

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina



**Contribuição para a caracterização da população de *Streptococcus pneumoniae* causadora de infecções graves.**

Isa Domingues Serrano

Doutoramento em Ciências da Saúde, Especialidade de Microbiologia

Lisboa

2007



Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina



**Contribuição para a caracterização da população de *Streptococcus pneumoniae* causadora de infecções graves.**

Isa Domingues Serrano

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Lisboa  
orientada pelo Professor Doutor Mário Nuno Ramos de Almeida Ramirez.

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 10 de Julho de 2007.**

**As opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade do seu autor.**

# ÍNDICE



	Página
<b>AGRADECIMENTOS</b>	xv
<b>PREÂMBULO</b>	xvii
<b>RESUMO</b>	xix
<b>ABSTRACT</b>	xxiii
<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO</b>	1
<b>CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO</b>	
<b><i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i></b>	3
Breve história da descoberta de <i>S. pneumoniae</i>	3
Identificação laboratorial e classificação de <i>S. pneumoniae</i>	5
Características morfológicas e culturais de <i>S. pneumoniae</i>	7
Ecologia de <i>S. pneumoniae</i>	8
Aspectos epidemiológicos de <i>S. pneumoniae</i>	9
Estabelecimento da infecção pneumocócica	11
Abordagem do sistema imunológico do hospedeiro humano	14
Acção patogénica de <i>S. pneumoniae</i>	17
<b>MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DE</b>	
<b><i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i></b>	27
A variação de fase na patogenicidade de <i>S. pneumoniae</i>	27
Relação entre a variação de fase na morfologia e a lisogenia fágica	47
As estruturas tipo pili como mecanismo de patogenicidade de	
<i>S. pneumoniae</i>	49
Regulação da flora microbiana na nasofaringe	51
<b>PROFILAXIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR</b>	
<b><i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i></b>	55
Profilaxia das infecções pneumocócicas	55
<b>CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE</b>	
<b><i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> E TERAPÊUTICA</b>	
<b>ANTIMICROBIANA</b>	62
Métodos usados na serotipagem	62
Antimicrobianos: Mecanismos de acção e resistência de <i>S. pneumoniae</i>	63
Disseminação da resistência aos antimicrobianos	74

Caracterização molecular de <i>S. pneumoniae</i>	81
OBJECTIVOS	85
<b>CAPÍTULO II – MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS</b>	<b>89</b>
RESULTADOS EXPERIMENTAIS SOBRE A VARIAÇÃO DE FASE	91
Identificação e condições de crescimento de <i>S. pneumoniae</i>	91
Variação de fase em estirpes responsáveis por infecções invasivas	92
Variação de fase em estirpes responsáveis por infecções não invasivas	103
Experimentação animal	105
Quantificação da enzima $\beta$ -galactosidase	108
RESULTADOS EXPERIMENTAIS SOBRE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS EM ESTIRPES CAUSADORAS DE INFECÇÕES INVASIVAS	114
Serotipagem	115
Resistência aos antimicrobianos	130
Caracterização molecular	148
MEIOS DE CULTURA E OUTRAS SOLUÇÕES	180
<b>CAPÍTULO III – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>217</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>245</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>261</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Contribuição dos factores de virulência de <i>S. pneumoniae</i> na progressão da infecção invasiva num modelo de infecção murino.	24
<b>Figura 2:</b> Factores de virulência expressos na superfície celular de variantes transparentes e opacos em <i>S. pneumoniae</i> .	33
<b>Figura 3:</b> Percentagem do fenótipo opaco, transparente, intermédio e de misturas de fenótipos, nas 304 estirpes responsáveis por infecção invasiva isoladas, entre 1999 e 2002, em indivíduos com doença invasiva, em Portugal.	100
<b>Figura 4:</b> “Odds ratio” (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% específico para cada um dos serótipos das 224 estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas, entre 1999 e 2002, em Portugal.	102
<b>Figura 5:</b> Dias de sobrevivência de 42 ratinhos após a inoculação de diferentes concentrações de variantes de opacidade isolados de estirpes responsáveis por infecções invasivas.	107
<b>Figura 6:</b> Actividade da enzima $\beta$ -galactosidase em 13 variantes transparentes e opacos, e no total, isolados de estirpes responsáveis por infecções invasivas.	110
<b>Figura 7:</b> Média e desvio padrão da actividade da enzima $\beta$ -galactosidase em estirpes de <i>S. pneumoniae</i> com diferentes fenótipos.	112
<b>Figura 8:</b> Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com < 2 anos de idade.	118
<b>Figura 9:</b> Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com idade compreendida entre 2 e 6 anos.	119

<b>Figura 10:</b> Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em indivíduos com idade compreendida entre 6 e 60 anos.	120
<b>Figura 11:</b> Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em adultos com idade $\geq 60$ anos.	120
<b>Figura 12:</b> Proporção de alguns serótipos encontrados na totalidade das estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, em Portugal, em cada ano de estudo.	124
<b>Figura 13:</b> Potencial cobertura dos serótipos da vacina 7-valente, nas 35 estirpes de <i>S. pneumoniae</i> isoladas, entre 2004 e 2005, em crianças ( $< 2$ anos) com infecções invasivas, em Portugal.	127
<b>Figura 14:</b> Potencial cobertura das vacinas 7-valente, 9-valente, 11-valente e 23-valente, considerando as estirpes de <i>S. pneumoniae</i> isoladas, entre 2004 e 2005, em cada grupo etário, em indivíduos com infecções invasivas, em Portugal.	128
<b>Figura 15:</b> Resistência aos antimicrobianos nas estirpes de <i>S. pneumoniae</i> , isoladas em crianças ( $< 6$ anos) com infecções invasivas, em Portugal, em cada ano de estudo.	135
<b>Figura 16:</b> Serótipos expressos pelas estirpes de <i>S. pneumoniae</i> não susceptíveis à penicilina, isoladas de crianças ( $< 2$ anos) com infecções invasivas, em Portugal.	147
<b>Figura 17:</b> Condições atmosféricas de incubação na morfologia das colónias de <i>S. pneumoniae</i> .	247
<b>Figura 18:</b> Diferenças na morfologia das colónias opacas e transparentes de <i>S. pneumoniae</i> .	249
<b>Figura 19:</b> Colónia transparente, opaca e intermédia numa estirpe de <i>S. pneumoniae</i> responsável por infecção invasiva.	251
<b>Figura 20:</b> Colónias seccionadas numa estirpe de <i>S. pneumoniae</i> responsável por infecção invasiva.	251

**Figura 21:** Diversidade do fenótipo de opacidade entre estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas expressando os 10 serótipos mais prevalentes. 259

**Figura 22:** Dendrogramas dos perfis de macrorestrição e STs encontrados nos serótipos seleccionados. 301

## ÍNDICE DE QUADROS

	Página
<b>Quadro 1:</b> Diferentes nomenclaturas para os variantes morfológicos de <i>S. pneumoniae</i> .	28
<b>Quadro 2:</b> Estruturas de superfície expressas diferencialmente pelos variantes transparentes e opacos de <i>S. pneumoniae</i> .	37
<b>Quadro 3:</b> Estirpes inicialmente avaliadas quanto ao fenótipo de opacidade.	98
<b>Quadro 4:</b> Número de estirpes responsáveis por infecções invasivas com fenótipo opaco, transparente, intermédio e mistura de fenótipos, que expressam os 10 serótipos mais prevalentes (n=304), isoladas entre 1999 e 2002, em Portugal.	101
<b>Quadro 5:</b> Número de estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções não invasivas com fenótipo opaco, transparente, intermédio e misturas de fenótipos, que expressam os serótipos 3, 23F, 14 e 19A (n=110), isoladas em 2003 em Portugal.	104
<b>Quadro 6:</b> Sistema em xadrez para a serotipagem das estirpes de <i>S. pneumoniae</i> .	115
<b>Quadro 7:</b> Percentagem e ordem de frequência dos serótipos expressos por estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, isoladas de 1999 a 2002 e de 2004 a 2005 em Portugal, em crianças com < 6 anos e na totalidade das estirpes.	121
<b>Quadro 8:</b> Susceptibilidade à penicilina em estirpes de <i>S. pneumoniae</i> , isoladas entre 2004 e 2005, de indivíduos com infecções invasivas em Portugal, em cada grupo etário e no total.	132
<b>Quadro 9:</b> Susceptibilidade à levofloxacina em estirpes de <i>S. pneumoniae</i> , isoladas entre 2004 e 2005, de indivíduos com infecções invasivas em Portugal, em cada grupo etário e no total.	132
<b>Quadro 10:</b> Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de <i>S. pneumoniae</i> , isoladas entre 2004 e 2005, em indivíduos com infecções invasivas em Portugal, em cada grupo etário e no total.	133

<b>Quadro 11:</b> Padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos das 617 estirpes de <i>S. pneumoniae</i> isoladas, entre 2004 e 2005, de indivíduos com infecções invasivas, em Portugal, em cada grupo etário e no total.	138
<b>Quadro 12:</b> Serótipos e antibiótipos de estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, com resistência (intermédia ou elevada) à penicilina, isoladas entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com idade < 6 meses.	140
<b>Quadro 13:</b> Serótipos e antibiótipos de estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, com resistência (intermédia ou elevada) à penicilina, isoladas entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com idade $\geq 6$ meses e < 6 anos.	141
<b>Quadro 14:</b> Serótipos e antibiótipos de estirpes de <i>S. pneumoniae</i> responsáveis por infecções invasivas, com resistência (intermédia ou elevada) à penicilina, isoladas entre 2004 e 2005 em Portugal, em indivíduos com idade $\geq 6$ anos.	142
<b>Quadro 15:</b> Características das 465 estirpes de <i>S. pneumoniae</i> isoladas entre 1999 e 2002, e das 617 estirpes isoladas entre 2004 e 2005, em indivíduos com infecções invasivas, em Portugal.	155



## AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Mário Ramirez, meu orientador durante 6 anos, por sempre me ter incentivado e acompanhado nos projectos de Mestrado e Doutoramento. Agradeço por me ter confiado o desenvolvimento deste tema tão inovador e aliciante e de ter acreditado na concretização dos objectivos delineados. Agradeço ainda os conhecimentos e rigor científicos que me transmitiu ao longo destes anos, a perseverança inabalável que sempre demonstrou na condução e acompanhamento de todo o trabalho, assim como a sua inteira disponibilidade. Estou também grata pela oportunidade de publicação de artigos de relevância científica pelas participações em congressos e reuniões internacionais, bem como pela sua amizade e estímulo permanentes.

Ao Doutor José Melo-Cristino, Director do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, agradeço ter facultado a minha permanência neste laboratório. Quero ainda agradecer o facto de me ter apoiado na concretização deste trabalho, quer pelas críticas que fez que contribuíram de forma muito positiva para o seu aperfeiçoamento, quer pelo apoio que concedeu durante o meu percurso, nomeadamente na realização de algumas experiências. Agradeço ainda o conhecimento científico e rigor que sempre procurou inculcar-me.

Agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia, a confiança reiterada, por me ter atribuído uma bolsa para a realização do Doutoramento (referência SFRH/BD/14158/2003), sequencialmente à atribuída no decurso do Mestrado.

Ao Professor Doutor Nuno Santos por ter disponibilizado o equipamento para a análise dos variantes transparentes e opacos e pela amabilidade com que me recebeu no laboratório de Bioquímica do Instituto de Medicina Molecular.

À Dr<sup>a</sup> Mónica Miranda, do Laboratório de Microbiologia do INFARMED, pela realização de ensaios por cromatografia gás-líquido.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Medicina Molecular, com os quais vivi grande parte do tempo desde que iniciei o meu trabalho neste Laboratório.

À Sandra Aguiar, pela disponibilidade constante, companheirismo e apoio dado ao longo destes anos. Quero agradecer, também, o facto de ter gentilmente cedido os dados relativos às estirpes isoladas em 2003.

Ao Francisco Pinto pela simpatia e pela disponibilidade em me ter ajudado no tratamento estatístico.

Ao Doutor Thomas Hãnscheid pela boa disposição, optimismo e amizade demonstradas.

À Catarina Pronto e à Teresa Figueiredo pelas deliciosas horas de almoço, constante encorajamento, e em suma pela amizade.

Aos meus pais, ao Rui, à Inês, ao Santiago e avós agradeço por tudo o que há de bom.

## PREÂMBULO

Este trabalho abordou dois temas principais. O primeiro foi a caracterização dos variantes de opacidade em estirpes de *Streptococcus pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas com um contexto genético conhecido e expressando os dez serótipos mais prevalentes. Os resultados deste estudo foram publicados em 2006 tendo como título “Heterogeneity of pneumococcal phase variants in invasive human infections” (*BMC Microbiol*, 26;6:67). O seu contributo para um maior conhecimento sobre a variação de fase reside em ter sido o primeiro estudo sobre este fenómeno numa colecção ampla de estirpes causadoras de infecção no Homem, previamente caracterizadas quanto ao fenótipo e genótipo, mas sobretudo por se ter demonstrado uma associação entre serótipo e fenótipo de opacidade.

O segundo tema visou continuar o estudo epidemiológico que foi iniciado no Instituto de Microbiologia, antes da introdução da vacina 7-valente em Portugal no ano de 2001, para determinar se a estrutura da população de *S. pneumoniae* causadora de infecções invasivas foi alterada após a disponibilização da vacina. No âmbito do segundo tema foram analisadas a distribuição da frequência dos tipos capsulares, da resistência aos antimicrobianos e das linhagens genéticas, em cada ano de estudo, de 1999 a 2002 e de 2004 a 2005. Este trabalho foi realizado em estreita colaboração com a Dra. Sandra Aguiar. Os resultados relativos às estirpes isoladas entre 1999 e 2002 deram origem a duas publicações: “Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy” (*Clin Microbiol Infect*, 10(7):652-6) e “Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal”, (*J Clin Microbiol*, 43(4):1706-15). Estes estudos contribuíram para a monitorização deste agente patogénico em Portugal, permitindo avaliar a potencial eficácia da vacina usada na profilaxia das infecções pneumocócicas em crianças com menos de dois anos de idade.

A dissertação está dividida em três capítulos. No capítulo I a introdução está estruturada em quatro partes que englobam o desenvolvimento dos temas relacionados com o fenómeno da variação de fase e com a epidemiologia das infecções pneumocócicas. As características da espécie *S. pneumoniae*, os seus mecanismos de patogenicidade, a profilaxia das infecções causadas por *S. pneumoniae* e finalmente a caracterização epidemiológica de *S. pneumoniae* e

aspectos relacionados com a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, são as divisões que compõem este capítulo.

