacinais, que albergam muitas vezes amostras multirresistentes e que aumentado consideravelmente o número de casos de doenças invasivas (TAN, 2012; IROH *et al.*, 2014; NAVARRO TORNÉ *et al.*, 2014; PORAT *et al.*, 2016; WAGENVOORT *et al.*, 2016). Sendo assim, o monitoramento sistemático dessas amostras em nosso meio torna-se fundamental ao acompanhamento da distribuição desses microrganismos na população, tanto pediátrica quanto de idosos, a fim de avaliar novas estratégias de prevenção.

A frequência dessas espécies em relação às estações do ano também foi investigada. Contrariando o esperado, taxas elevadas de isolamento para três espécies

avaliadas ocorreram nas coletas relativas ao verão. Para *M. catarrhalis* um considerável aumento na frequência de isolamento também foi percebido na coleta correspondente a primavera. Por outro lado, para *S. pneumoniae* as menores taxas de isolamento estiveram relacionadas ao inverno. Da mesma forma que já mencionado anteriormente, consideramos a hipótese de que o aumento do número de casos respiratórios, particularmente virais, e o uso de agentes antimicrobianos nos períodos mais frios terminam por reduzir a permanência de patógenos na nasofaringe. Por outro lado, para *M. catarrhalis*, observamos um comportamento inversamente proporcional ao apresentado por *H. influenzae* e *S. pneumoniae*. Nesse caso, o aumento da frequência do isolamento foi detectado no inverno, com valores significativamente maiores na primavera. Consideramos como hipótese o fato de que *M. catarrhalis* ocupe o nicho nasofaríngeo nos períodos de redução das demais espécies, determinando um maior equilíbrio local (SEVILLANO *et al.*, 2008; CHO & BLASER, 2012; NUMMINEN *et al.*, 2015).

As amostras de *H. influenzae* e de *S. pneumoniae* foram avaliadas quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos por testes de difusão em ágar (TDA) e pela determinação da concentração inibitória mínima por teste E, neste último caso para alguns antimicrobianos em particular.

Para *H. influenzae*, foram construídos quatro perfis de susceptibilidade de acordo com os resultados obtidos em TDA. O perfil Hi-I foi o prevalente (83,3%; 25/30) e reuniu as amostras sensíveis a todos os todos os cinco antimicrobianos testados. As amostras de Hib e de não-Hib (tipáveis) foram reunidas neste perfil. Entretanto, foram identificadas cinco amostras resistentes à ampicilina, que foram distribuídas nos demais perfis de susceptibilidade. Todas as amostras resistentes à ampicilina foram produtoras da enzima beta-lactamase. Também, além de albergar resistência à ampicilina, uma amostra foi resistente ao cloranfenicol; e outra foi resistente à cefotaxima e ao imipenem. Assim, todas as amostras portadoras de características de resistência foram não capsuladas, HiNT. Considerando-se que, as amostras HiNT têm se destacado como agentes de infecções invasivas, a emergência de resistência aos antimicrobianos nessas amostras se soma às preocupações decorrentes da atual supremacia dessas amostras frente a redução na frequência Hib na era pós-vacinal.

Considerando-se as amostras de *S. pneumoniae* destacamos os achados relativos à resistência à oxacilina e a eritromicina. Por outro lado, todas as amostras foram sensíveis a levofloxacina. Esses dados estão de acordo com outro estudo desenvolvido em nosso estado, na cidade de Niterói, que detectou perfis de susceptibilidade

semelhantes (NEVES *et al.*, 2013).

Da mesma forma, a maioria dos dados mundiais, divulgados nos últimos anos apresentam resultados semelhantes, com algumas poucas exceções onde reconhecidamente as taxas de resistência aos antimicrobianos, particularmente oxacilina, entre amostras de pneumococos e bastante elevada. Cabe ressaltar que os dados mundiais apontam de forma unânime o aumento progressivo das taxas de resistência aos antimicrobianos entre amostras de *S. pneumoniae*. Um estudo desenvolvido no Paquistão, acompanhando amostras isoladas no período de 2002 a 2009, divulgou que as taxas de resistência para penicilina e macrolídeos aumentaram de 10% para 34,1% e de 13% para 29,7%, respectivamente (ZAFAR *et al.*, 2016). Da mesma forma NUNES e colaboradores (2016) identificaram um aumento de cerca de 10% nas taxas de resistência à penicilina e eritromicina em um período de apenas um ano (de 2009 a 2010) em amostras isoladas em Portugal.

Associando-se os resultados de resistência aos antimicrobianos com os de tipagem capsular de *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, que demonstraram um percentual elevado de amostras, que não são atingidas pelos atuais esquemas de prevenção, como colonizadores da nasofaringe de crianças. Chamamos atenção para a possibilidade de que em um futuro próximo essas amostras passem a ser preponderantes no cenário das infecções respiratórias bacterianas, acarretando graves riscos à população por acumularem determinantes de resistência aos antimicrobianos em patógenos ainda não preveníveis, que atingem primariamente a população pediátrica, além de idosos.

Os dados obtidos com as análises de agrupamento por MALDI-TOF, em geral não indicaram uma relação com as características fenotípicas observadas entre as amostras. Entretanto, faz-se necessário a aplicação de métodos moleculares na continuidade desse estudo, que determine a significância dos dados obtidos. Porém, o agrupamento de amostras bacterianas realizados por essa metodologia já tem sido utilizado como uma ferramenta moderna e de custo mais acessível às análises de diversidade bacteriana (MÜELLER *et al.*, 2013; TAGG *et al.*, 2015).

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram significativos percentuais de colonização nasofaríngea em crianças atendidas em ambulatório e hospitalizadas em um hospital universitário do Rio de Janeiro.

As taxas mais elevadas de colonização estiveram relacionadas à espécie *M. catarrhalis*. Entretanto, percentuais elevados de *H. influenzae* não capsulado e de *S. pneumoniae* apresentando tipos capsulares não pertencentes à formulação vacinal utilizada no Brasil, se traduz de forma preocupante, considerando-se a gravidade das infecções que são atribuídas aos microrganismos pertencentes a essas espécies.

Mais de 10% das amostras de *S. pneumoniae* foram resistentes à optoquina. Considerando-se que este costuma ser o principal teste diferencial utilizado na maioria dos laboratórios de rotina para a caracterização destes microrganismos, concluímos que tais amostras possam estar sendo subnotificadas, o que pode vir a comprometer o diagnóstico e tratamento das infecções.

Apesar da pequena variação climática considerada para as estações do ano no Rio de Janeiro, foram observadas diferenças significativas na frequência dessas espécies nos diferentes períodos de coleta do espécime clínico. Assim, os resultados deste estudo sugeriram que nos meses de inverno e outono, provavelmente relacionados a um maior número de infecções virais e uso de antimicrobianos, a frequência das espécies *S. pneumoniae* e *H. influenzae* sofra uma redução. Em sequência, durante a primavera, observou-se a maior taxa de isolamento de *M. catarrhalis* possivelmente associada à restauração da microbiota nasofaríngea permanente.