No capítulo II optou-se por juntar os materiais e métodos aos resultados para que à leitura do método adoptado se sigam de imediato os resultados. Crê-se que a leitura se torna assim mais escurrita.

No capítulo III discutem-se os dois temas da tese. Na discussão do primeiro tema os resultados sobre a variação de fase são avaliados e comparados com outros estudos publicados sobre o fenómeno de opacidade em *S. pneumoniae*. São também mencionadas experiências preliminares que poderão ajudar a diferenciar os variantes transparentes e opacos, tais como a proporção de ácidos gordos insaturados nos fosfolípidos membranares e a determinação do potencial eléctrico da região de interface entre a superfície da bactéria e o meio aquoso (potencial zeta). Estas experiências não foram incluídas nos resultados porque falta ainda analisar estirpes expressando diferentes serótipos, de modo a saber se estas características estão associadas ao serótipo.

Na discussão do segundo tema debate-se a frequência dos serótipos, a frequência da resistência aos antimicrobianos e finalmente a distribuição das linhagens genéticas, entre os dois períodos de estudo. Posteriormente faz-se a comparação das alterações documentadas na população causadora de infecção invasiva com as alterações observadas noutros estudos, nas estirpes causadoras de infecção invasiva isoladas noutros países e nas estirpes associadas a colonização isoladas em Portugal, após a introdução da vacina heptavalente.

## RESUMO

A espécie *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é um agente potencialmente patogénico que pode viver na nasofaringe assintomaticamente ou causar infecções invasivas e não invasivas no Homem. Está associado a uma elevada taxa de morbidade e mortalidade, sobretudo em crianças com menos de 2 anos.

Face à importância desta bactéria para a saúde humana foram estudados dois temas. O primeiro é a variação de fase, um mecanismo de regulação de factores de virulência usado por *S. pneumoniae*, cuja importância em infecções no Homem está ainda por esclarecer. O segundo, diz respeito à estrutura da população responsável por infecções invasivas antes e depois da disponibilização em Portugal da vacina 7-valente.

a) Recentemente foi descrita a variação de fase nos pneumococos. Segundo o modelo proposto o pneumococo pode reverter espontaneamente entre a forma opaca e a transparente. As formas transparentes têm sido associadas a uma colonização mais eficiente em oposição às opacas, enquanto que as formas opacas são as únicas capazes de causar bacteriemia persistente num modelo murino. A maioria destas experiências foram restritas a apenas algumas estirpes com um contexto genético desconhecido e expressando apenas 6 dos 91 tipos capsulares reconhecidos nos pneumococos. Estas observações não esclarecem se a variação de fase é um fenómeno restrito a alguns serótipos ou perfis genéticos ou se é uma propriedade de todos os pneumococos.

Se a variação de fase fosse uma propriedade restrita a alguns clones isso poderia explicar o seu sucesso epidemiológico. De modo a resolver esta questão, estudou-se a variação de fase numa colecção diversificada de estirpes causadoras de infecções invasivas previamente caracterizadas quanto ao serótipo e perfil genómico.

Foram analisadas 304 estirpes responsáveis por infecções invasivas que expressavam os 10 serótipos mais prevalentes. A visualização do fenótipo foi feita recorrendo a uma lupa diascópica, através da passagem de luz oblíqua num meio transparente. Verificou-se que a maioria (52,0%) das estirpes responsáveis por infecções invasivas eram opacas e apenas 26,0% eram transparentes, o que está de acordo com a variação de fase ter um papel na infecção pneumocócica no Homem. Por outro lado, observou-se uma notória diferença na prevalência de cada fenótipo em cada serótipo. Por isso tentou-se estabelecer uma associação entre o serótipo e a opacidade, estimando o “odds ratio” empírico, com referência a todos os outros serótipos,

específico para cada serótipo e um intervalo de confiança de 95%. Observou-se que os serótipos 1, 4 e 23F estavam mais associados ao fenótipo opaco do que o espectável, enquanto os serótipos 3 e 14 estavam mais associados ao fenótipo transparente. Esta associação pode, em parte, explicar as diferenças epidemiológicas observadas entre os serótipos, como a preferência para colonizarem a nasofaringe ou para serem mais frequentemente isolados de casos de infecção invasiva.

De acordo com o esperado, a frequência de transição de fase variou de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ , entre o fenótipo opaco, transparente e intermédio. Nas experiências sobre a estabilidade dos fenótipos, garantiu-se a manutenção do fenótipo dominante no crescimento e nas passagens laboratoriais *in vitro*.

Estabeleceu-se a variação de fase num modelo murino de infecção. Neste modelo observou-se que os pneumococos recuperados do sangue dos ratinhos, que morreram de infecção pneumocócica, apresentaram sempre o fenótipo opaco, independentemente do fenótipo previamente administrado. Isto comprovou que, neste modelo, os variantes opacos são mais bem sucedidos a causar bacteriémia do que os transparentes.

De modo a relacionar a presença de certas proteínas de superfície com opacidade quantificou-se a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase e verificou-se que a maioria dos variantes transparentes tinham uma maior actividade desta enzima do que os opacos.

Todos estes resultados indicam um papel da variação de fase na infecção pneumocócica e sublinham a importância deste fenómeno no ciclo de vida dos pneumococos.

**b)** A elevada incidência de infecções invasivas em crianças com menos de dois anos de idade, bem como a maior frequência de resistência aos antimicrobianos, associada à rápida dispersão de alguns clones, levou à necessidade de uma monitorização contínua da epidemiologia de *S. pneumoniae*.

A vacina conjugada 7-valente, recomendada para crianças com menos de dois anos de idade, foi introduzida em Portugal em 2001. O número limitado de serótipos presentes nesta vacina é expresso pela maioria das estirpes resistentes aos antimicrobianos. De modo a avaliar os efeitos causados pela implementação da vacina na estrutura genética da população pneumocócica causadora de infecções invasivas, determinaram-se os serótipos, a susceptibilidade aos antimicrobianos e a distribuição das linhagens genómicas das estirpes isoladas de 2004 a 2005. Os resultados foram comparados com os dados das estirpes isoladas entre 1999 e 2002 e com os dados disponíveis no laboratório referentes às estirpes isoladas no ano 2003.

As alterações na estrutura genética da população pneumocócica ocorreram sobretudo desde 2003. Tal como noutros países, após a introdução da vacina, verificou-se uma redução de casos de infecção invasiva causados pelos serótipos da vacina e um aumento de casos causados por serótipos menos comuns não cobertos pela vacina.

Entre os dois períodos de estudo observou-se que os serótipos da vacina 4, 14 e 23F, diminuíram de frequência, enquanto que os serótipos não incluídos na vacina 3, 7F e 19A aumentaram.

A vacinação levou à diminuição da potencial cobertura da vacina 7-valente de 63,2% (1999 a 2002) para apenas 28,6% (2004 e 2005), em crianças com menos de dois anos. Isto deveu-se, sobretudo, à prevalência do serótipo 19A que representava 37,1% das estirpes isoladas deste grupo etário entre 2004 e 2005. A potencial cobertura da vacina 23-valente permaneceu elevada, acima dos 80% em todos os grupos etários.

Um efeito positivo foi a redução da resistência à penicilina entre os dois períodos de estudo. A não susceptibilidade à penicilina decresceu de 43,9% (1999 a 2002) para 30% (2004 e 2005), em crianças com idade < 6 anos, e atingiu 17,5% na totalidade das estirpes analisadas (2004 e 2005). Isto deveu-se à redução na prevalência dos serótipos 6B, 14 e 23F anteriormente associados com a não susceptibilidade à penicilina.

Contudo, a resistência à tetraciclina aumentou de 7,1% para 12,8% e a resistência aos macrólidos aumentou de 9,4% para 15,1%, entre os dois períodos de estudo, na totalidade das estirpes analisadas. Em estirpes não susceptíveis à penicilina a multiresistência, relacionada com a resistência à tetraciclina e aos macrólidos, quase duplicou em crianças e adultos, atingindo valores próximos de 50%. O serótipo 19A passou a ser o mais frequente entre estirpes com o fenótipo MLS<sub>B</sub> e M e a resistência à tetraciclina apareceu pela primeira vez em estirpes com o fenótipo M isoladas em 2004 e 2005.

O impacto da introdução da vacina conjugada em Portugal levou a uma alteração na composição clonal da população pneumocócica, caracterizada pelo aparecimento de 15 novas linhagens, desde 2003, e pelo aumento na prevalência de clones já estabelecidos expressando serótipos incluídos e não incluídos na vacina.

Os resultados indicaram que fenómenos de troca capsular não foram frequentes pelo que a vacinação levou a uma menor importância de certos clones reconhecidos pela PMEN. Os clones Spain<sup>6B</sup>-2, Spain<sup>9V</sup>-3 (9V e 14), Colombia<sup>23F</sup>-26 e Spain<sup>23F</sup>-1 (19A) diminuíram de frequência entre 1999-2002 e 2004-2005. No entanto, estes clones continuam a agregar uma grande parte das estirpes resistentes aos antimicrobianos.

Em conjunto, estes resultados sobre o impacto da implementação da vacina 7-valente em Portugal apontam para uma redução num curto prazo, dos potenciais benefícios da vacina.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*, estirpes causadoras de infecções invasivas, variação de fase, variantes transparentes e opacos, vacina conjugada heptavalente, serótipos, resistência aos antimicrobianos, linhagens genéticas.

## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a potentially pathogenic bacterium that can live commensally in the nasopharynx of asymptomatic carriers or can cause invasive and non invasive infections in the human host. Pneumococcal infections are responsible for a high frequency of morbidity and mortality, especially in children less than two years old.

Due to the importance of this bacterium and its different interactions with the host, two aspects of its biology were studied. The first was phase variation, a mechanism used by *S. pneumoniae* to adapt to a colonization or infection lifestyle. Secondly, the structure of the population responsible for invasive infections before and after the availability of the 7-valent conjugate vaccine was compared.

a) Recently phase variation in the pneumococcus was documented. The current model predicts that pneumococci can spontaneously revert between the opaque and transparent form. The transparent forms were associated with a more efficient colonization of the nasopharynx, while only the opaque forms are capable of causing persistent sepsis on a murine model of infection. Most of these experiments were restricted to only a few isolates of unknown genetic background and expressing only 6 of the 91 different serotypes recognized in pneumococcus.

This raises the question of whether phase variation is restricted to only a few serotypes or genetic backgrounds or is a general property of pneumococci. If phase variation was a restricted property of only a few clones, this could explain their epidemiological success. In order to address this issue we proposed to analyse this phenomenon on our collection of invasive isolates with characterised serotypes and genetic profiles.

304 invasive isolates expressing the 10 most prevalent serotypes were analysed. The phenotype was visualised by using a stereomicroscope under oblique transmitted illumination on a transparent medium. Most (52.0%) invasive isolates were opaque and only 26.0% were transparent, supporting a role for phase variation in human pneumococcal infections. On the other hand, it was observed a striking difference on the prevalence of each phenotype among serotypes. Therefore, we tried to establish an association between serotype and opacity, estimating serotype specific empirical odds ratio and 95% confidence intervals, by reference to all other serotypes. We observed that serotypes 1, 4 and 23F presented a higher association with opaque phenotype than expected, while serotypes 3 and 14 were more associated with the transparent phenotype. This association could help explain the epidemiological differences

observed among serotypes, such as a preference to colonize the nasopharynx or to be frequently found causing invasive disease.

As expected, the transition frequency ranged from  $10^{-3}$  to  $10^{-6}$  per generation, between the opaque, transparent and intermediate phenotype. The experiments regarding phenotype stability guaranteed the maintenance of the dominant phenotype in *in vitro* growth and laboratory passages.

We established phase variation on a murine model of infection. On this model, we observed that pneumococcus recovered from blood of mice that died of pneumococcal infection, were always opaque, independently of the phenotype previously injected. This indicates that, in this model, the opaque variants are more efficient in causing invasive infection than transparents.

In order to associate the presence of certain surface proteins with opacity we quantified the activity of the enzyme  $\beta$ -galactosidase and verified that most transparent variants had a higher  $\beta$ -galactosidase activity than opaque variants.

Together these results supported a role of phase variation in pneumococcal infections and highlighted the importance of this phenomenon in the pneumococcal life cycle.

**b)** The high incidence of invasive diseases in children less than two years old, and of antibiotic resistance, associated to the rapid spread of some clones of *S. pneumoniae*, justifies the importance of a continuous monitoring of the epidemiology.

The 7-valent conjugate vaccine, recommended for children with less than two years old, was introduced in Portugal in 2001. The limited number of serotypes present in this vaccine is expressed by most antibiotic resistant isolates. In order to evaluate the effects caused by the introduction of the vaccine on the genetic structure of the invasive pneumococcal population, the serotypes, antimicrobial susceptibility and genomic lineages were determined for the strains isolated from 2004 and 2005. These results were compared to the ones obtained with the strains isolated from 1999 to 2002 and to the data of the isolates recovered in 2003.

Changes on the genetic structure of pneumococcal population were documented mostly since 2003. As already happened in other countries after vaccine introduction, there was a decrease of cases of invasive disease caused by vaccine serotypes and an increase of cases of invasive disease caused by less common non-vaccine serotypes.

Between the study periods we observed that the frequency of serotypes 4, 14 and 23F decreased and the frequency of non-vaccine serotypes 3, 7F and 19A increased.

Vaccination led to a decrease of the potential coverage of the 7-valent vaccine from 63.2% (1999 to 2002) to only 28.6% (2004 and 2005), in children less than two years. This happened

mainly due to the prevalence of the 19A serotype, which accounted for 37.1% of the isolates recovered in this age group from 2004 and 2005. The potential coverage of the 23-valent vaccine remained high, up to 80% among all age groups.

One positive effect was the reduction of penicillin resistance between the study periods. Penicillin non-susceptibility decreased from 43.9% (1999 to 2002) to 30% (2004 and 2005), in children younger than 6 years old, and reached 17.5% when considering all isolates (2004 and 2005). This happened due to a decrease of serotypes 6B, 14 and 23F previously associated to penicillin non-susceptibility.

However, tetracycline resistance increased from 7.1% to 12.8% and macrolide resistance increased from 9.4% to 15.1%, between the two study periods, when considering all isolates analysed. Among penicillin non-susceptible isolates, multiresistance related to tetracycline and macrolide resistance, almost doubled in children and adults, reaching values close to 50%. Serotype 19A became the most frequent serotype among phenotype MLS<sub>B</sub> and M isolates and tetracycline resistance was observed for the first time in phenotype M isolates recovered from 2004 to 2005.

The introduction in Portugal of the conjugate vaccine led to an alteration of the clonal composition, which was characterized by the appearance of 15 new lineages, since 2003, and by the increase of clones already established expressing vaccine and non-vaccine serotypes.

The results indicated that capsular switching was not widespread and that certain clones recognized by PMEN did not persist in the population. The frequency of clones Spain<sup>6B</sup>-2, Spain<sup>9V</sup>-3 (9V and 14), Colombia<sup>23F</sup>-26 e Spain<sup>23F</sup>-1 (19A) decreased between 1999-2002 and 2004-2005. However, these clones still aggregate a high number of antimicrobial resistant isolates.

Together, the results on the impact of the introduction of the conjugate vaccine in Portugal, point to an attenuation in a short time period of the potential vaccine benefits.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, invasive strains, phase variation, transparent and opaque variants, heptavalent conjugated vaccine, serotypes, resistance to antimicrobials, genetic lineages.



# **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO**



## CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

### Breve história da descoberta de *S. pneumoniae*

A bactéria a que este trabalho faz referência foi isolada no final do século XIX e, posteriormente, associada a infecções no Homem. Esta descoberta teve repercussões na saúde pública pois permitiu a aplicação de soros anti-pneumocócicos no tratamento da pneumonia. Com a implementação dos antimicrobianos contra estas infecções, menosprezou-se o potencial patogénico da bactéria. Mais tarde, com o aparecimento de estirpes<sup>1</sup> resistentes aos antimicrobianos surgiu a necessidade de melhor conhecer os seus mecanismos de patogenicidade. Hoje, com métodos laboratoriais mais eficazes no estudo dos microrganismos e com o advento da sequenciação do genoma, a investigação em *S. pneumoniae* é cada vez mais completa tendo sido publicados mais de 18.000 artigos sobre esta bactéria em revistas internacionais.

#### A designação *Diplococcus pneumoniae*

Nesta tese, por questão de simplificação, vamos designar por pneumococos a bactéria *Streptococcus pneumoniae*. Originalmente foi denominada de *Diplococcus pneumoniae* devido à sua capacidade de formar pares (Diplo) de cocos (coccus) em meio sólido e à sua propensão para se alojar nos pulmões causando pneumonia. Apenas em 1974 passou a ser formalmente designada de *Streptococcus pneumoniae* por se verificar uma grande semelhança com outras bactérias do género *Streptococcus* ao nível do ADN.

#### Associação entre pneumonia e *S. pneumoniae*

A infecção pneumónica era conhecida desde a civilização Grega, nomeadamente por Hipócrates. Porém, apenas na era moderna e a partir da descoberta da auscultação em 1819, deram-se alguns avanços na compreensão desta infecção. Em 1889 Townsend e Coolidge do

---

<sup>1</sup> No presente trabalho a palavra estirpe é utilizada para referir cada microrganismo isolado num produto biológico.

Hospital Geral de Massachusetts descreveram 1000 casos de pneumonia analisados durante 68 anos nesse Hospital. A mortalidade era bastante elevada, atingindo os 25%. Os registos de temperatura corporal iniciaram-se em 1864 e, nesse período, Redtenbacher em Viena de Áustria descreveu mais um importante sintoma associado à pneumonia lobar ampliando o conhecimento sobre a doença mas não sobre a sua causa (Austrian, 1999).

O conhecimento da etiologia do pneumococo surgiu mais tarde com o primeiro isolamento do pneumococo, em 1880, por George Miller Sternberg nos Estados Unidos e simultaneamente por Louis Pasteur em França (Austrian, 1999). O primeiro isolamento do pneumococo aconteceu de maneira peculiar: Sternberg inoculou a sua própria saliva em coelhos e Pasteur inoculou coelhos com saliva dum criança que tinha falecido de raiva. (Henrichsen, 1999).

Pouco tempo depois, em 1882, Friedlander fez o primeiro reconhecimento em pulmões seccionados e corados pela técnica Gram do que certamente eram pneumococos. Finalmente, em 1886, o Austríaco Weichselbaum conseguiu estabelecer que o pneumococo era a bactéria mais frequentemente responsável pela pneumonia lobar (Austrian, 1999).

### **Descoberta de diferentes tipos de pneumococos**

A descoberta de diferentes tipos de pneumococos ocorreu em 1897 quando os investigadores franceses Bezançon e Griffon detectaram, com o uso de soro de coelho, diferenças nas reacções de aglutinação de vários pneumococos (Henrichsen, 1999). Esta constatação contribuiu para valorizar a superfície pneumocócica como região de interface com o hospedeiro.

Neufeld na Alemanha (1900) descobriu o efeito lítico da bÍlis nos pneumococos, ainda usado na actualidade para a sua identificação laboratorial. Em 1902 descreveu a reacção de Quellung actualmente usada para a determinação dos tipos capsulares. Estes avanços contribuíram para a identificação de pneumococos e para a delineação dos tipos capsulares 1 e 2 por Neufeld e Händel em 1910 (Austrian, 1999a).

Neste mesmo ano, Neufeld e Häendel, obtiveram soros monovalentes imunizando coelhos, burros e cavalos com pneumococos isolados de doentes com infecção pneumónica (Henrichsen, 1999). Estes trabalhos conduziram ao desenvolvimento de um programa de tratamento da pneumonia com os soros apropriados com importantes repercussões na saúde pública.

Em 1913, Dochez e Gillespie no Instituto Rockefeller, ao trabalhar com a sua colecção e com a de Neufeld e Händel, dividiram os pneumococos em quatro categorias (I a IV) numa tentativa de classificar os diferentes tipos de pneumococos. Também nesse ano Lister estudou a opsonização de pneumococos isolados de trabalhadores nativos da África do Sul usando soro de doentes com pneumonia. O trabalho de Lister levou à divisão dos pneumococos em cinco grupos

(A a E). Este sistema de classificação, embora com categorias distintas às do proposto por Dochez e Gillespie, era comparável ao anterior.

Depois destas primeiras tentativas de classificação surgiram grandes progressos na serotipagem dos pneumococos.

Em Nova Iorque (1921 a 1932) Cooper e a sua equipa estabeleceram 32 tipos de pneumococos pelo método de aglutinação usando soro monovalente de coelho e cavalo.

O conjunto de esforços no estudo desta bactéria, que mostrou ser muito diversa, conduziram à continuação do tratamento contra a pneumonia pneumocócica até ao final da era pré-antibiótica (Henrichsen, 1999). O surgimento dos antibióticos alterou radicalmente o modo de tratamento das pneumonias e de outras infecções causadas por pneumococos. O aparecimento das sulfonamidas e, em meados dos anos 40, da penicilina, inicialmente totalmente eficazes no tratamento destas infecções, fez desvalorizar o potencial patogénico da bactéria até ao advento da resistência aos antimicrobianos.

Na Europa, a Dinamarca foi o único país onde se praticou terapêutica com soro de coelho para tratar pneumonia lobar pneumocócica. Os tratamentos decorreram desde 1937 e só terminaram após a época pós-antibiótica (Henrichsen, 1999).

Depois da descrição de 32 tipos de pneumococos feita por Cooper, Kauffman e a sua equipa descreveram novos tipos e propuseram agrupar tipos proximamente relacionados, tais como o grupo 19 que inclui os tipos 19F, 19A, 19B e 19C. Um ano mais tarde Walter e a sua equipa descreveram 17 novos tipos e passaram a designar certos tipos capsulares como subtipos. Em 1954, Kauffman e Lund sugeriram que a nomenclatura Dinamarquesa deveria ser reconhecida internacionalmente para a tipagem de pneumococos, mas apenas em 1980 a sugestão novamente apresentada por Henrichsen foi aceite (Henrichsen, 1999).

## **Identificação laboratorial e classificação de *S. pneumoniae***

Uma das funções de um laboratório de Microbiologia no contexto hospitalar é o auxílio ao clínico no diagnóstico e tratamento eficaz dos doentes. Para isso identificam-se os germes patogénicos nas amostras dos doentes e realizam-se os ensaios necessários ao diagnóstico laboratorial de infecções e à sua investigação epidemiológica.

### **Ensaio realizado para a identificação laboratorial**

A identificação laboratorial de uma estirpe suspeita de ser *S. pneumoniae* é geralmente efectuada com a ajuda de um ou mais ensaios complementares. O primeiro passo no diagnóstico laboratorial de infecção por *S. pneumoniae* é a cultura e o isolamento do agente patogénico com o uso de um meio adequado (ex: Gelose Columbia com 5% de sangue de cavalo). Após 24 horas de crescimento a 35°C deve observar-se a presença da hemólise  $\alpha$ , característica de pneumococos e deve caracterizar-se a sua morfologia por microscopia. Simultaneamente podem-se examinar as preparações coradas pelo Gram. Após a identificação presuntiva do microrganismo executam-se testes bioquímicos, como a pesquisa de produção de catalase (que é negativa), susceptibilidade à etil-hidrocupreína (optoquina) e solubilidade em sais biliares ou desoxicolato (que promovem a lise da bactéria) (ver capítulo II) (Kellog *et al.*, 2001).

Embora os métodos convencionais descritos sejam os mais utilizados, começam a surgir métodos moleculares para a identificação de *S. pneumoniae*. Um deles baseia-se em sondas que detectam sequências únicas de rRNA. Testes adicionais, serológicos ou genotípicos, deverão ser usados para uma identificação definitiva (Murray *et al.*, 2002).

### **Importância do uso de vários ensaios**

O *S. pneumoniae* pertence à família *Streptococcaceae* da ordem *Lactobacillales* e faz parte do grupo viridans que inclui o *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus infantis* e *Streptococcus peroris*. A sua diferenciação deste grupo é convencionalmente feita com base na susceptibilidade à optoquina e a solubilidade ao desoxicolato.

Contudo estes ensaios nem sempre são suficientes. Na susceptibilidade à optoquina recomenda-se uma incubação em atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Um pequeno número de pneumococos, cerca de 8%, não cresce na ausência de 5% de CO<sub>2</sub>, os outros que são susceptíveis à optoquina em condições de incubação em ar também o são a 5% CO<sub>2</sub> (Arbique *et al.*, 2004). Recentemente foi identificada uma nova espécie do género *Streptococcus*, o *Streptococcus pseudopneumoniae*, que é susceptível à optoquina (diâmetro da zona de inibição do crescimento maior ou igual a 14 mm) quando é incubado numa atmosfera com níveis de CO<sub>2</sub> ambientais mas é resistente à optoquina (diâmetro menor que 14 mm) quando é incubado a 5% CO<sub>2</sub> e é insolúvel à bilis (Arbique *et al.*, 2004). Ou seja, em condições de incubação em ar tanto o *S. pneumoniae* como o *S. pseudopneumoniae* são susceptíveis à optoquina. O aparecimento desta nova espécie veio reforçar a importância de se recorrer a vários ensaios para a identificação de *S. pneumoniae*.

Um desses ensaios recentemente proposto combina a amplificação do gene *lytA* e a sua digestão com a enzima *BsaAI* e separação por electroforese. Todos os pneumococos produzem perfis de restrição típicos do gene que os distinguem dos perfis dos outros *Streptococcus* (Llull *et al.*, 2006).

## Características morfológicas e culturais de *S. pneumoniae*

### Morfologia das células em meio líquido e sólido

Em meio líquido *S. pneumoniae* replica-se em cadeias (Musher, 2000) e as suas células adquirem uma forma lanceolada com um diâmetro que varia entre 0,5 e 1,2  $\mu\text{m}$  (Murray *et al.*, 2002). Em meio sólido os cocos capsulados dão origem a colónias típicas morfológicamente redondas e translúcidas, lisas ou mucóides, com diâmetro de 1,0 a 3,0 mm. As colónias de cocos não capsulados são mais pequenas e rugosas e as mais capsuladas, como as do tipo 3 e 8, são maiores e mais mucóides. Em meio sólido as colónias exibem frequentemente um sulco central causado pela rápida autólise parcial (Murray *et al.*, 2002). Têm tendência a perder a cápsula por subcultura repetida, tornando-se os cocos mais arredondados e com cadeias mais curtas.

### A presença da cápsula polissacarídica

A maioria das estirpes de *S. pneumoniae*, isoladas de doentes contêm uma cápsula externa em redor da parede celular. A cápsula é a camada mais espessa da célula e as estruturas químicas dos seus polissacáridos são específicas de cada um dos serótipos (de Velasco *et al.*, 1995). Há pelo menos 91 tipos de polissacáridos estruturalmente únicos que podem ser detectados por reacção com um soro específico. Recentemente foi descoberto o nonagésimo primeiro serótipo pertencente ao serogrupo 6, 6C (Park *et al.*, 2007).

De acordo com a bibliografia, as estirpes sem cápsula têm sido maioritariamente encontradas apenas em surtos de conjuntivite (Musher, 2000; Carvalho *et al.*, 2003). No entanto, é importante referir que uma pequena fracção de estirpes isoladas de doentes e de indivíduos saudáveis não são tipáveis e que isso se pode dever quer à inexistência de soros específicos quer ao facto dessas estirpes não produzirem cápsula.

### **Características culturais**

O pneumococo é nutricionalmente exigente sendo frequentemente cultivado em meios sólidos enriquecidos com sangue ou em meios líquidos com infusões tecidulares. O seu crescimento é estimulado por 5-10% de CO<sub>2</sub> na atmosfera de incubação, sendo classificado como uma bactéria anaeróbia facultativa (Murray *et al.*, 2002). A temperatura óptima de crescimento é 37°C.

O pneumococo produz pneumolisina ou  $\alpha$ -hemolisina, enzima que degrada parcialmente a hemoglobina num pigmento verde, com conseqüente formação dum halo verde em redor das colónias de pneumococos em placas de gelose sangue.

Não produz as enzimas catalase e peroxidase. A ausência destas enzimas limita o crescimento do *S. pneumoniae in vitro*, uma vez que o peróxido de hidrogénio não é degradado e a sua acumulação é tóxica para a bactéria (Murray *et al.*, 2002).

### **Ecologia de *S. pneumoniae***

A bactéria *S. pneumoniae* tem um ciclo de vida no hospedeiro humano onde reside como comensal na nasofaringe, revelando a sua patogenicidade quando penetra noutros nichos.