A colonização da população pediátrica, por amostras albergando tipos capsulares não contemplados nas formulações vacinais utilizadas na prevenção das infecções causadas por esses microrganismos, é ainda mais preocupante considerando-se a frequência de amostras resistentes ou multirresistentes aos antimicrobianos, particularmente aos de escolha terapêutica. Em nosso estudo destacamos a resistência a ampicilina, associada à produção de beta-lactamase, entre amostras de *H. influenzae* não capsulados (HiNT) e a resistência a oxacilina e eritromicina entre *S. pneumoniae*. Além disso, mais de 90% das amostras de *M. catarrhalis* eram produtoras de beta-lactamases. Esta característica já foi relatada como um dos fatores que, durante situações de co-colonização, facilitam de maneira indireta a presença de amostras de *H. influenzae* ou *S.*



*pneumoniae* sensíveis aos beta-lactâmicos determinando uma relação sinérgica e facilitando a invasão e desenvolvimento de infecções graves por essas amostras.

Assim, considera-se fundamental o acompanhamento sistemático dessas espécies, sendo necessária uma investigação contínua das alterações decorrentes do uso de vacinas que compõe o Programa Nacional de Imunização – PNI utilizado no Brasil, juntamente com os registros de dados nacionais, relacionados à epidemiologia e as características gerais destes microrganismos, tanto nas infecções quanto no quadro de portadores. Consideramos que este estudo contribuiu com dados nacionais, particularmente de nosso estado, que possam vir a contribuir para o entendimento da circulação desses importantes patógenos respiratórios na população pediátrica.

## REFERÊNCIAS

- ABUHAMMOUR, W. M., et. al. *Moraxella catarrhalis* bacteremia: a 10-year experience. *South Med. J.* v. 92, p. 1071-1074. 1999.
- ADA, G., ISAACS, D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin. Microbiol. Infect.* v. 9, p.79-85. 2003.
- ADAMS, W. G., et. al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA*, v. 269, n. 2, p. 221-226. 1993.
- ADEGBOLA, R.A., et. al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. *Plos One.* v. 1, n. 9 (8). Aug. 2004.
- AEBI, C., et. al. Expression of the CopB outer membrane protein by *Moraxellacatarrhalis* is regulated by iron and affects iron acquisition from transferrin and lactoferrin . *Infect. Immun.* v. 64, n. 6, p. 2024–2030. 1996.
- AGRAWAL, A.; MURPHY, T. F. *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. *J. Clin. Microbiol.* v. 49, p. 3728–3732. 2011.
- AHMED, A., et. al. Clinical and laboratory aspects of *Moraxellacatarrhalis* bacteremia in children . *Pediatr. Infect. Dis. J.* v.27, p.459–461. 2008.
- AKIMANA, C.; LAFONTAINE, E. R. The *Moraxellacatarrhalis* outer membrane protein CD contains two distinct domains specifying adherence to human lung cells. *FEMS. Microbiol. Lett.* v. 271, p.12–19. 2007.
- ANDRADEA, D. C., et. al. Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccine on the Natural Antibodies and Antibody Responses Against Protein Antigens from *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Children with Community-Acquired Pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis J.* 2016.
- AYDEMIR, Y., et. al. Multiplex PCR to determine the bacteria and viral aetiology of pneumonia in school-age children. *Pediatric Int Child Health.* n. 9, p.1- 62. Jan. 2016.
- BAGNOLI, F., et. al. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J. Bacteriol.* v. 190, p. 5480–5492. 2008.
- BARROSO, D. E. et. al.  $\beta$ -Lactam resistance, serotype distribution, and genotypes of meningitis-causing *Streptococcus pneumoniae*, Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v.31, p. 30-36. 2012.
- BERMAN, S. et. al. Acute respiratory infections. *Infect. Dis Clin.* v. 5, n.2, p. 319-336. Jun. 1991.

- BERNHARD, S.; SPANIOL, V.; AEBI, C. Molecular pathogenesis of infections caused by *Moraxellacatarrhalis* in children. *Swiss Med Wkly*. v. 142, w.13694. 2012.
- BOGAERT, D. G. R.; HERMANS, P. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 4, p. 144-154. 2004.
- BOGAERT, D., et. al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS One*. n. 28, n. 6(2):e17035. Fev. 2011.
- BOOTSMA, H. J., et. al. Analysis of *Moraxellacatarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct sub-population associated with virulence traits. *J. Infect. Dis.* v. 181, p. 1376-1387. 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SUS. 2010 Oferece duas novas vacinas para seis milhões de crianças. <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/40>>. Acesso em: 05 jan 2014.
- BROIDES, A., et. al. Acute otitis media caused by *Moraxellacatarrhalis*: epidemiologic and clinical characteristics. *Clin. Infect. Dis.* v. 49, p. 1641–1647. 2009.
- BROOK, I.; FOOTE, P. A.; HAUSFELD, J. N. Frequency of recovery of pathogens causing acute maxillary sinusitis in adults before and after introduction of vaccination of children with the 7-valent pneumococcal vaccine. *J. Med. Microbiol.* v. 55, p. 943–946. 2006.
- BROOKS, M. J., et. al. Modular arrangement of allelic variants explains the divergence in *Moraxellacatarrhalis* UspA protein function. *Infect. Immun.* v.76, p. 5330–5340. 2008.
- BRYSKIER, A. Epidemiology of Resistance to Antibacterial Agents. In: *Antimicrobial Agents: Antibacterials and antifungals*. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.39-92. 2005.
- BULLARD, B.; LIPSKI, S. L.; LAFONTAINE, E. R. Hag directly mediates the adherence of *Moraxellacatarrhalis* to human middle ear cells. *Infect. Immun.* v.73, p. 5127–5136. 2005.
- CAMPOS, J. M. *Haemophilus*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology*; p.604-613. 1999.
- CAMPOS, J., et. al. Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae* Infections after Extensive Vaccination against *H. influenzae* Type b. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n.2, p.524-529, 2004.
- CASAGRANDE, S.T., et. al. Antimicrobial resistance patterns of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with meningitis in São Paulo, Brazil. *Braz J. Med. Biol. Res.* v.33, n.3, p. 295-300. Mar. 2000.
- CASEY, J. R.; ADLOWITZ, D. G.; PICHICHERO, M. E. New patterns in the otitis pathogens causing acute otitis media six to eight years after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect. Dis. J.* v.29, p.304 -309. 2010.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *Haemophilus b* Conjugate Vaccines for Prevention of *Haemophilus influenzae* Type b Disease Among Infants and Children Two Months of Age and Older Recommendations of the ACIP. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00041736.htm>>. Acesso em: 28 mai 2014.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *Haemophilus influenzae* type b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/hib.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2014.