#### **O nicho ecológico – nasofaringe**

Esta bactéria pode ser encontrada no hospedeiro humano através da nasofaringe onde pode viver como comensal sem causar infecção. Estima-se que uma percentagem elevada de indivíduos, cerca de 40 a 70%, tem a nasofaringe colonizada por pneumococos (de Lencastre *et al.*, 1999; Bogaert *et al.*, 2004).

A flora microbiana da nasofaringe é complexa incluindo microorganismos não patogénicos (*Streptococcus* spp., *Prevotella* spp. e outras bactérias aeróbias e anaeróbias) e outros potencialmente patogénicos (*S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*) (Schrag *et al.*, 2000).

A nasofaringe humana é o único reservatório natural do pneumococo onde ele subsiste e através do qual se propaga para outros hospedeiros ou para outros nichos no mesmo hospedeiro.

### **Ocorrência em ratinhos**

Os ratinhos são os animais geralmente usados como modelos no estudo da colonização e infecção pneumocócica. Não são hospedeiros naturais do pneumococo mas quando são sujeitos artificialmente à infecção pneumocócica são susceptíveis a um número limitado de tipos capsulares. Deste modo os serótipos que causam com mais frequência infecção no homem não são necessariamente os mais virulentos nos modelos de experimentação animal (Briles *et al.*, 1992; Saeland *et al.*, 2000). Como recentemente se verificou o comportamento do pneumococo durante a infecção murina é diferente, uma vez que o ratinho não é um modelo adequado para se estudar a activação do sistema imune pela proteína C-reactiva (pCr) (Suresh *et al.*, 2006). Ou seja, nem sempre é possível extrapolar os resultados dos modelos de infecção para a infecção no homem e qualquer interpretação terá de ser muito rigorosa.

### **Aspectos epidemiológicos de *S. pneumoniae***

Apesar da colonização da nasofaringe ser mais frequente do que a infecção pneumocócica é assintomática e não deixa sequelas. Em oposição, as infecções podem causar a morte e, mesmo quando não são a causa de morte do hospedeiro, estar associadas a graves complicações.

#### **Factores de risco e incidência da colonização pneumocócica**

Demonstrou-se que os Índios e os aborígenes Australianos estão entre os indivíduos que apresentam níveis mais elevados de colonização da nasofaringe (Davidson *et al.*, 1994; Smith-Vaughan *et al.*, 2006). A idade é outro factor a ter em conta. A frequência de colonização nos adultos saudáveis é de 5 a 10% e em crianças saudáveis é maior, atingindo 20 a 40% (Regev-Yochay *et al.*, 2004) sendo este valor potenciado quando frequentam creches (40 a 70%) (Gray *et al.*, 1980; de Lencastre *et al.*, 1999).

A altura do ano é igualmente importante sendo que o número de indivíduos colonizados é maior no Inverno (Gray *et al.*, 1980).

As razões pelas quais parece haver condições preferenciais para o pneumococo colonizar a nasofaringe não são ainda completamente conhecidas. Podem contudo ser invocadas às características genéticas dos hospedeiros e a condições sócio-económicas diferenciadas, onde

vectores como o saneamento básico, o número do aglomerado familiar e o contacto interpessoal são preponderantes (Schrag *et al.*, 2000).

Nas crianças, o tempo médio de persistência de uma determinada estirpe é de 4 meses e no adulto de 2 a 4 semanas (Gray *et al.*, 1980; Musher, 2000).

Verificou-se que nas crianças a população de pneumococos na nasofaringe está em fluxo permanente, com uma estirpe a substituir outra continuamente. Esta observação foi demonstrada através de culturas seriadas de amostras retiradas da nasofaringe de crianças (Aniansson *et al.*, 1992; Garcia-Rodriguez e Fresnadillo, 2002). Acresce ainda que algumas crianças parecem estar colonizadas com duas ou mais estirpes em simultâneo (Sá-Leão *et al.*, 2002; St Sauver *et al.*, 2000).

### **Factores de risco na infecção pneumocócica**

Os indivíduos com maior risco de desenvolver infecção pneumocócica são as crianças, os idosos, os imuno-comprometidos e os que pertencem a grupos de risco (esplenectomizados, doentes com insuficiências orgânicas crónicas, drepanocitose) (CDC, 1997; WHO, 1999; Whitney *et al.*, 2001). Outro factor de risco é uma prévia infecção pelo vírus influenza, que pode facilitar a aderência às células epiteliais da traquias mediada pela neuraminidase vírica que degrada o ácido siálico dos glicolípidos. Esta enzima pode facilitar a infecção, expondo estruturas que funcionam como receptores bacterianos (de Velasco *et al.*, 1995). É também conhecido o efeito da exposição ao tabaco no incremento da colonização particularmente nas crianças e nas mães (Greenberg *et al.*, 2006).

Os factores até agora conhecidos, que determinam se o pneumococo vai permanecer confinado à nasofaringe ou causar infecção, são a susceptibilidade do hospedeiro na altura da colonização e a virulência da estirpe (de Velasco *et al.*, 1995). Após a colonização nasofaringea, a infecção surge quando as barreiras naturais estão debilitadas, nomeadamente quando falham as defesas específicas (Imunoglobina A secretora) e as não específicas como a tosse, secreção mucosa e o transporte ciliar no tracto respiratório. Todas estas perturbações podem facilitar o acesso do pneumococo aos brônquios e pulmões (de Velasco *et al.*, 1995).

Embora a colonização da nasofaringe pelos pneumococos seja mais comum do que as infecções pneumocócicas é importante conhecer os mecanismos de patogenicidade que levam ao aparecimento de infecção de modo a evitar a morbidade e mortalidade associadas.

### **Incidência e mortalidade associada à infecção pneumocócica**

Todos os anos nos Estados Unidos da América (EUA) verificam-se cerca de 7 milhões de casos de otite média, 500 mil de pneumonia, 50 mil de bacteriemia e 3 mil de meningite atribuídos a *S. pneumoniae* (CDC, 1997).

Nas crianças, a nível mundial, os pneumococos são os agentes patogénicos que mais frequentemente causam pneumonia, bacteriemia, sinusite e otite média (CDC, 2000). A incidência mais elevada de infecção pneumocócica invasiva ocorre em crianças com menos de dois anos de idade.

Reportando ao ano de 1998 nos EUA, a incidência estimada de infecções invasivas pneumocócicas entre crianças com menos de dois anos foi de 368/100.000 habitantes, enquanto que em indivíduos com idade compreendida entre os 2 e os 65 anos e superior a 65 anos foi de 24/100.000 e 61/100.000 habitantes, respectivamente (CDC, 2000). Nos EUA a manifestação mais frequente de infecção invasiva pneumocócica entre as crianças é a bacteriemia oculta, atingindo cerca de 70% dos casos de infecção invasiva em crianças com menos de dois anos (CDC, 2000).

Estima-se que os pneumococos são responsáveis pela morte de mais de um milhão de indivíduos por ano. A mortalidade associada à bacteriemia e à meningite é maior nos extremos de idade. Nos idosos a mortalidade provocada por bacteriemia chega a atingir os 60% e por meningite os 80% (Orihuela e Tuomanen, 2006).

O *S. pneumoniae* também é responsável por infecções de gravidade mais moderada, causando quer pneumonia adquirida na comunidade quer otite média aguda quer ainda sinusite, sobretudo em crianças (CDC, 2000). Verificou-se que nos EUA aos doze meses de idade cerca de 62% das crianças já tiveram, pelo menos, um episódio de otite média aguda que é também a razão mais frequente de consultas ao pediatra.

Embora as complicações graves da otite média aguda sejam raras, esta infecção está na base da prescrição de grande parte dos antimicrobianos durante a infância (CDC, 2000).

### **Estabelecimento da infecção pneumocócica**

Os factores que determinam o aparecimento da infecção pneumocócica são usualmente a susceptibilidade do indivíduo e a virulência das estirpes. Há duas grandes questões em avaliação

no estudo das infecções causadas por *S. pneumoniae*: a maior susceptibilidade que alguns indivíduos demonstram e a determinação da virulência das estirpes. Estas questões vão ser abordadas ao longo deste estudo onde também se referem trabalhos que apontam no sentido de o tipo de polisacárido capsular ser um factor determinante da colonização e infecção.

### **Origem das infecções pneumocócicas**

O *S. pneumoniae* é o agente etiológico de infecções que resultam da transição do pneumococo da nasofaringe para o ouvido interno, pulmões, corrente sanguínea e cérebro. A dispersão do pneumococo de indivíduo para indivíduo dá-se através de aerossóis. Quando o hospedeiro está mais vulnerável devido a um factor interno (falha das barreiras naturais) ou externo (elevada virulência da estirpe) o pneumococo pode causar infecções invasivas potencialmente fatais ou infecções não invasivas.

Como exemplo de infecções invasivas tem-se a meningite, a bacteriémia febril e outras infecções em fluidos geralmente estéreis como o sangue, líquido cefalorraquidiano ou líquido pleural.

As infecções invasivas são menos comuns do que as não invasivas havendo uma relação inversa entre a severidade da infecção e a sua incidência. As infecções não invasivas são manifestações mais moderadas, como é o caso da otite média, da conjuntivite, bronquite ou sinusite.

### **Associação causal entre serótipos e infecção**

Têm sido realizados trabalhos com o objectivo de determinar a tendência de certos serótipos para causar colonização ou infecção, de relacionar o período de colonização com a propensão de determinado serótipo causar infecção invasiva e de estabelecer uma relação entre o seu potencial invasivo e a severidade das infecções.

Alguns exemplos de esses trabalhos são os seguintes:

Em 1999 comprovou-se que, apesar da grande diversidade de serótipos, apenas uma pequena fracção está associada à infecção. Demonstrou-se que as infecções em crianças entre os 2 e os 5 anos nos EUA são causadas por apenas alguns tipos capsulares. Entre estes serótipos encontram-se o 4, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F que são responsáveis por cerca de 80% das infecções neste grupo etário (Fiore *et al.*, 1999). No desenvolvimento desta investigação Porat *et al.* (2001) verificaram que há serótipos mais associados às infecções invasivas e outros à colonização. O estudo ocorreu em Israel com crianças dos 0 aos 12 anos nas quais a infecção invasiva é frequentemente associada a dois serótipos (1 e 5) que raramente são isolados de indivíduos

saudáveis. Em contraste os serótipos 6B e 23F estão associados à colonização da nasofaringe em crianças saudáveis e menos associados à infecção invasiva.

Crook *et al.* (2004) partiram da premissa que os serótipos fortemente associados à infecção invasiva raramente são isolados na nasofaringe porque permanecem pouco tempo nesse nicho por razões não totalmente esclarecidas. Estes serótipos teriam maior propensão para causar infecção invasiva, havendo assim uma relação inversa entre o período de colonização na nasofaringe e a propensão para causar infecção invasiva.

Estudos recentes de Brueggemann *et al.* (2003) e Sandgren *et al.* (2004) relacionaram os genótipos e serótipos de várias centenas de estirpes responsáveis por infecções invasivas e de colonização que foram isoladas de crianças, em Oxford, e em crianças e adultos, em Estocolmo. Ambos os estudos identificaram os serótipos 1, 4 e 7F como sendo os serótipos mais invasivos. Este conceito foi definido como a relação entre a frequência com que uma dada estirpe dum dado serótipo é transportada sem sintomas na nasofaringe e a frequência com que ela se torna invasiva. Porém segundo Sandgren *et al.* (2004) foram encontrados clones<sup>2</sup> do mesmo serótipo com diferente potencial invasivo e clones que expressavam diferentes serótipos, devido a troca capsular, com o mesmo potencial invasivo. Daí terem concluído que os serótipos bem como as restantes características clonais das estirpes são importantes marcadores da virulência.

Num novo estudo de Sjostrom *et al.* (2006), efectuado em adultos com infecção pneumocócica, os serótipos foram classificados de acordo com o seu potencial invasivo com a finalidade de se estabelecer uma relação entre esse potencial e a propensão para causar infecção mais ou menos severa. Os autores verificaram que os serótipos 1 e o 7F têm maior potencial invasivo e comportam-se como agentes patogénicos primários pois infectam principalmente indivíduos saudáveis, sendo que essas infecções não são muito severas e não causaram mortalidade.

Os serótipos 14, 9V, 4 e 18C têm potencial invasivo intermédio e os serótipos 3, 6A, 6B, 8, 19F e 23F têm potencial invasivo baixo. Ambas estas classes parecem ser mais oportunistas pois infectam principalmente indivíduos com infecção subjacente e causam infecções invasivas mais severas e um maior número de mortes.

Face a estes resultados o potencial invasivo parece estar mais associado à cápsula polissacarídica do que ao genótipo. Esta relação é consistente com os estudos de Brueggemann *et al.* (2003) no qual não se encontraram diferenças entre três linhagens do serótipo 1

---

<sup>2</sup> Segundo Dijkshoorn *et al.*, (2000) podem ser definidos como culturas isoladas independentemente de diferentes fontes, diferentes locais e possivelmente em diferentes alturas e que por partilharem várias características fenotípicas e genotípicas devem provir recentemente de um ancestral comum.

geograficamente distintas e de Brueggemann *et al.* (2004) onde não se detectaram diferenças temporais e geográficas no potencial invasivo de vários serótipos. Contudo, em outros trabalhos verificou-se que estirpes com o mesmo serótipo e diferente contexto genético podem ter potenciais invasivos diferentes, e estirpes com o mesmo contexto genético e diferentes serótipos podem ter a mesma capacidade para causar infecção, num modelo de infecção em ratinhos (Jefferies *et al.*, 2004). Estes resultados retiram a importância do serótipo e genótipo no potencial invasivo de *S. pneumoniae* e realçam a complexidade epidemiológica deste agente patogénico.

## **Abordagem do sistema imunológico do hospedeiro humano**

Este sub-capítulo dedica-se, genericamente, aos mecanismos de defesa do hospedeiro humano quando este interage com o *S. pneumoniae*.

### **Primeira colonização da nasofaringe**

Um artigo de revisão de Kilian *et al.* (1988) tenta explicar como se dá pela primeira vez a colonização temporária da nasofaringe nas crianças. Os autores abordam as bactérias comensais da nasofaringe e potencialmente patogénicas que produzem a protease da imunoglobina A1 como *Haemophilus influenzae* serótipo b, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*. A colonização temporária da nasofaringe resulta da indução concorrente dos anticorpos contra os antígenos da superfície bacteriana e dos anticorpos com acção neutralizante da actividade da protease. Como a imunoglobina não é degradada pela protease não se produzem fragmentos Fab que por sua vez não cobrem a superfície da bactéria de modo a protegê-la contra a acção do sistema imunitário. Num hospedeiro pela primeira vez exposto a estes agentes microbianos, a resposta imunitária confere protecção contra a infecção invasiva e contra as posteriores investidas pelas mesmas bactérias.

### **O aparecimento da infecção invasiva**

Em alguns indivíduos a colonização da nasofaringe é seguida de uma infecção invasiva provocada pela mesma bactéria. A susceptibilidade de alguns indivíduos à ocorrência da infecção invasiva resulta da pré-existência de imunoglobina A1 nas secreções contra os antígenos da superfície bacteriana. A produção destes anticorpos é induzida por um prévio contacto na mucosa com outros microrganismos não produtores da protease da imunoglobina A1. É de notar que neste prévio contacto não se produziram anticorpos contra a acção da protease. Deste modo

dá-se a proteólise da imunoglobina A1 e a bactéria liga-se aos fragmentos Fab o que lhe permite evitar a opsonofagocitose e posteriormente ultrapassar a barreira mucosa e causar infecção sistémica (Kilian *et al.*, 1988).

### **O papel da imunoglobina G na eliminação pneumocócica**

Os pneumococos produzem uma protease que os defende contra o sistema imunitário mas expressam outros factores como a fosforilcolina que é uma estrutura reconhecida por ele. Segundo Goldenberg *et al.* (2004) a imunoglobina G do subtipo G2 do soro humano tem um papel activo contra os pneumococos e outros microrganismos que expressam a fosforilcolina e que colonizam o tracto respiratório. Neste estudo verificou-se que os pneumococos que expressam os serótipos 14, 19F, 23F, 6A e 6B são mais susceptíveis à opsonofagocitose induzida pelo anticorpo G2 contra a fosforilcolina. Estes serótipos são precisamente os que causam grande parte de infecção invasiva em crianças, o que supõe que apesar de serem mais susceptíveis ao anticorpo G2 do que outros tipos capsulares possuem outros factores de virulência que lhes conferiram um maior sucesso adaptativo.

Nos variantes fenotípicos da mesma estirpe observou-se que os transparentes exibem uma maior susceptibilidade à opsonofagocitose do que os opacos (Goldenberg *et al.*, 2004), o que se pode dever à maior expressão de fosforilcolina e à menor de polissacárido capsular (Kim *et al.*, 1999). Esta susceptibilidade varia de estirpe para estirpe devido, possivelmente, à variação na expressão de fosforilcolina (Goldenberg *et al.*, 2004).

Pode-se concluir que a susceptibilidade do Homem ao *S. pneumoniae* deve-se não só à variação da expressão da fosforilcolina, mas também à variação individual na resposta da imunoglobina G2 e a deficiências neste anticorpo, que podem estar associadas a uma maior frequência de infecção pneumocócica.

### **Sistema do complemento**

O complemento faz parte do nosso sistema imunitário inato e tem três actividades fisiológicas principais: a defesa do hospedeiro contra a infecção, a interface entre a imunidade inata e adaptativa, aumentando as respostas dos anticorpos e a memória imunológica e a eliminação de desperdícios incluindo a eliminação das células apoptóticas e dos complexos imunológicos dos tecidos (Walport, 2001).

Há três vias de activação do complemento, a via clássica, alternativa e a via das lectinas. Os iniciadores da via clássica são os complexos imunológicos, as células apoptóticas, alguns vírus e bactérias Gram- e a proteína C reactiva ligada a um ligando através da fosforilcolina. Os iniciadores da via alternativa são bactérias, fungos, vírus e células tumorais. A via das lectinas é

iniciada por microrganismos com grupos de manose terminal (Walport, 2001). Ou seja o pneumococo inicia as três vias, sendo a via clássica e a alternativa as principais. Estas cascatas enzimáticas levam à clivagem do complemento C3. A pneumolisina liga-se à porção Fc da imunoglobina e activa a via clássica (Alcântara *et al.*, 1999) enquanto que os componentes da parede celular, libertados após a lise ou durante o “cell-wall turnover”, activam a via alternativa do complemento (Tuomanen, 2000).

A via clássica interage com a via alternativa ao nível do factor do complemento C3b formando uma única via composta pelos restantes componentes do sistema do complemento. A via clássica ocorre primariamente durante o reconhecimento imunológico do antigénio por um anticorpo específico (IgM, IgG) que expõe na porção Fc do anticorpo um local de ligação ao C1 (consiste no C1q, 2 moléculas de C1r e duas moléculas de C1s). Seguem-se uma série de activações e dissociações de factores do complemento até se formar o C3b. O anticorpo serve para despoletar a cascata enzimática e para guiar a deposição do complemento em locais específicos na membrana (Figueroa e Densen, 1991).

A via alternativa é despoletada pela ligação entre pequenas quantidades de C3b aos grupos hidroxilo de moléculas com estruturas químicas repetitivas como os polissacáridos, os lipopolissacáridos e o ácido teicóico e é activada pela baixa clivagem do C3 no plasma (Walport, 2001). É possível que os anticorpos possam facilitar a activação da via alternativa através de grupos funcionais ou porções de carboidratos da porção Fab de algumas subclasses de IgG. A C3 convertase formada pela via clássica ou alternativa converte o C3 em C3b. O C3b é um componente de ambas as vias e a sua geração promove a produção de mais C3b pela via alternativa. Este passo é importante uma vez que a opsonização bacteriana e a neutralização viral ocorrem através da deposição da opsonina C3b na superfície da bactéria. Durante o processo de opsonização as células fagocitárias expressam receptores que se ligam às opsoninas e acabam por promover a fagocitose. Entretanto dá-se a continuação da via do complemento com a formação de um complexo de ataque à membrana com actividade microbicida (Figueroa e Densen, 1991). A pCr encontra-se no soro e faz parte do sistema imunitário inato, a sua expressão pode aumentar cerca de mil vezes em resposta à inflamação (Szalai *et al.*, 1996). A pCr tem a capacidade de actuar como opsonina e quando interage com a superfície bacteriana tem a capacidade de activar o complemento pela via clássica através da interacção com o C1q (Gould e Weiser, 2002).

Os indivíduos com deficiências em qualquer das três vias do complemento exibem maior sensibilidade à infecção pneumocócica (Figueroa e Densen, 1991).

## **Acção patogénica de *S. pneumoniae***

Este sub-capítulo insere na maneira como o *S. pneumoniae* consegue contornar as barreiras defensivas do Homem, (abordadas no sub-capítulo anterior). A maior parte dos estudos foi efectuada em modelos murinos e tentam elucidar de que forma certos factores da superfície celular bacteriana e do hospedeiro estão envolvidos na adesão e progressão da infecção. Aspectos relacionados com o transporte intracelular através de vacúolos são, igualmente, descritos assim como os factores envolvidos na toxicidade celular.

### **A superfície celular na interacção com o hospedeiro**

A superfície celular do pneumococo medeia as trocas com o exterior e as propriedades adesivas da bactéria, influencia as interacções com factores imunológicos e participa no crescimento e divisão celular. É relevante a sua interacção com o hospedeiro pois a maior parte das proteínas expressas à sua superfície são importantes factores de virulência, essenciais para a sobrevivência da bactéria no seu hospedeiro.

A parede celular dos pneumococos contém fosforilcolina no ácido teicóico e no ácido lipoteicóico associado à membrana (Tomasz, 1967). À fosforilcolina estão ligadas, através de ligações não covalentes, um grupo de 15 proteínas de ligação à colina (CBPs) com diferentes funções (Garcia *et al.*, 1998). À parede celular para além das CBPs estão ligados mais dois grupos de proteínas identificáveis por diferentes motivos (Gosink *et al.*, 2000).

Na parede celular a fosforilcolina é uma estrutura essencial dado que promove a aderência do pneumococo às células do hospedeiro, o primeiro passo para a colonização da nasofaringe e eventual infecção do hospedeiro. O *S. pneumoniae* consegue aderir às células da nasofaringe humana através da fosforilcolina pois esta estrutura é reconhecida quer pelas adesinas bacterianas, como a proteína A de ligação à colina (CbpA), quer pelos receptores das células epiteliais do tracto respiratório (Murray, 2002; Orihuela e Tuomanen, 2006).

### **Factores que contribuem para a colonização da nasofaringe**

Os diversos factores que contribuem para a colonização da nasofaringe promovendo a adesão às células do hospedeiro são os seguintes:

### **As proteínas CBPs**

Os autores Gosink *et al.* (2000) concluíram que uma das principais funções da família das CBPs é a promoção da colonização da nasofaringe evidenciada num modelo de colonização em ratinhos. Esta família inclui as hidrolases LytA, LytB e LytC que são respectivamente uma amidase, uma glucosaminidase, que promove a separação das células no final da divisão celular, e uma lisosima (Garcia *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 1999a). Inclui todas as proteínas de ligação à colina como a CbpA, e a recentemente identificada esterase de colina CbpE (Vollmer e Tomasz, 2001) e a protease de serina CbpG cujo papel na patogenicidade tem sido estudado por Gosink *et al.* (2000) e Mann *et al.* (2006). Em 2005 foi ainda identificada uma proteína de ligação à fibronectina PavA localizada na superfície da bactéria e que fomenta a adesão às células num modelo murino (Pracht *et al.*, 2005).

### **A proteína HtrA**

A proteína HtrA é uma protease de serina induzida pela temperatura tendo como função facilitar a sobrevivência contra o stress (Sebert *et al.*, 2002; Orihuela *et al.*, 2004a). A proteína HtrA e a CbpA são das proteínas mais expressas durante a adesão pneumocócica (Orihuela *et al.*, 2004a).

### **A protease da imunoglobina A secretora**

Para o pneumococo aderir às células do hospedeiro tem, primeiramente, que inativar algumas glicoproteínas, que existem na superfície mucosa do hospedeiro e que incluem imunoglobinas, a proteína C-reativa, componentes do complemento e a lactoferrina (Hammerschmidt *et al.*, 1997; 1999; Smith e Hostetter, 2000). Estas glicoproteínas contêm ácido siálico terminal nas suas modificações, que reconhece o pneumococo e ao ligar-se a ele provoca a sua eliminação da via aérea. A inativação destas proteínas pode ser feita com recurso à proteólise e à desglicosilação.

Tomemos o caso das imunoglobinas. As imunoglobinas IgA1 (~90%) e IgA2 (~10%) constituem a classe de anticorpos mais comum na superfície mucosa da nasofaringe (Kirkeby *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2005). O pneumococo evita ser eliminado pela IgA1 produzindo a protease da imunoglobina A1 secretora, sIgA1 (Poulsen *et al.*, 1996; Wani *et al.*, 1996). Esta protease remove a porção Fc da imunoglobina A1 que é composta pelas duas cadeias pesadas do anticorpo (Kilian *et al.*, 1988) neutralizando a capacidade da imunoglobina agregar e opsonizar o pneumococo (Weiser *et al.*, 2003). Durante a proteólise da sIgA1 formam-se fragmentos Fab intactos que retêm a capacidade de se ligarem ao antigénio, mas como são monovalentes tornam-se incapazes de induzir a aglutinação. Estes fragmentos protegem a bactéria do sistema

imunitário porque ligam-se a epitopos na superfície da bactéria bloqueando o acesso das células imunocompetentes e dos anticorpos com o mesmo ou diferentes isotipos (Kilian *et al.*, 1988). Por outro lado não se sabe como é que o pneumococo evita o efeito bactericida da IgA2, uma vez que ela não é sensível à protease. Especula-se que será através do processo de deglicosilação uma vez que o IgA2 apresenta 4 locais de glicosilação (Mattu *et al.*, 1998).

Kilian *et al.* (1988) defendem que a elevada especificidade entre as proteases bacterianas pela imunoglobina A1 humana pode explicar o facto de o Homem ser o único hospedeiro naturalmente susceptível à infecção contra estas bactérias. Na nasofaringe as bactérias produtoras de protease da imunoglobina A1 são mais bem sucedidas do que as não produtoras desta protease, o que significa que a flora deste nicho é, em parte, regulada pela presença desta protease

De acordo com Weiser *et al.* (2003) os pneumococos ligam-se aos fragmentos Fab, hidrofóbicos e catiónicos, de forma a melhorarem as características adesivas da sua superfície hidrofílica e aniónica. A ligação da bactéria aos fragmentos Fab, após a acção da protease bacteriana, vai modular as propriedades físicas da superfície bacteriana. Esta modulação vai proporcionar um aumento da exposição da fosforilcolina à superfície do pneumococo facilitando a sua aderência ao receptor do PAF das células epiteliais do hospedeiro.

Os autores estabelecem que os pneumococos podem subverter a especificidade da imunoglobina A1 do sistema imunitário para promover a sua aderência às células do hospedeiro, requerendo para isso a acção das proteases (Weiser *et al.*, 2003).

### **A deglicosilação**

Recentemente verificou-se que o pneumococo expressa à sua superfície três exoglicosidases. Estas enzimas actuam sequencialmente nos três resíduos de açúcar que constituem a estrutura das proteínas glicoconjugadas e que são o ácido siálico, a galactose e a *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Este último está ligado a um resíduo de manose que fica exposto. A função das glicoproteínas é assim perdida ou alterada permitindo a ligação do pneumococo aos receptores das células epiteliais do tracto respiratório (King *et al.*, 2006). A deglicosilação também promove o aumento da susceptibilidade das glicoproteínas à proteólise (van Berkel *et al.*, 1995). As exoglicosidases são a neuraminidase A (NanA), a  $\beta$ -galactosidase (BgaA) e a *N*- $\beta$ -acetilglucosaminidase (StrH). Apesar da importância destas enzimas parece que nem todas as estirpes expressam a BgaA e a StrH (Clarke *et al.*, 1995; Zahner e Hakenbeck, 2000).

A NanA promove a desialilação das glicoproteínas que consiste na degradação da neuramina do ácido *N*-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico terminal (Zubay *et al.*, 1995) com

ligações  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6 à galactose deixando exposta a galactose. A BgaA é uma  $\beta$ -galactosidase, não envolvida no metabolismo da lactose como a maior parte das  $\beta$ -galactosidases (Zahner e Hakenbeck, 2000), que remove a galactose terminal  $\beta$ (1-4) da N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligada à manose. Finalmente a StrH elimina a GlcNAc terminal  $\beta$ 1-2 ligada à manose (King *et al.*, 2004; 2006).