CHRISTENSEN, H., et. al. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* v. 10, p. 853–861. 2010.

CHEN, D., et. al. Evaluation of purified UspA from *Moraxella catarrhalis* as a vaccine in a murine model after active immunization. *Infect Immun.*v.64, n. 6, p.1900-1905.Jun. 1996.

CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.*v.13, n.13, p. 260-70. Mar. 2012.

COOK, P. P. HECHT, D. W.; SNYDMAN, D. R. Nosocomial *Branhamellacatarrhalis* in a pediatric intensive care unit: risk factors for disease. *J. Hosp. Infect.* v. 13, p. 299–307. 1989.

CORNICK, J.E.; Bentley, S.D. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of Antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. *Microbes Infect.* v. 14, n.7, p.573-583. Jul. 2012.

COSKUN-ARI, F. F.; GULDEMIR, D.; DURMAZ, R. One-step multiplex PCR assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* serogroups /types covered by 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13). *PLoS One*, v.7, n.12. 2012

COURTER, J. D. et. al. Increased clinical failures when treating acute otitis media with macrolides: a meta-analysis. *Ann Pharmacother.* v. 44, p. 471- 478. 2010.

CRISEL, R. M.; BAKER, R.S.; DORMAN, D. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J. Biol. Chem.* v. 10, n. 250, p. 4926-30. 1975.

DAS, J. K., et. al. Effect of community based intervention son childhood diarrhea and pneumonia: uptake of treatment modalities and impact on mortality. *BMC Public Health.* v. 13, n.53, p. 529-532. 2013.

DE ALMEIDA, A. E. E. C. C., et. al. Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 38, p. 777- 781. 2005.

DE ALMEIDA, A. E. E. C. C., et. al. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003). *Diag. Microb. Infect Dis.* v. 54, p.57-62. 2006.

DEL GROSSO M., et. al. The Macrolide Resistance Genes *erm* (B) and *mef* (E) Are Carried by Tn2010 in Dual-Gene *Streptococcus pneumoniae* Isolates Belonging to lonal Complex CC271. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 51, n.11, p. 4184-4186. 2007.

DENAMUR, E., et. al. Nosocomial pulmonary infections caused by *Branhamella catarrhalis* in intensive care units. *Agressologie*, v. 30, p. 251–253. 1989.

DE VRIES, S. P., et. al. Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* v. 73, p. 389–406. 2009.

DIAS, C.A., et. al. Diversity of mutations in the *atpC* gene coding for the c Subunit of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase in clinical isolates of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Brazil. *J. Clin. Microbiol.* v. 45, p. 3065–3067. 2007 a.

DIAS, C.A. et. al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J. Med. Microbiol.* v. 56, p. 1185-1188. 2007b.

DI FABIO, J. L., et. al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America Sireva-Vígia Group, 1993 to 1999. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 20, p. 959-967, 2001.

DI PERSIO, J.R., et. al. Fluoroquinolone-resistant *Moraxella catarrhalis* in a patient with pneumonia: report from the sentry Antimicrobial Surveillance Program (1998). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v.32, n. 2, p. 131-135. Oct. 1998.

DURANDO, P., et. al. Improving the protection against *Streptococcus pneumoniae* with the new generation 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *J. Prev. Med. Hyg.* v. 53, p. 68 -77. 2012.

DWORKIN, M. S.; BORHARDT, S. M. The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, especially in persons  $\geq 65$  years old. *Clin. Infect. Dis.* v. 44, p. 810-816. 2007.

EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report. 2008. On-going surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. European Center for Disease Prevention and Control. Disponível em: <<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance>>. Acesso em: 05 jan 2014.

ELIASSON, I., et. al. Characterization of cell-bound papain-soluble beta-lactamases in BRO-1 and BRO-2 producing strains of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* and *Moraxella nonliquefaciens*. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis.* v.11, p. 313–321. 1992.

ESEL, D., et. al. Evaluation of susceptibility patterns and BRO beta-lactamase types among clinical isolates of *Moraxella catarrhalis*. *Clin Microbiol Infect.* v. 13, p. 1023–1025. 2007.

FARRELL, D. J., et. al. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 beta-lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 56, n. 4, p.773-6. Oct. 2005.

FENOLL, A., et. al. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of *pneumococcus*: characterization of the genes encoding the F<sub>0</sub> complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H(+)-ATPases. *Mol Microbiol.* v. 12, p. 587–598. 1994.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. Bio-manguinhos/Fiocruz nacionaliza a vacina conjugada Hib e passa a produzir mais um imunobiológico 100% brasileiro. [Rio de Janeiro], [2007]. 2p. Disponível em:<[http://www.fiocruz.br/bio/media/release/Release\\_nacionalizacao\\_da\\_Hib\\_-\\_final.pdf](http://www.fiocruz.br/bio/media/release/Release_nacionalizacao_da_Hib_-_final.pdf)> .Acesso em: 23 out. 2007.

FLETCHER, M. A.; FRITZELL, B. Pneumococcal conjugate vaccines and otitis media: an appraisal of the clinical trials. *J. Otolaryngol.* 2012.

FORSGREN, A., et. al. The immunoglobulin D-binding protein MID from *Moraxella catarrhalis* is also an adhesion. *Infect. Immun.* v.71, p. 3302–3309. 2003.

GARCÍA, E., et. al. Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* v. 151, p. 429 -435, 2000.

GARMENDIA, J. et. al. Genotypic and phenotypic diversity of the non capsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *Int Microbiol.* v. 15, p. 159–172. 2012.

GARMENDIA, J. et. al. Characterization of nontypable *Haemophilus influenzae* isolates recovered from adult patients with underlying chronic lung disease reveals genotypic and phenotypic traits associated with persistent infection. *Plos One.* v. 9, p. 1- 17.2014.

GILSDORF, J. R. Comparison of hemagglutinating pili of *Haemophilus influenzae* type b with similar structures of nontypeable *H. influenzae*. *Infect. Immun.* v. 60, p. 374-379. 1992.

GRIJALVA, C. G., et. al. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunization with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet.* v. 369, p. 1179-1186. 2007.

HABIB, M.; PORTER, B. D.; SATZKE, C. Capsular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using the Quellung reaction. *J. Vis. Exp.* v. 24, e 51208. 2014.

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

HARRISON, L.M., et. al. The nasopharyngeal bacterial flora in infancy: effects of age, gender, season, viral upper respiratory tract infection and sleeping position. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* v. 1, n. 25(1-2), p. 19-28. Ago. 1999.