Supõe-se que *S. pneumoniae* é uma espécie que usa a sua capacidade de manipular os açúcares para colonizar e invadir o hospedeiro humano. Um exemplo disso é o uso das exoglicosidases na manipulação dos açúcares nos glicoconjugados do hospedeiro de modo a fomentar a aderência às células.

### **A aderência ao tracto respiratório**

#### **Tracto respiratório superior**

Quando o pneumococo consegue evitar a acção das glicoproteínas do sistema imunitário do hospedeiro liga-se aos receptores na nasofaringe sialilados, provavelmente a N-acetilglucosamina ligada a um resíduo de galactose através duma ligação  $\beta$ 1-3 (GlcNAc $\beta$ 1-3Gal), pelas proteínas de ligação à colina (Tuomanen e Masure, 1997).

#### **Tracto respiratório inferior**

Pensa-se que o pneumococo atinge os pulmões através da dispersão de aerossóis desde a nasofaringe. Nos pulmões a bactéria liga-se às células epiteliais, pneumócitos, que cobrem o alvéolo. Do espaço alveolar, onde se fazem as trocas de gás com o sangue, a bactéria pode aceder facilmente à via sanguínea interagindo com as células endoteliais vasculares dos capilares alveolares (Cundell *et al.*, 1995).

No tracto respiratório inferior a situação pode ser diferente da do tracto superior devido principalmente à existência dum surfactante que cobre o espaço alveolar evitando o seu colapso. Durante o processo inflamatório a permeabilidade nos capilares alveolares aumenta e a proteína C-reativa entra no espaço alveolar e liga-se, através da fosforilcolina, ao maior componente lipídico do surfactante, ficando indisponível para se ligar à bactéria e a eliminar. Segundo Gould e Weiser (2002), o surfactante é responsável pelo bloqueio da actividade anti adesiva da proteína C-reativa podendo potenciar a aderência bacteriana ao tracto respiratório inferior.

No tracto respiratório superior o reconhecimento da fosforilcolina pela proteína C-reativa permite que esta se ligue aos pneumococos, eliminando-os da via aérea, enquanto que no tracto respiratório inferior a sua ligação ao surfactante e não à bactéria contraria a função bactericida da proteína. É razoável especular que qualquer agente etiológico bacteriano de pneumonia, que expresse fosforilcolina à sua superfície, como o *S. pneumoniae* e o *H. influenzae*, possam aderir

facilmente ao surfactante do espaço alveolar podendo potenciar a sua capacidade de causar infecção.

Na aderência às células pulmonares não activadas por um processo inflamatório, pneumócitos e células endoteliais vasculares, estão envolvidas duas classes de receptores que contêm N-acetil-D-galactosamina com uma ligação  $\beta$ 1-3 ou  $\beta$ 1-4 à galactose (GalNAc $\beta$ 1-3Gal e GalNAc $\beta$ 1-4Gal), respectivamente (Tuomanen e Masure, 1997).

Cundell *et al.* (1995a) estimularam os pneumócitos e as células endoteliais vasculares dos capilares dos alvéolos *in vitro* com citocinas<sup>3</sup> inflamatórias para observar o comportamento da bactéria na adesão. Verificaram que a estimulação pelas citocinas incrementa em 50% a aderência dos pneumococos. Este aumento está associado ao aparecimento de novos receptores GlcNAc e PAF, nos pneumócitos activados e nas células endoteliais vasculares activadas dos capilares dos alvéolos, com uma maior especificidade para reconhecerem os pneumococos (Cundell *et al.*, 1995a).

### **Factores de virulência implicados na infecção invasiva**

#### **Via sanguínea**

Para que ocorra, o transporte celular e a invasão, não basta o pneumococo aderir às células do hospedeiro. Está associado um mecanismo molecular que implica a activação do receptor PAF em diferentes células sujeitas a diferentes factores.

O acesso à via sanguínea faz-se, alternativamente ou em simultâneo, através da via linfática, da danificação de células epiteliais e endoteliais ou da invasão directa das células endoteliais. Segundo Cundell *et al.* (1995a) a invasão das células endoteliais depende da activação das células do hospedeiro pelos componentes da parede celular e da pneumolisina e que resulta na expressão do receptor do PAF e na activação de factores do sistema imunitário como o complemento.

Mais tarde Gould e Weiser, 2001 aferiram que neste local está também presente a proteína C-reactiva. Segundo os mesmos autores a proteína liga-se aos pneumococos através da fosforilcolina e conseqüentemente é responsável pela inibição parcial da ligação entre a bactéria e o receptor PAF (Gould e Weiser, 2002).

Quando a resposta imunitária é despoletada produzem-se proteínas chamadas opsoninas que medeiam a opsonofagocitose do pneumococo, ou seja a promoção da fagocitose por um

---

<sup>3</sup> Citocinas inflamatórias são proteínas libertadas por células do sistema imunológico como os linfócitos T, leucócitos e macrófagos, quando estimulados pela infecção bacteriana ou a inflamação. A sua função inclui entre outras a mediação da imunidade não específica ou específica inata, mediação da activação, diferenciação e crescimento de leucócitos (Zubay *et al.*, 1995).

anticorpo específico em combinação com o factor do complemento C3b. Contudo, o pneumococo tem uma maneira de se evadir à fagocitose através da estrutura do polissacárido capsular, considerado o maior factor de virulência do pneumococo. A evasão à fagocitose parece resultar dum bloqueio físico à opsonina devido à presença de átomos ou grupos de átomos que impedem a interacção da opsonina com os fagócitos. Este fenómeno pode dever-se ainda à carga negativa do polissacárido capsular que repele a aproximação dos leucócitos (Orihuela e Tuomanen, 2006). A evasão à fagocitose resulta também da inibição da via clássica do complemento particularmente pela proteína A de superfície, PspA, e da ligação entre a proteína A de ligação à colina, CbpA, ao factor C3 permitindo a sua degradação (Ren *et al.*, 2003; 2004).

A sobrevivência no sangue depende não só da evasão à fagocitose mas também do papel da proteína PspA, desta vez na protecção do pneumococo contra a apolactoferrina (Shaper *et al.*, 2004). A apolactoferrina é a forma sem ferro da glicoproteína lactoferrina, sendo que ambas se ligam à superfície dos pneumococos através da PspA (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Provavelmente a ligação da PspA a esta molécula bloqueia os locais da apolactoferrina responsáveis pela sua acção bacteriostática e bactericida (Shaper *et al.*, 2004). Esta glicoproteína pode ser bacteriostática devido, em parte, a formar várias ligações o ião  $Fe^{3+}$  desactivando-o, o que pode restringir o crescimento bacteriano. A sua acção bactericida está associada aos péptidos da região N-terminal da proteína que contêm elevadas concentrações de resíduos de carga positiva e, presumivelmente, destabilizam as membranas de carga negativa da bactéria (Zasloff, 2002). Naturalmente, os anticorpos contra a proteína PspA encontrados na mucosa da via aérea vão reduzir o número de PspA que se ligam a apolactoferrina e a lactoferrina e consequentemente a acção bactericida destas glicoproteínas é aumentada (Shaper *et al.*, 2004).

### **Líquido cefalorraquidiano**

A invasão do líquido cefalorraquidiano é consequência da invasão da corrente sanguínea, quer a partir da infecção dos seios perinasais, do ouvido médio ou dos pulmões, quer ulteriormente pela transposição da barreira hemato-encefálica. O mecanismo envolvido na passagem da barreira hemato-encefálica para o espaço subaracnóide, onde se encontra o líquido cefalorraquidiano, não está totalmente esclarecido. Teoricamente o local de entrada é o endotélio da barreira hemato-encefálica ou outros locais no cérebro onde a barreira não está completa. Após a passagem da barreira os pneumococos podem replicar-se dada a ausência de leucócitos, complemento e imunoglobina, ou seja de resposta imune. Eventualmente a bactéria lisa e os seus factores de virulência induzem a inflamação das meninges estimulando a libertação de citocinas (Orihuela e Tuomanen, 2006).

De acordo com Ring *et al.* (1998), na invasão do líquido cefalorraquidiano em células de ratinhos está apenas envolvido o receptor do PAF das células do endotélio e a sua ligação à proteína CbpA do pneumococo. Surpreendente é o facto do pneumococo ser cerca de duas vezes mais eficiente a invadir as células endoteliais cerebrais do que as células endoteliais periféricas como as dos capilares alveolares. A capacidade para invadir depende proeminentemente da presença e da quantidade de polissacárido capsular, sendo os variantes sem cápsula de estirpes causadoras de infecção cerca de 200 vezes menos invasivos que os variantes com cápsula (Ring *et al.*, 1998).

### **Factores de virulência que contribuem para a progressão da infecção invasiva**

A forma do pneumococo mais comum é a forma colonizadora da nasofaringe e permite a sua rápida propagação para outros hospedeiros. Com base nesta vantagem Orihuela *et al.* (2004b) propõem que todos os factores de virulência devem contribuir para a colonização da nasofaringe. O trabalho citado permitiu concluir que vários factores de virulência estudados num modelo de infecção murino têm um papel na promoção da colonização e na invasão celular (Figura 1),

Neste trabalho estudaram-se a enzima piruvato oxidase (SpbX) que catalisa a libertação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a pneumolisina (Ply), e também as já referidas CbpA, LytA, NanA e PspA. Verificou-se que estirpes com deficiência em qualquer destas proteínas, à excepção de PspA, têm uma reduzida capacidade de colonizar a nasofaringe de ratinhos no primeiro dia de inoculação destas estirpes mutantes. Apenas as proteínas SpxB e CbpA afectam a colonização prolongada da nasofaringe. Constatou-se ainda que quando a bactéria transita para o tracto respiratório inferior as proteínas actuantes são a CbpA e a NanA. As proteínas SpxB, Ply e LytA são as primeiras mediadoras da danificação celular nos pulmões e são necessárias para a replicação bacteriana neste local, contribuindo para a localização da bactéria nos pulmões e no sangue. Particularmente a Ply, é requerida para o desenvolvimento da pneumonia grave, e para a sobrevivência da bactéria no sangue. Por outro lado, a passagem para o líquido cefalorraquidiano requer a interacção específica entre a CbpA e o receptor PAF (Orihuela *et al.*, 2004b).

Relativamente à pneumolisina o seu efeito na virulência deve-se sobretudo à sua capacidade para formar poros tornando-se hemolítica. Esta característica está geralmente bem conservada em todos os serótipos. Contudo, as estirpes de uma dada linhagem do serótipo 1 produzem pneumolisina não formadora de poros o que incrementou a capacidade para colonizar o hospedeiro tornando-se menos invasiva (Kirkham *et al.*, 2006).

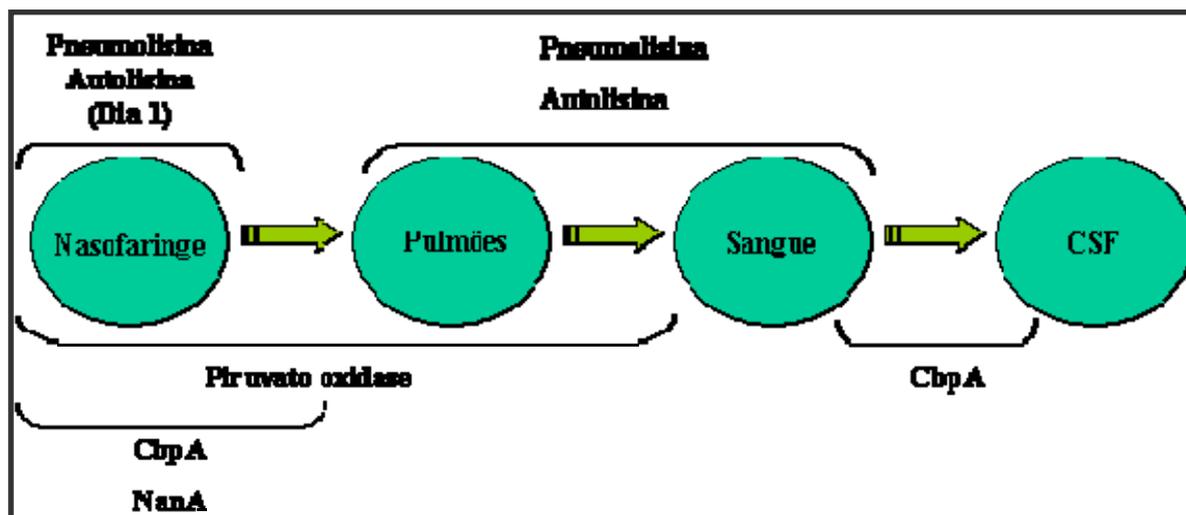


Figura 1

Contribuição dos factores de virulência de *S. pneumoniae* na progressão da infecção invasiva num modelo de infecção murino. Adaptado de Orihuela *et al.* (2004b).

De entre as proteínas que contribuem maioritariamente para a invasão das células do hospedeiro a PspA pode cooperar para a colonização nasal no ratinho num número limitado de estirpes (Briles *et al.*, 2005). Por exemplo, no serótipo 3 para a colonização da nasofaringe ocorrer é requerida a expressão da PspA, PspC e cápsula (Magee e Yother, 2001). Estudos recentes determinaram que a proteína CbpG é outra proteína que participa na colonização e invasão das células do hospedeiro (Mann *et al.*, 2006).

Outros factores como as proteínas PotD e a PsaR têm uma maior tendência para promoverem apenas a infecção. A proteína de superfície PotD é um transportador de poliaminas. As poliaminas interagem com os ácidos nucleicos e conseqüentemente têm um papel essencial na replicação e transcrição do ADN. A proteína demonstrou ter um papel mais significativo na infecção sistémica e pulmonar (Ware *et al.*, 2006). Em *S. pneumoniae* os genes *psaB*, *psaC* e *psaA* codificam para uma permease transportadora de  $Mn^{2+}$  e a sua regulação pelo PsaR é mediada pelo  $Mn^{2+}$ . Johnston *et al.* (2006) demonstraram que o pneumococo usa  $Mn^{2+}$  como sinal para modular a expressão de genes de virulência que têm diferentes impactos em diferentes locais do hospedeiro. A concentração de  $Mn^{2+}$  é cerca de 1000 vezes maior nas secreções mucosas do que no sangue ou pulmão, o que torna o  $Mn^{2+}$  num potencial sinalizador da transição entre a superfície mucosa para uma infecção invasiva. Tem também um papel primário na protecção contra o stress oxidativo. Na presença deste sinal a PsaR afecta negativamente a transcrição dos genes *psaBCA* e dos genes da ilha de patogenicidade dos pili *rrgA*, *rrgB*, *rrgC* e

*strBCD*, e *rlrA*. A regulação dos genes mediada pelo PsaR é requerida para o estabelecimento da pneumonia mas não para a colonização da nasofaringe (Johnston *et al.*, 2006).