HARRISON, L. H.; SIMONSEN, V.; WALDMAN, E. A. emergence and disappearance of a virulent clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*, cause of Brazilian purpuric fever. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 21, p. 594-605. 2008.

HAVA, D. L.; CAMILLI, A. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* v. 45, p. 1389-1406. 2002.

HAYS, J. P. *Moraxella catarrhalis*: a mini review. *J. Pediatr. Infect. Dis.*v.4, p. 211–220. 2009a.

HAYS, J. P. The evaluation of putative endogenous control housekeeping genes for real-time polymerase chain reaction expression studies in *Moraxella catarrhalis*. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* v. 65, p. 323-326. 2009b.

HEINIGER, N., et. al. Cold shock response of the UspA1 outer membrane adhesin of *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* v. 73, p. 8247- 8255. 2005.

HENRIQUES-NORMARK, B.; TUOMANEN, E. I. The *pneumococcus*: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* v.3, n.7, pii: a010215. 2013.

HILL, D. J. Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule (CEACAM)-binding recombinant polypeptide confers protection against infection by respiratory and urogenital pathogens. *Mol. Microbiol.* v. 55, p.1515–1527. 2005.

HOBAN, D.J., et. al. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* v. 32, p. 81-93. 2001.

HOSHINO, K. High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children. *J. Clin. Microbiol.* v. 40, n.4357- 4359. 2002.

HOWIE, S. R. C., et. al. Re-emergence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in The Gambia following successful elimination with conjugate Hib vaccine. *Vaccine*, v. 25, n. 34, p. 6305-6309. 2007.

HSUEH, P. R.; LUH, K.T. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* V. 8, n. 12, p.1487-1491.. 2002.

IROH TAM, P.Y., et. al. Invasive *pneumococcal* disease after implementation of 13-valent conjugate vaccine. *Pediatrics.* v. 134, n.2, p.210-7.. 2014.

JACOBS, M. R. Prevention of otitis media: role of pneumococcal conjugate vaccines in reducing incidence and antibiotic resistance. *J. Pediatr.* v. 141, p. 287-293, 2002.

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

JESUS, A. A. B. Estudo de cepas de *Haemophilus influenzae* isoladas no período pré e pós-vacinal com a vacina contra o Hib: caracterização de marcadores de resistência a antibióticos e possíveis mudanças genéticas na região capsular do Hi. 2010. 92f. II. tab. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ.

JOURDAIN S., et. al. Differences in nasopharyngeal bacterial carriage in preschool children from different socio-economic origins. *Clin. Microbiol. Infect.* v. 17, p. 907-914. 2011.

KADIOGLU, A.et. al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 6, p.288-301. 2008.

KÄRPÄNOJA, P.et. al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight massspectrometry systems for identification of *viridans* group streptococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v. 33, n.5.p.779 – 882. 2014.

KELLNER, J. D. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in Canada, 1998–2007: update from the Calgary-area *Streptococcus pneumoniae* research (CASPER) study. *Clin. Infect. Dis.* v. 49, p. 205–212. 2009.

KELLY, D.F.; MOXON, E. R.; POLLARD, A. J. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology.* v.113, p. 163-74. 2004.

KHAN, M. A., et. al. BRO  $\beta$ -lactamase and antibiotic resistances in a global cross-sectional study of *Moraxella catarrhalis* from children and adults. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 65, p.91–97. 2010.

KIM, I. S., et. al. Diversity of ampicillin resistance genes and antimicrobial susceptibility patterns in *Haemophilus influenzae* strains isolated in Korea. *Antimicrob. Agents Chemothe*, v. 51, n. 2, p. 453-60. 2006.

KUVAT, N., et. al. TEM-1 AND ROB-1 presence and antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* STRAINS, ISTANBUL, TURKEY. *Southeast Asian.J Trop Med. Public. Health*, v. 46, n. 2, p. 254-61.. 2015.

LANATA, C. F., et.al. Methodological and quality issues in epidemiological studies of acute lower respiratory infections in children in developing countries. *Int. J. Epidemiol.* v. 33, n. 6, p.1362-72. 2004.

LAVAL, C. B., et. al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the area of pneumococcal vaccines. *Clin.Microbiol. Infect*, v. 12, p. 50-55, 2006.

LEDEBOER, N., et. al. *Haemophilus. Manual of Clinical Microbiology*, 10.ed. Washington, DC,ASM Press, p. 588-602. 2011.

LEE. H., et. al. Efficacy and effectiveness of extended-valency pneumococcal conjugate vaccines. *Korean. J. Pediatr.* v. 57, p.55- 66. 2014.

LEVY, F.; WALKER, E. S. BRO beta-lactamase alleles, antibiotic resistance and a test of the BRO-1 selective replacement hypothesis in *Moraxella catarrhalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 53, p.371-374. 2004.

LEVY, F. et. al. Nosocomial transmission clusters and risk factors in *Moraxella catarrhalis*. *Epidemiol. Infect.* v. 137, p.581-590. 2009.

LEUNG, M.H., et. al. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single PCR sequencing strategy. *J. Clin. Microbiol.* v. 50, n.7, p.2419-2427. 2012.



- LIESE, J., et. al. Management of acute otitis media in children – is it time to move to prevention? Antimicrobial Therapy and Infectious Diseases Immunology; Munich, Germany; EMEA .2009.
- LIPSKI, S. L., et. al. Identification of a *Moraxella catarrhalis* gene that confers adherence to various human epithelial cell lines in vitro. FEMS Microbiol Lett. v. 267, p. 207-213. 2007.
- LÓPEZ-FABAL, M. F., et.al. Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identifying respiratory bacterial pathogens: a fast and efficient method. Rev Esp Quimioter. v. 28, n.5. p. 242-6. Oct. 2015 .
- LIU, D. F.; MC MICHAEL, J. C.; BAKER, S. M. *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein CD elicits antibodies that inhibit CD binding to human mucin and enhance pulmonary clearance of *M. catarrhalis* in a mouse model. Infect. Immun. v. 75, p.2818–2825. 2007.
- LIU, D. F., et. al. Polymorphism of the major surface epitope of the CopB outer membrane protein of *Moraxella catarrhalis* FEMS Immunol. Med. Microbiol. v. 47, p. 343–350. 2006.
- LIU, Y., et. al. High prevalence and molecular analysis of macrolide-nonsusceptible *Moraxella catarrhalis* isolated from nasopharynx of healthy children in China. Microb. Drug. Resist. v. 18, p. 417- 426. 2012.
- MACKENZIE, et. al. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. BMC Infectious Diseases. n. 10, p. 304. 2010
- MADHI, S. A., et. al. Long-term effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* and associated interactions with *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* colonization in HIV-infected and HIV-uninfected children. J. Infect. Dis. v. 196, p. 1662–1666. 2012
- MANTESE, O. C., et. al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. J. Pediatr. v.85, p. 495--502. 2009.
- MARRS, C. F., et. al. *Haemophilus influenzae* – human specific bacteria. Front Biosci. v.6, p.41-60. 2001.
- MASAKI, H. A., et. al. prospective study of intrafamilial transmission and antimicrobial susceptibility of *Moraxella catarrhalis*. Microbiol. Immunol. v. 55, p. 599-604. 2011.
- MASAKI, H., et al. Possible relationship of PFGE patterns of *Moraxella catarrhalis* between hospital- and community-acquired respiratory infections in a community hospital. Microbiol. Immunol. v. 47, p. 379-385. 2003.
- MAWAS, F.; HO, M. M.; CORBEL, M. J. Current progress with *Moraxella catarrhalis* antigens as vaccine candidates. Expert. Rev. Vaccines, v. 8, p. 77- 90. 2009.