### **Transporte intracelular através de vacúolos**

Os agentes patogénicos causadores de infecção invasiva desenvolveram estratégias para passarem por entre as células epiteliais e endoteliais ou para as atravessarem, destruindo a sua integridade. Um número pouco significativo destes agentes, como o *S. pneumoniae*, consegue mover-se eficientemente através das células, sem as danificar, recorrendo a vacúolos (Radin *et al.*, 2005).

O receptor do PAF, como já mencionado, é o receptor mais frequente do pneumococo ligando-se a este nos pulmões, sangue e no líquido cefalorraquidiano e está envolvido no transporte bacteriano dentro das células.

O receptor PAF pertence a uma família de receptores ligados à proteína de membrana G, e que quando se ligam aos pneumococos desencadeiam um processo que leva à endocitose do complexo formado. Resumidamente, este mecanismo desenrola-se de forma a que a ligação da bactéria ao receptor do PAF induza o movimento da proteína  $\beta$ -arrestina do citoplasma para a membrana plasmática (Chen *et al.*, 2002) de modo a esta constituir um complexo com o receptor do PAF. O complexo move-se, por sua vez, para uma região da membrana com vesículas forradas com a proteína clatrina formando-se um endossoma ou vacúolo (Ahn *et al.*, 2003). As vesículas endocitadas são recicladas na superfície apical da célula, saem pela superfície basal ou são destruídas no lisossoma. A progressão para um destes destinos requer a separação da  $\beta$ -arrestina do endossoma e o recrutamento de diferentes proteínas denominadas Rab (Dupre *et al.*, 2003). Estas proteínas são membros da super-família das GTPases e estão envolvidas na formação, mobilidade e fusão da vesícula. Radin *et al.* (2005) verificaram que a maior expressão de  $\beta$ -arrestinas diminui o recrutamento da proteína Rab que é responsável pela destruição da bactéria no lisossoma. Este resultado sugere que os pneumococos conseguem subverter as  $\beta$ -arrestinas de modo a que estas em vez de conduzirem a destruição do vacúolo o direccionem para o interior das células humanas, afim de serem reciclados, ou para o exterior das células.

Enquanto que o receptor do PAF é requerido para a aderência bacteriana, quer o receptor do PAF quer a  $\beta$ -arrestina são importantes para o transporte bacteriano dentro de vacúolos intracelulares podendo mediar a invasão (Radin *et al.*, 2005).

Embora o pneumococo se ligue a um grande número de epitélios endoteliais e respiratórios apenas 0,2 % do inóculo de *S. pneumoniae* move-se dentro de vacúolos nas células endoteliais activadas (Cundel *et al.*, 1995; Ring *et al.*, 1998).

### **Factores implicados na toxicidade celular**

Ao contrário de outros microrganismos, do mesmo género, como *S. pyogenes* que produz uma grande variedade de substâncias prejudiciais para os tecidos do hospedeiro, *S. pneumoniae* produz poucas toxinas entre as quais a pneumolisina e o peróxido de hidrogénio (Musher, 2000). Para além de causar directamente poucos estragos nas células do hospedeiro, o pneumococo não consegue permanecer viável mais do que poucas horas dentro das células humanas *in vitro* (Ring *et al.*, 1998).

A pneumolisina, como referido, produz poros sendo directamente tóxica em vários tipos celulares dos mamíferos como células epiteliais, endoteliais, do tecido pulmonar e células neuronais (Hirst *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2002).

O peróxido de hidrogénio, libertado pela acção da proteína SpbX, tem potencialmente um efeito tóxico nas células do hospedeiro que pode ser neutralizado pela catalase presente no sangue. Pode também ter um papel importante na colonização ao inibir o crescimento de outros microrganismos que se encontram no mesmo nicho ecológico.

## MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

### A variação de fase na patogenicidade de *S. pneumoniae*

No século XIX o incremento das ciências experimentais e a multiplicação das suas aplicações técnicas que daí resultam, fazem acreditar numa perspectiva de progresso inelutável. Assiste-se ao desenvolvimento de conceitos biológicos de fundamental importância, tais como o da teoria da evolução de Darwin, a teoria celular, as leis de Mendel, a origem microbiana das doenças infecciosas, para citar apenas alguns. O progresso da microscopia permitiu o desenvolvimento da microbiologia. Foi também durante o século XIX que se isolaram e identificaram as primeiras culturas de *S. pneumoniae* e se detectou a variação de fase na morfologia das suas colónias.

#### Breve história

A variação na morfologia das colónias dos pneumococos foi detectada primeiramente no século XIX por Kruse e Pansini e documentada posteriormente em 1934, simultaneamente por Dawson e Paul. Estes estudos baseiam-se em observações feitas com luz reflectida num meio opaco de gelose-agar. Actualmente o método de observação é diferente o que dificulta a comparação dos resultados.

As diferenças na morfologia das colónias chamaram a atenção dos investigadores devido à associação entre este fenótipo e a presença de cápsula e a virulência da estirpe (Paul, 1934; Austrian, 1953). De notar que as estirpes com cápsula e aparência lisa estavam associadas a uma maior virulência. Estudos sobre a variação intra-específica na variação morfológica, e o fenómeno de transformação natural dos pneumococos, foram efectuados por Avery, MacLeod e McCarty em 1944 e simultaneamente por Taylor e por Austrian e MacLeod em 1949 (Austrian, 1953). Estes estudos foram importantes porque a capacidade de adquirir e incorporar ADN de outra estirpe pode resultar na variação da morfologia da estirpe transformada.

Apesar dos variantes morfológicos dos pneumococos terem sido descritos por Arkwright em 1920, foi Griffith, em 1923, quem pela primeira vez os classificou em variantes lisos e rugosos (Quadro 1). Entretanto surgem várias classificações que pretendem agrupar a bactéria em categorias mais específicas. Contudo, a classificação de Dawson em 1934 causa alguma confusão quando nomeia lisas as estirpes que previamente estavam na categoria rugosas, e mucóides as que previamente estavam na categoria lisas. Todavia inclui uma terceira categoria de estirpes rugosas que mais tarde é nomeada de extremamente rugosas por Taylor e é mantida por Austrian e MacLeod.

A nomenclatura proposta por Austrian em 1953 define a variação morfológica com base na célula e não com base na aparência das colónias. Austrian classifica os pneumococos em formas filamentosas e não filamentosas, com ou sem cápsula. As formas filamentosas resultam das células que permanecem ligadas formando longas cadeias em meio líquido em vez de formarem células isoladas ou diplococos. O autor propõe quatro categorias que, à excepção das estirpes filamentosas e com cápsula, são comparáveis às classificações anteriores. As formas não filamentosas e capsuladas correspondiam às formas capsuladas de Austrian e MacLeod e às formas lisas de Griffith e Taylor. As formas não filamentosas e sem cápsula correspondiam às formas rugosas destes autores. As estirpes filamentosas e sem cápsula correspondiam à categoria rugosas de Austrian e MacLeod e Dawson, e extremamente rugosas de Taylor (Austrian, 1953).

### Quadro 1

#### Diferentes nomenclaturas para os variantes morfológicos de *S. pneumoniae*.

Adaptado de Austrian, (1953).

Griffith, 1923	Dawson, 1934	Taylor, 1949	Austrian e MacLeod, 1949	Austrian, 1953
Liso (S)	Mucóide (M)	Liso (S)	Capsulado (S)	Não filamentoso e capsulado
Rugoso (R)	Liso (S)	Rugoso (R)	Rugoso de Griffith (GR)	Não filamentoso e não capsulado
-	-	-	-	Filamentoso e capsulado
-	Rugoso (R)	Extremamente rugoso (ER)	Rugoso de Dawson (DR)	Filamentoso e não capsulado

Desde 1953 até ao presente, as tentativas de uma nova classificação abrandaram. O crescendo na investigação dos vários aspectos da biologia de *S. pneumoniae*, e a implementação de novos e mais sofisticados métodos de pesquisa, fizeram com que actualmente a variação de fase na morfologia das colónias dos pneumococos seja considerada um dos mecanismos de patogenicidade utilizado pela bactéria na interacção com o hospedeiro. É um processo que resulta da expressão diferencial de proteínas de superfície, gerando uma população fenotipicamente heterogénea – uma possui uma menor expressão das proteínas; a outra expressa totalmente essas proteínas (van der Woude, 2006). A variação nas estruturas de superfície pode afectar a forma como os organismos se organizam para formar uma colónia e isso, por sua vez, pode afectar a aparência da colónia devido a diferenças na transmissão da luz (Weiser *et al.*, 1994).

A classificação dos variantes é baseada na aparência ou fenótipo das colónias submetidas à incidência de luz obliquamente transmitida num meio transparente. O fenótipo duma população pneumocócica distingue-se pela cor e tamanho das colónias. Os três fenótipos estabelecidos são: o transparente, o opaco e o intermédio. As colónias transparentes são descritas como mais azuladas, menores do que as opacas e mais transparentes no centro, o que evidencia uma morfologia umbilicada. Por microscopia electrónica os variantes transparentes parecem entrar mais cedo num processo de autólise, o que pode explicar a sua morfologia. As colónias opacas são mais esbranquiçadas, de maior dimensão, e têm uma morfologia cupulada. As colónias intermédias têm características intermédias entre os variantes opacos e transparentes, sendo mais achatadas (Weiser *et al.*, 1994).

A variação de fase em estirpes de *S. pneumoniae* tal como a conhecemos hoje, foi descrita pela primeira vez por Weiser *et al.* (1994), o qual tem contribuído com inúmeros trabalhos para o esclarecimento deste fenómeno.

A variação de fase foi descrita como a variação entre a fase transparente e a opaca duma maneira espontânea e reversível. A frequência de reversão entre as duas fases varia de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  por geração, independentemente das condições de crescimento *in vitro*, não sendo afectada pela temperatura (30 a 37°C), osmolaridade ou pressão de CO<sub>2</sub> (desde a concentração atmosférica a uma atmosfera enriquecida em 5% de CO<sub>2</sub>). Verificou-se que em cada estirpe a frequência de transição da fase opaca para a fase transparente e frequência de transição da fase transparente para a opaca, varia na mesma ordem de grandeza. Em algumas colónias foram detectados sectores de opacidade distintos, que indica haver variação de fase intracolonial (Weiser *et al.*, 1994), o que pode complicar a identificação do fenótipo dominante duma população.

Os estudos até agora realizados basearam-se num número limitado de estirpes expressando pouco serótipos e sem um perfil genómico conhecido, o que levantou dúvidas sobre se a variação de fase era um fenómeno restrito a algumas estirpes ou uma propriedade de todos os pneumococos.

### **O factor genético implicado no fenótipo da opacidade – “Box element”**

A variação fenotípica parece ser um fenómeno complexo podendo envolver vários genes, cujos produtos e modo de regulação não são bem compreendidos. O actual conhecimento acerca dos determinantes genéticos do fenótipo da opacidade é escassa, e o único factor genético implicado é a presença de um elemento “box element” descrito pela primeira vez pelos autores Saluja e Weiser (1995).

O advento da sequenciação contribuiu grandemente para o estudo dos factores genéticos em *S. pneumoniae*, pois permitiu que a sequência completa de duas estirpes – R6 e TIGR4 – fosse determinada em 2001 (Hoskins *et al.*, 2001, Tettelin *et al.*, 2001). Embora estas estirpes representem os serótipos 2 e 4, respectivamente, têm um elevado grau de semelhança com os restantes serótipos. Presentemente sabe-se que há mais de 100 “box elements” distribuídos aleatoriamente em regiões intergénicas no genoma do pneumococo, encontrando-se 127 na estirpe TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001) e 115 na R6 (Hoskins *et al.*, 2001).

Num artigo recente, Knutsen *et al.* (2006) tentaram esclarecer o papel destes elementos genéticos. Estes autores compararam 4 estirpes de pneumococos, incluindo a TIGR4 e R6, e verificaram que os 13 “box elements” analisados estão parcialmente conservados. Contudo, há elementos que estão altamente conservados nas 4 estirpes, o que sugere que a sua presença deve conferir vantagem selectiva às células. Sugerem ainda que os “box elements” no terminal 5’ dos transcritos de RNAm estimulam a expressão dos genes a jusante, aumentando a meia vida dos RNAm respectivos. Foi também demonstrado que os “box elements” são elementos móveis que aumentam a diversidade e a plasticidade genética, e que podem ter contribuído para a evolução do *S. pneumoniae* (Knutsen *et al.*, 2006).

É reconhecido desde 1992 que existem “box element” nas regiões reguladoras de múltiplos genes cuja função tem sido associada à expressão da virulência (Weiser *et al.*, 1994; Overweg *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 2001) e da competência no pneumococo (Martin *et al.*, 1992). A maioria destes palindromas repetitivos tem três módulos diferentes (boxA, B e C), onde a boxB (45pb) é flanqueada pela boxA (59pb) e pela box C (50pb) (Mrázek *et al.*, 2002). Frequentemente encontram-se 1 a 4 cópias de boxB entre a boxA e C que formam um laço interno. Alguns elementos têm apenas a boxA e boxC, e raramente têm uma sequência ou sequências repetidas

de boxB. Isto sugere que a boxB deve ser capaz de se mover independentemente da boxA e C. Os elementos com apenas a boxA e C têm o potencial de formar um com o outro uma estrutura em laço estável que pode modular a expressão dos genes vizinhos (Knutsen *et al.*, 2006).

De acordo com Saluja e Weiser (1995), em *S. pneumoniae* um “box element” encontra-se no *locus* da opacidade, na vizinhança de inúmeros genes de virulência. Este estaria implicado no aumento da frequência de reversão, entre  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$ , nas estirpes que o possuem, e pensa-se que esteja envolvido num mecanismo de regulação global da variação de fase. Este “box element” não tem boxB e a sua presença é variável em estirpes diferentes. Este facto pode explicar a elevada variação da frequência de transição de fase de estirpe para estirpe.