- MENDONÇA-SOUZA, C.R.V., et. al. Occurrence and characteristics of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in three major Brazilian states. *Microbiol. Drug Resist.* v. 10, p. 313–320. 2004.
- MENEZES, A.P. D. O., et. al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000 - 2007. *Vaccine.*v. 29, p.1139–1144. 2010.
- MENEZES, A. P. O., et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine*, v. 29, p. 1139-1144. 2011.
- MILANEZ R, Resistência do pneumococo à penicilina e aos macrolídeo: implicações no tratamento das infecções respiratórias. *J. Bras. Pneumol.* v. 31, n.4. 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Centro Nacional de Epidemiologia. 1998. Guia de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 523p.
- MOFFITT, K. L.; MALLEY, R. Next generation pneumococcal vaccines. *Curr Opin Immunol.*v. 23, p. 407-413. 2011.
- MOLLENKVIST, A., et. al. The *Moraxella catarrhalis* immunoglobulin D-binding protein MID has conserved sequences and is regulated by a mechanism corresponding to phase variation. *J. Bacteriol.* v. 185, p. 2285-2295. 2003.
- MONTO, A. S., et. Al. Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents, and interventions. *Am J Med.*v.29, n. 99(6B), p.2 4S -2 7S. 1995.
- MOSCHIONI, M., et. al. *Streptococcus pneumoniae* contains 3 rlrA pilus variants that are clonally related. *J Infect Dis.*v. 197, p. 88-896. 2007.
- MÜLLER W, et al. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.* Mar 21;13:61. 2013
- MUÑOZ, R., et. al. Optochin resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Di.* v. 13, p. 63-66, 1990. 2008.
- MURPHY, T. F; PARAMESWARAN, G. I. *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis.* v. 49, p. 124-131. 2009.
- NAVARRO, T. A, et. al. ECDC country experts for pneumococcal disease. Europe an enhanced surveillance of invasive pneumococcal disease in 2010: data from 26 European countries in the post-heptavalent conjugate vaccine era. *Vaccine.* v. 17, n. 32 p. 3644-50. 2014.
- NEVES, F. P., et. al. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. *BMC Infect. Dis.*,v. 13, 2013.
- NEW PROV. <[http://www.newprov.com.br/site/pdf\\_bulas/17-01-11\\_16-46-43.pdf](http://www.newprov.com.br/site/pdf_bulas/17-01-11_16-46-43.pdf)>. Acesso em: 15 Jan. 2016.

NONAKA, S., et. al. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of high-level macrolide resistance in clinical isolates of *Moraxella nonliquefaciens*. *J. Med. Microbiol.* v. 63, p. 242-247. 2014.

NUMMINEN, E., et. al. Climate induces seasonality in pneumococcal transmission. *Sci. Rep.* v. 12, n.5, p. 11344. Jun. 2015.

NUNES, S.; SÁ-LEÃO, R.; DE LANCASTRE, H. Optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* colonizing healthy children in Portugal. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, p. 321-324. 2008.

O'BRIEN, K. L., et. Al. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies. *J. Clin. Microbiol.* v. 39, p. 021-1024. 2001.

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

OGUNNIYI, A. D., et. al. Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. *Infect. Immun.* v. 75, p. 843-1851. 2007.

OTSUKA, T., et. al. The Vaccine Candidate Substrate Binding Protein SBP2 Plays a Key Role in Arginine Uptake, Which Is Required for Growth of *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* v. 23, n. 84, p. 432-8. Nov. 2015.

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

PARK, C., et. al. Genetic diversity of the *ftsI* gene in  $\beta$ -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant and  $\beta$ -lactamase-producing amoxicillin-/clavulanic acid-resistant nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* strains isolated from children in South Korea. *Microb. Drug Resist.* v. 19, n. 3, p. 224-30. Jun. 2013.

PELTOLA, H., et. al. Perspectiva: a five-country analysis of the impact of four different *Haemophilus influenzae* type b conjugates and vaccination strategies in Scandinavia. *J. Infect. Dis.* v. 179, p. 223-229. 1999.

PELTOLA, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 13, p. 302-17. 2000.

PENG, D., et. al.. Role of different moieties from the lipooligosaccharide molecule in biological activities of the *Moraxella catarrhalis* outer membrane. *FEBS J.* v. 274, p. 5350 - 5359. 2007.

PNEUMOCOCCAL MOLECULAR EPIDEMIOLOGY NETWORK (PMEN). Disponível em: <<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/>>. Acesso em: 20 Marc. 2016.

PEREZ, A. C., et. al. Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo. *Pathog. Dis.* v. 70, n. 3, p. 280-288. 2014.

PÉREZ-DORADO, I.; GALAN-BARTUAL, S.; HERMOSO, J. A. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol Oral Microbiol.* v. 27, p. 221-245. 2012.

PÉREZ-VAZQUEZ, M., et. al. Laboratory detection of *Haemophilus influenzae* with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, e moxifloxacin due to *gyrA* and *parC* mutations. *J. Clin. Microbiol.* v. 42, p. 1185-1191. 2004.

PÉREZ-VAZQUEZ, M., et. al. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hyper mutability. *Antimicrob A Chemother.* v. 51, p. 1566-1569. 2007.

PETTTIGREW, M. M., et. al. Microbial Interactions during Upper Respiratory Tract Infections. *Emerg. Infect. Dis.* v.14, n. 10, p. 1584-1591. 2008.

PETTTIGREW, M. M., et. al. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. *J. Clin. Microbiol.* v. 49, p.3750-3755. 2011.

PFALLER, M. A.; EHRHARDT, A. F.; JONES, R. N. Frequency of pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract infections in the respiratory surveillance program study: microbiology from the medical office practice environment. *Am. J. Med.* v. 17, n. 111, p. 4S-12S.Dez. 2001.

PICAZO, J., et. al. Clonal and clinical profile of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A causing pediatric invasive infections: a 2-year (2007-2009) laboratory-based surveillance in Madrid. *Vaccine.* v. 29, p.1770–1776. 2011.

PIKIS, A., et. al. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J. Infect. Dis.* v.184, p. 582-592.2001.

PIMENTA, F. C., et. al. Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* v. 44, p. 2838-2843. 2006.

PINTO, T. C., et. al. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene. *J. Clin. Microbiol.* v. 51, p. 3242-3259, 2013.

PLETZ, M. W., et. al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.32, p. 199-206. 2008.

PLOSKER, G., et. al. L. 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a review of its use in infants, children, and adolescents. *Pediatr. Drugs*, v. 15, p. 403-423. 2013.

PORAT, N., et. al. The impact of pneumococcal conjugate vaccines on carriage of and disease caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D in southern Israel. *Vaccine*. 2016 May 27;34(25):2806-12.

QUIÑONES-FALCONI, F., et. al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Mexico. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 49, n. 1, p. 53-58. Mai. 2004.

RADDAOUI, A., et al. Serotype Distribution, Antibiotic Resistance and Clonality of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Immuno compromised Patients in Tunisia *PLoS ONE*. v. 10, n. 10, e0140390.2015

RATTANAUMPAWAN, P., et. al. Prevalence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) infection at Maharaj Nakorn Chiang Mai hospital. *Infect Dis Antimicrob. Agents*. v. 22, p. 93-101. 2005.

RIBEIRO, G. S., et. al. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. *J. Infect. Dis.* v. 187, p. 109 -116. 2003.

RICHARDS, S. J., et al. Outbreak of *Moraxella catarrhalis* in a respiratory unit. *Thorax*, v. 48, p. 91-92. 1993

SAITO, R., et. al. Molecular mechanism of macrolide-lincosamide resistance in *Moraxella catarrhalis*. *J. Med. Microbiol.* v. 61, p. 1435-1438. 2012.

SAITO, R., et. al. Role of *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein CD in bacterial cell morphology and auto aggregation. *Rev. Microbiol.* v. 164, p. 236-243. 2013.

SANBONGI, Y., et. al. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 50, n.7, p. 2487-2492. Jul. 2006.

SCHNEERSON, R., et. al. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide – protein conjugates. *J. Exp. Med.* v. 152, p. 361-376. 1980.

SELVARAJ, K. et. al. . Acute respiratory infections among under-5 children in India: A situational analysis. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* v.5, n.1, p. 15-20. Jan. 2014

SHAIKH, S.B., et. al. Prevalence and resistance pattern of *Moraxella catarrhalis* in community-acquired lower respiratory tract infections. *Infect Drug Resist.* v. 31, n.8, p.263-267. Jul. 2015.

SINGH, B., et. al. Vitronectin binds to the head region of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein A2 and confers complement-inhibitory activity. *Mol. Microbiol.* v. 75, p. 1426 -1444. 2010.

SIMELL, B. et. al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Ver Vaccines*. v. 11, p. 841–855. 2012.

- SINGHAL, N., et. al. MALDI-TOF mass spectrometry: na emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* v.5, n. 6, p.791. Aug. 2015.
- SINGLETON, R. J., et. al. Invasive pneumococcal disease caused by non-vaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA*, v. 297, p. 1784-1792. 2007.
- SLOTVED, H. C., et. al. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J. Clin. Microbiol.* v. 42, p. 2518–2522. 2004.
- SOUZA, A. R. V. *Caracterização de amostras de Streptococcus pneumoniae resistentes à optoquina isoladas de pacientes e portadores assintomáticos.* , 2011. Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SPANIOL, V., et. al. Physiologic cold shock increases adherence of *Moraxella catarrhalis* to and secretion of interleukin 8 in human upper respiratory tract epithelial cells. *J. Infect. Dis.* v. 200, p. 1593-1601. 2009
- SPANIOL, V., et. al. Physiologic cold shock of *Moraxella catarrhalis* affects the expression of genes involved in the iron acquisition, serum resistance and immune evasion. *BMC Microbiol.* v. 11, p.182 -185. 2011.
- SPANIOL, V., et. al. RNA-Seq-based analysis of the physiologic cold shock-induced changes in *Moraxella catarrhalis* gene expression. *PLoS One.* v. 8, n. 7, e682988. 2013.
- SPELLERBERG, B.; BRANDT, C. *Streptococcus In: Manual of Clinical Microbiology.* p. 331-349. 2011.
- SPIJKERMAN, J., et. al. Long-term effects of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis* *PLoS One.* v. 7, n. 6, e39730. 2012.
- STEENS, A., et. al. Prompt effect of replacing the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine with the 13-valent vaccine on the epidemiology of invasive pneumococcal disease in Norway. *Vaccine*, v. 31, p. 6232- 6238. 2013.
- SUZUKI, M., et. al. Nasopharyngeal bacterial interactions in children. *Emerg. Infect Dis.* v.20, p.323 -324. 2014.
- TAGG KA, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Multilocus Sequence Typing of *Escherichia coli* Reveals Diversity among Isolates Carrying blaCMY<sub>2</sub>-Like Genes. *PLoS One.* 20;10(11):e0143446. 2015
- TAN, T. T.; RIESBECK, K. Current progress of adhesins as vaccine candidates for *Moraxella catarrhalis* *Expert.Rev. Vaccines*, v. 6, p.949-56. 2007.
- TAN, T. Q., et. al. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in theera of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin.Microbiol. Rev.* v. 25, n.3, p.:409-19. Jul. 2012

TEIXEIRA, L. M.; ANDRADE, J. R. C.; LOURENÇO, N. J. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Microbiol.* v. 19, p. 93-99. 1988.

TEMIME, L., et. al. Impact of capsular switch on invasive pneumococcal disease incidence in a vaccinated population. *PLoS One.* v. 3, n.9, e 3244. 2008.

TRISTRAM, S.; JACOBS, M. R., APPELBAUM, P. C. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 20, n. 2, p. 368-89. Apr. 2007.

TSAI, H. Y., et. al. Bacteremic pneumonia caused by a single clone of *Streptococcus pneumoniae* with different optochin susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, p. 458–459. 2000.

TSAI, M. H., et. al. Pathogenic bacteria nasopharyngeal colonization and its impact on respiratory diseases in the first year of life: the PATCH Birth Cohort Study. *Pediatr Infect. Dis. J.* v. 34, n.6, p. 652- 658. Jun. 2015.

TSANG, R. S. W., et .al. Characterization of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Manitoba, Canadá, 2000-2006: Invasive Disease due to Non-Type B Strains. *Clin Infect Dis,* v. 44, n. 12, p. 1611-1614. 2007.

ULANOVA, M.; TSANG, R. S. *Haemophilus influenzae* serotype a as a cause of serious invasive infections. *Lancet Infect. Dis.* v. 14, p. 70-82. 2014.

VAN GILS, E. J., et. al. Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA,* v. 304, p. 1099-1106. 2010.

VAN HAM, S. M., et. al. Contribution of the major and minor subunits to fimbria-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells and erythrocytes. *Infect. Immun.* v. 63, p. 4883-4889. 1995.

VAN, K., et. al. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Med. Microbiol.* v. 33, p. 271-276. 1990.

VANEECHOUTTE, M., et. al. *Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella,* and Other Non fermentative Gram- Negative Rods, *Manual of Clinical Microbiology,* 10.ed. Washington, DC, ASM Press. 2011. p. 714-738.

VELASQUEZ, P. A. G., et. al. Alta prevalência de crianças portadoras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina em creches públicas. *J. Pediatr.* v. 85 n. 6. 2009.

VESIKARI, T., et. al. Immunogenicity of the 10-valent Pneumococcal Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Protein D Conjugate Vaccine (PHiD-CV) Compared to the Licensed 7vCRM Vaccine. *Pediatric. Infect. Dis. J.* v. 28, p.66 - S76. 2009.

VERDUIN, C. M., et. al. Complement-resistant *Moraxella catarrhalis* forms a genetically distinct lineage within the species. *FEMS Microbiol Lett.* v. 184, p.1–8. 2000.

- VERDUIN, C.M., et. al. *Moraxellacatarrhalis*: from emerging to established pathogen *Clin. Microbiol. Rev.* v. 15, p. 125-144. 2002.
- VERHAEGH, S.J., et.al. Temporal development of the humoral immune response to surface antigens of *Moraxella catarrhalis* in young infants. *Vaccine*, v. 5, n. 29, p. 5603-5610. Aug. 2011.
- VERNATTER, J.; PIROFSKI, L. A. Current concepts in host-microbe interaction leading to pneumococcal pneumonia. *Curr Opin. Infect. Dis.* v. 26, p. 277- 283. 2013.
- VIDAKOVICS, M. L. P.; RIESBECK, K. Virulence mechanisms of *Moraxella* in the pathogenesis of infection. *Curr Opin Infect. Dis.* v. 22, p. 279-285. 2009.
- VILA-CORCOLES, A., et. al. Drug-resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates among Spanish middle aged and older adults with community-acquired pneumonia *BMC Infect. Dis.* v. 9, n. 36. 2009.
- XU, Q., et. al. Co-colonizing the nasopharynx *Haemophilus influenzae* predominates over *Streptococcus pneumoniae* except serotype 19A strains to cause acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 31, p. 638-40. 2012
- XU, Q.; PICHICHERO, M. E. Co-colonization by *Haemophilus influenzae* with *Streptococcus pneumoniae* enhances pneumococcal-specific antibody response in young children. *Vaccine*, v. 32, p. 706 -711. 2014.
- WAGENVOORT, G. H., et. al. Invasive pneumococcal disease: Clinical outcomes and patient characteristics 2-6 years after introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to the pre-vaccine period, the Netherlands. *Vaccine*.v. 34, n. 8, p.1077-85. 17 fev. 2016.
- WARD, J. I.; Zangwill, K. M. *Haemophilus influenzae* vaccines. *Vaccines*, p. 183 – 221. 1999
- WEIL-OLIVIER, C., et. al. Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: a European perspective. *BMC Infect. Dis.* v. 12, n. 207. 2012
- WERTHEIM, H. F., et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* v. 5, p. 751–762. 2005.
- WHITNEY, C. G., et. al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet*, v. 368, p. 1495–1502. 2006
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION .Acute Respiratory Infections. Disponível em: < [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index3.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html)>. Acesso em: 7 Abr. 2015.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Immunization Surveillance, assessment and monitoring: [2014]. 1p. Disponível em: <[http://www.who.int/vaccine\\_safety/initiative/tools/HiB\\_Vaccine\\_rates\\_information\\_sheet.pdf?ua=1](http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/HiB_Vaccine_rates_information_sheet.pdf?ua=1)>. Acesso em: 25 Mai. 2014.



WIERTSEMA, S. P., et al. Predominance of nontypable *Haemophilus influenzae* in children with otitis media following introduction of a 3+0 pneumococcal conjugate vaccines schedule. *Vaccine*. v. 29, p. 5163-5170. 2011.

WIRTH, T., et al. The rise and spread of a new pathogen: seroresistant *Moraxellacatarrhalis*. *Genome Res.* v. 17, p. 1647-1656. 2007.

WOLF, B., et al. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 46, p.757-765. 2000.

YASSIN, G.M.; AMIN, M.A.; ATTIA, A. S. Immuno informatics identifies a lactoferrin binding protein A peptide as a promising vaccine with a global protective prospective against *Moraxella catarrhalis*. *J. Infect. Dis.* 2016

YOKOTA, S., et al. High prevalence of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae* type b isolates derived from respiratory tract specimen sin Japanese patients. *Int J. Infect. Dis.* v. 13, n. 5, p. 584-588. Set. 2009.

YUN, K.W., et al. Capsular polysaccharide gene diversity of pneumococcal serotypes 6A, 6B, 6C, and 6D. *Int J. Med. Microbiol.* v. 304, n. 8, p. 1109-1117. Nov. 2014.

ZÄHNER, D. ; GUDLAVALLETI, A.; STEPHENS, D. S. Increase in pilus islet 2-encoded pili among *Streptococcus pneumoniae* isolates, Atlanta, Georgia, USA. *Emerg. Infect. Dis.* v. 16, p. 955-962. 2010.

ZANELLA, C. R., et al. Evaluation of *Haemophilus influenzae* type b carrier status among children 10 years after the introduction of Hib vaccine in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 110, n. 6, p. 755-759. 2015

ZEMPLICKOVÁ, H., et al. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Staphylococcus aureus* isolated from the nasopharynx of healthy children attending day-care centres in the Czech Republic. *Epidemiol. Infect.* v. 134, n. 6, p.1179-87. Dez. 2006.

ZHU, B., et al. MALDI-TOF MS distinctly differentiates nontypable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *PLoS One*. v.8, n.2:e56139. 2013.

**ANEXO A**  
**INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS**

**Identificação:**

Unidade / Setor:	Prontuário:
Data da consulta:    /    /	Data da admissão:    /    /
Data de nascimento:    /    /	Idade:
Sexo: ( ) M    ( ) F	Raça:
Naturalidade :	Nacionalidade:
Informante: ( ) pais    ( ) outros	

**Domínio 1** – Promoção à Saúde (*Percepção de bem-estar ou de normalidade de funcionamento e estratégias utilizadas para manter o controle desse bem-estar e a normalidade do funcionamento, bem como para melhorá-los*).

- Causa da internação ou atendimento ambulatorial: \_\_\_\_\_

- Queixa apresentada pelo paciente e/ou familiares no momento do atendimento: \_\_\_\_\_

- Medicamento(s) em uso: \_\_\_\_\_

- Doenças pré-existentes: \_\_\_\_\_

- Internações anteriores (causas e datas): \_\_\_\_\_

- Aleitamento materno:    ( ) SIM    ( ) NÃO

- Teste do pezinho:    ( ) SIM    ( ) NÃO

- História vacinal (cartão de vacinação): \_\_\_\_\_

- Exame médico e dentário periódico:    ( ) SIM    ( ) NÃO

- Número de pessoas no domicílio: ( ) \_\_\_\_\_

- Presença de animais: ( ) SIM ( ) NÃO    QUAL (IS)? \_\_\_\_\_

**Domínio 2** – Nutrição (*Atividade de ingerir, assimilar e usar nutrientes com fins de manter e reparar tecidos e produzir energia*)

- Alimentação (volume, qualidade e frequência): \_\_\_\_\_

Via de alimentação (oral, sonda nasogástrica / orogástrica, gastrostomia, parenteral total): \_\_\_\_\_

**Domínio 3** – Eliminação e Troca (*Secreção e excreção de produtos residuais do organismo*)

- Função Respiratória – sintomas relacionados a desequilíbrio na ventilação / perfusão: \_\_\_\_\_

**Domínio 4** – Atividade e repouso (*Produção, conservação, gasto ou equilíbrio de recursos energéticos*)

- Mobilidade física: ( ) Normal ( ) Prejudicada ( ) Restrito ao leito

- Cirurgias anteriores: \_\_\_\_\_

- Histórico de doença pulmonar: ( ) Bronquite ( ) Bronqueolite ( ) Asma ( ) Pneumonia  
( ) Outros. Qual (is)? \_\_\_\_\_

- Histórico de doença cardiovascular: ( ) CIV ( ) Tetralogia ( ) Aneurismas ( ) Arritmias  
( ) Outros. Qual (is)? \_\_\_\_\_

### Domínio 11 – Segurança/ Proteção

- Ao exame físico:

Mucosas: \_\_\_\_\_

Pele: \_\_\_\_\_

Gânglios: \_\_\_\_\_

Dispositivos	DIAS	Dispositivos	TIPO	
TUBO TRAQUEAL		ACESSO VEN CENTRAL		DIAS
TRAQUEOSTOMIA		ACESSO VEN PERIFÉRICO		
CAT. NASOGÁSTRICO		DRENOS		
CAT. NASO ENTERAL		OUTROS		
CAT VESICAL DE DEMORA		OUTROS		
DERIVAÇÃO VENT EXT		OUTROS		

- Uso de Antimicrobianos:

NOME / CLASSE	DIAS	NOME / CLASSE	DIAS

### Domínio 13 – Crescimento/ desenvolvimento

- Peso: \_\_\_\_\_

- Comprimento/ estatura: \_\_\_\_\_

## ANEXO B



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas




---

 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO
 

---

Título: Caracterização de amostras de *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae* Isoladas de colonização nasofaringe de uma população pediátrica atendida em um Hospital Universitário do Rio de Janeiro.

Pesquisador responsável: Prof. Vânia Lúcia Carreira Merquior.

Intuição a que pertence o pesquisador responsável: Faculdade de Ciências Médicas ,  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Telefone para contato: (21)2868 8280.

Nome \_\_\_\_\_ do  
voluntário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos e \_\_\_\_\_ meses

Responsável legal pela criança: \_\_\_\_\_

R. G. do responsável: \_\_\_\_\_

O (A) Sr (a) está sendo convidado (a) a participar com o seu (ua) filho (a) do projeto de pesquisa “Caracterização de amostras de *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae* Isoladas de colonização nasofaringe de uma população pediátrica atendida em um Hospital Universitário do Rio de Janeiro” de responsabilidade da Profa. Vânia Lúcia Carreira Merquior.

O objetivo deste documento é fornecer informações sobre esta pesquisa. Nela está explicado com detalhes sobre como o estudo será feito. A participação do (a) seu (ua) filho (a) neste trabalho é voluntária. Isto quer dizer que você pode não querer que ele (a) participe, ou deixar de fazer parte dele a qualquer hora. Se você decidir não participar desse estudo, o (a) seu (ua) filho (a) continuará recebendo o mesmo atendimento na instituição. Está pesquisa tem a intenção de desenvolver e conduzir um estudo em um grupo de crianças para conseguir saber de um jeito preciso, sobre a presença das bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae* no nariz das crianças.

O procedimento será o seguinte: primeiro, nós faremos uma entrevista para saber mais sobre o dia a dia do seu (ua) filho (a) e informações sobre a saúde dele (a); depois a secreção para pesquisa das bactérias será obtida do nariz, através da coleta com a ajuda de swabs estéreis (“cotonetes”), finos e flexíveis, isso é um pouco incômodo mais não acarreta problemas para a criança. A secreção do nariz será coletada e encaminhada para a Disciplina de Microbiologia e Imunologia da UERJ, para análise.

A participação de seu (ua) filho (a) nesta pesquisa pode nos ajudar a entender melhor quais são os fatores associados com estas bactérias e a relação delas com as doenças que causam problemas em crianças. Apartir dos resultados deste trabalho, esperamos melhorar a assistência e os cuidados a estas crianças. Os resultados do estudo vão ser publicados, mas o nome de seu (ua) filho (a) não vai aparecer em nenhuma publicação. Todas as informações são guardadas em segredo.

Rubrica do responsável legal pela criança \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador responsável pela pesquisa \_\_\_\_\_

Se você tiver qualquer dúvida sobre esta pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, a Profa. Vânia Lúcia Carreira Merquior, no Programa de Pós- graduação em Microbiologia – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), pelo telefone (21) 2868 – 8280, a fim de esclarecer as suas questões. Outra forma de contato para resolver suas dúvidas é através do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, situado no prédio do Hospital Pedro Ernesto da UERJ. O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê formado por um grupo de vários profissionais que se reúne para avaliar os projetos e garantir que os mesmos não trazem nenhum dano aos participantes da pesquisa. O seu horário de funcionamento é das 09 hs às 12hs e das 13hs as 17hs , e o contato pode ser pessoal ou pelo telefone (21) 28688000.

Pra a participação da criança na pesquisa, seu representante legal deverá rubricar as folhas deste termo de consentimento livre e esclarecido, apondo a sua assinatura na ultima página do referido termo. O mesmo deverá ser realizado pelo pesquisador responsável pelo estudo.

Eu, \_\_\_\_\_  
R. G. n° \_\_\_\_\_, responsável legal por \_\_\_\_\_,  
declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa  
acima descrito.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal pela criança

\_\_\_\_\_  
Vânia Lúcia Carreira Merquior  
(Pesquisadora responsável pela pesquisa)