Estas observações foram obtidas após a sequenciação do *locus* da opacidade de uma estirpe responsável por infecção do serótipo 9V, capaz de transformar a estirpe R6 num outro fenótipo a uma elevada frequência (0,05%). Verificou-se a existência duma estrutura em laço formada pela boxA-C no *locus* da opacidade que pode afectar a regulação dos genes a jusante (a grelha aberta de leitura *orf1* e *orf2* com similaridade aos genes *glpD* e *glpF* do *B. subtilis*), resultando num aumento da frequência da variação de fase. Este laço deve funcionar como terminador condicional da transcrição. A montante do “box element” existe uma grelha aberta de leitura *orf3* e um suposto terminador da transcrição. O facto de Saluja e Weiser não terem conseguido obter uma inserção no gene *orf3* (Saluja e Weiser, 1995), levou à suposição de que o produto de *orf3* deve estar envolvido na opacidade e ser essencial à sobrevivência da bactéria. Os autores concluíram que a estirpe dadora introduziu na estirpe R6 o “box element”, resultando numa frequência de transição mais elevada do que a frequência de transição da estirpe R6 não transformada (0,0001% por geração) (Saluja e Weiser, 1995).

Verificou-se também que o *locus* da opacidade tem dois genes que são homólogos a genes envolvidos no metabolismo do glicerol noutras bactérias. Esses genes incluem o gene homólogo do *glpF*, envolvido no transporte activo do glicerol através da membrana citoplasmática, e o gene homólogo do *glpD*. Este gene deve codificar uma  $\alpha$ -glicerofosfato oxidase (desidrogenase primária) e uma oxidase terminal no género *Streptococcus* (Saluja e Weiser, 1995). Contudo, o facto do ácido teicóico da parede celular dos pneumococos conter ribitol em vez de glicerol (Brundish e Baddiley, 1968) não indica qual a importância destes genes no metabolismo da bactéria.

### **Significado biológico da variação de fase na morfologia**

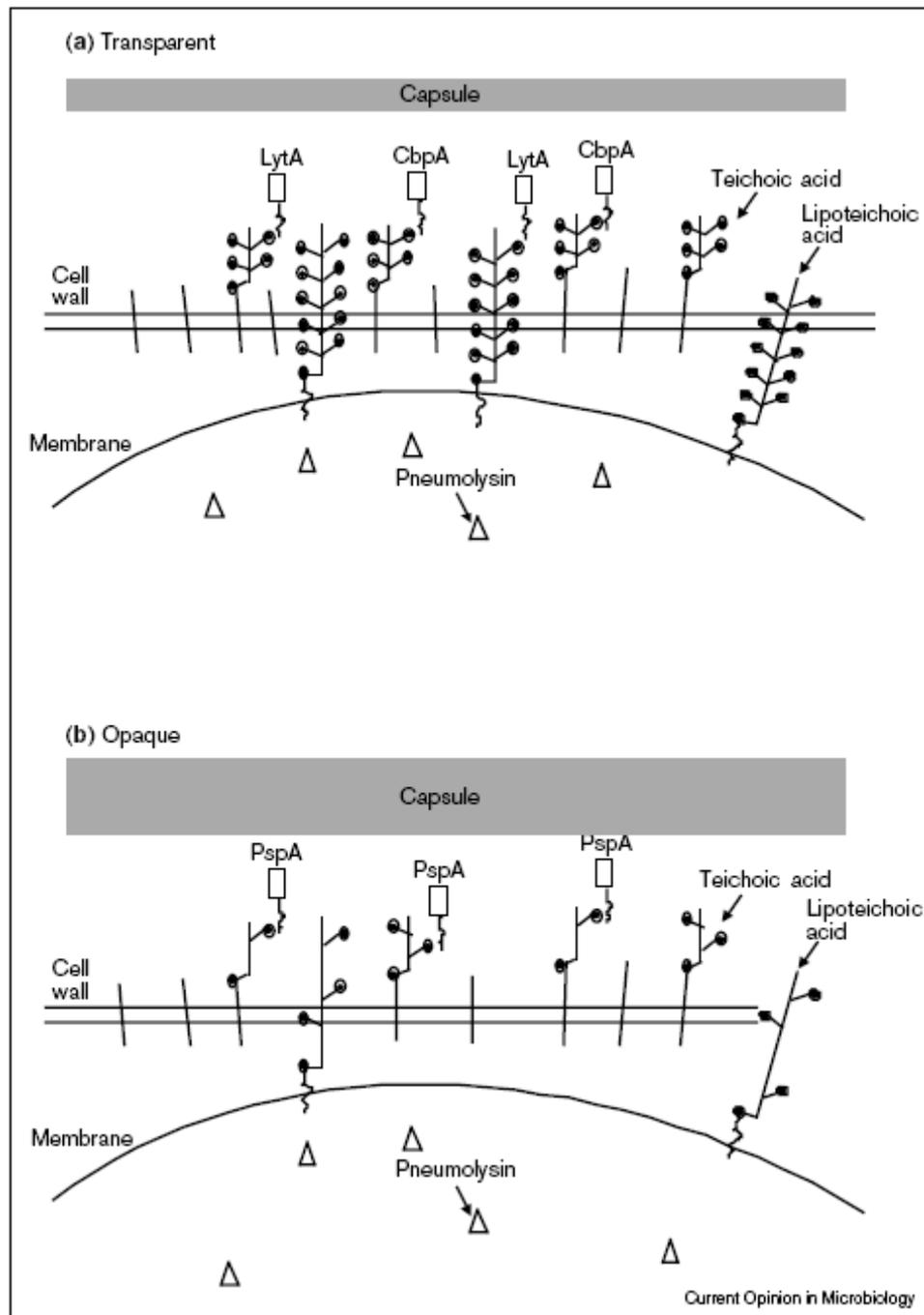
O significado biológico da variação da fase parece ser o de fornecer à bactéria uma estratégia de adaptação ao meio. Este tipo de mecanismo garante que haja sempre uma percentagem de células na população a expressar o fenótipo mais apropriado à sobrevivência no meio, mesmo que este sofra uma alteração inesperada. O fenótipo mais apto para determinado meio vai ser seleccionado, e tornar-se prevalente, enquanto que o número de estirpes com o outro fenótipo é reduzido (Henderson *et al.*, 1999). Por outro lado, a variação de fase pode levar a uma mistura igualitária dos fenótipos na população por estes, em conjunto, aumentarem a vantagem selectiva da população (van der Woude, 2006). A variação de fase funciona ainda como um mecanismo de fuga ao sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que as proteínas de superfície dos pneumococos são potencialmente imunogénicas e podem ser alvos dos anticorpos (Henderson *et al.*, 1999).

### **Associação entre variação de fase na morfologia e patogénese em *S. pneumoniae***

O modelo proposto por Weiser *et al.* (1994) relaciona a variação de fase com a patogenicidade dos pneumococos. Neste modelo os variantes transparentes estão mais bem adaptados à colonização como sugerido por experiências de colonização em ratinhos.

Quando ratinhos jovens foram inoculados com variantes transparentes na nasofaringe, o resultado foi uma colonização maciça da nasofaringe, mantendo a maioria das colónias o fenótipo transparente. Foi assim possível estabelecer uma associação entre o fenótipo transparente e maiores níveis de colonização. Quando os ratinhos foram inoculados com variantes opacos na nasofaringe obteve-se, passada uma semana, uma cultura de colónias maioritariamente transparentes. Isto indica claramente que houve selecção do fenótipo transparente durante a colonização da nasofaringe. Observou-se ainda que o fenótipo intermédio é geralmente menos eficiente do que o transparente na colonização (Weiser *et al.*, 1994). Relativamente aos variantes opacos demonstrou-se que são os únicos capazes de causar bacteriémia num modelo murino de infecção sistémica (Kim e Weiser, 1998).

De um modo geral, nos variantes transparentes, há uma maior expressão de ácido teicóico e proteínas, como a autolisina A, proteína A de ligação à colina e pneumolisina. No caso dos variantes opacos há uma maior expressão de polissacárido capsular e proteína A de superfície. Os produtos que são mais expressos por um variante são menos expressos pelo outro (Figura 2).



**Figura 2**

**Fatores de virulência expressos na superfície celular de variantes transparentes e opacos em *S. pneumoniae*.** Reproduzido de Tuomanen, (1999).

De acordo com este modelo a maior ou menor expressão das proteínas de superfície pelos variantes pneumocócicos devem conferir-lhes vantagens adaptativas apropriadas aos diferentes nichos ecológicos no hospedeiro humano. Os produtos expressos em maior quantidade pelos variantes transparentes devem atribuir uma maior vantagem adaptativa na colonização da

nasofaringe pois estão envolvidos na promoção da adesão às células do hospedeiro. Os produtos apresentados em maior quantidade pelos variantes opacos, nomeadamente o polissacárido capsular e o PspA, promovem a infecção do hospedeiro.

O papel dos variantes transparentes e opacos não está claramente esclarecido. Actualmente é defendido que os variantes transparentes têm um papel mais decisivo na aderência promovendo a entrada nas células do hospedeiro, e que os variantes opacos são importantes no estabelecimento da infecção invasiva.

### **Capacidade de adesão e invasão dos variantes transparentes e opacos**

No sub-capítulo “Acção patogénica de *S. pneumoniae*” foi descrita a forma como o pneumococo adere e invade o hospedeiro. Uma vez que os variantes transparentes e opacos apresentam diferenças na sua superfície vamos então avaliar como é que estes variantes se diferenciam na capacidade de aderência e invasão.

#### **Adesão**

Segundo Cundell *et al.* (1995) no tracto respiratório superior, os variantes transparentes apresentam o dobro da capacidade de aderência às células bucais do que os variantes opacos, o que envolve um maior reconhecimento do receptor GlcNAc $\beta$ 1-3Gal.

Os autores estabelecem ainda que no tracto respiratório inferior, nomeadamente nas células pulmonares, os variantes transparentes têm apenas uma pequena vantagem em relação aos opacos, pois aderem 33 a 46% mais aos pneumócitos e às células endoteliais vasculares naíves *in vitro*, o que envolve um maior reconhecimento dos receptores GalNAc $\beta$ 1-3Gal e GalNAc $\beta$ 1-4Gal. Quando se simula a inflamação, activando os pneumócitos e as células endoteliais vasculares com citocinas, verifica-se que os variantes transparentes têm maior capacidade de reconhecer os novos receptores GlcNAc é o receptor do PAF na superfície destas células. A aderência dos variantes transparentes às células pulmonares após estímulo com citocinas aumentou entre 0,9 e 1,3 vezes, enquanto que a aderência dos variantes opacos não se alterou (Cundell *et al.*, 1995).

Resumindo, no tracto respiratório superior os variantes transparentes colonizam mais eficientemente as células bucais. Nas células pulmonares naíves ou activadas os variantes transparentes têm vantagem sobre os opacos, o que leva a supor que o fenótipo transparente promove a internalização da bactéria.

## Invasão

No mesmo estudo verificou-se também que nas células pulmonares activadas, mas não nas células não activadas, o GlcNAc pode inibir a interacção do pneumococo com o receptor do PAF podendo constituir um obstáculo à internalização da bactéria, que requer o receptor do PAF, e à consequente invasão do sangue. Observou-se que o GlcNAc inibe 56% da aderência dos variantes transparentes ao receptor do PAF das células pulmonares activadas, mas apenas 20% da aderência dos variantes opacos (Cundell *et al.*, 1995), o que comprova a maior aderência entre os variantes transparentes e o GlcNAc. Contudo, Cundell *et al.* (1995a), verificaram que os variantes transparentes ligam-se mais avidamente ao receptor do PAF do que os variantes opacos contrariando o efeito da ligação ao GlcNAc, e entram mais eficientemente nas células activadas.

De acordo com Ring *et al.* (1998), os variantes transparentes de estirpes causadoras de infecção demonstram 3 a 5 vezes uma maior capacidade de invadir *in vitro* as células endoteliais da barreira hemato-encefálica de ratinhos do que os variantes opacos. Após a activação das células endoteliais com citocinas, a frequência de invasão não se altera relativamente às células não activadas, devido possivelmente à elevada frequência de receptores do PAF em ambos os estados. O mesmo não se passa no Homem, onde após a activação destas células a frequência de invasão aumenta.

Quando os pneumococos ganham acesso aos vacúolos intracelulares, a maioria dos variantes transparentes são transportados pela célula numa maneira dependente do receptor do PAF e CbpA, saindo pela superfície basal da célula, enquanto que a maioria dos variantes opacos são eliminados provavelmente nos lisosomas. Os restantes variantes transparentes são reciclados para a superfície apical da célula, não se estimando a sua capacidade de reiniciar a invasão (Ring *et al.*, 1998).

Os autores sugerem que a interacção com o receptor do PAF resulta no transporte do complexo da bactéria com o receptor do PAF através da célula endotelial e saída pela superfície basal da célula. O receptor do PAF ao ficar sequestrado dentro do vacúolo não é reciclado na superfície apical da célula. Esta reciclagem ocorre normalmente após a libertação do seu ligando natural que é a molécula PAF. Ou seja, os pneumococos, sobretudo os variantes transparentes, adulteram claramente o papel da reciclagem do receptor do PAF.

Por outro lado, a entrada na célula independentemente do receptor do PAF conduz a bactéria a sair da célula pela superfície apical e a reentrar na mesma célula num processo de reciclagem sem parecer comprometer a integridade do compartimento celular. O significado deste processo de reciclagem não é conhecido mas pensa-se que a célula pode servir para manter a bactéria

invasora protegida das defesas imunitárias até ocorrer o transporte intracelular através dos vacúolos (Ring *et al.*, 1998).

Embora os resultados sugiram que os variantes transparentes têm maior capacidade de aderência e de invasão, quer das células pulmonares activadas quer das células endoteliais da barreira hemato-encefálica, estes têm de ser analisados com prudência uma vez que os variantes não foram sujeitos à passagem pela barreira da nasofaringe, condição que antecede frequentemente a infecção pneumocócica. Para além disto, os estudos foram realizados na condição *in vitro* e portanto podem não traduzir fielmente o que acontece *in vivo*.

### **Factores de virulência expressos pelos variantes pneumocócicos**

Como referido anteriormente a variação de fase em *S. pneumoniae* resulta da expressão diferencial de estruturas de superfície, a maior parte delas são proteínas que estão enumeradas no quadro 2.

## Quadro 2

### Estruturas de superfície expressas diferencialmente pelos variantes transparentes e opacos de *S. pneumoniae*.

Estruturas de superfície	
Expressão aumentada nos variantes transparentes	Expressão aumentada nos variantes opacos
Ácido teicóico (Kim e Weiser, 1998).	Polissacárido capsular (Kim e Weiser, 1998).
Autolisina A (LytA) (Weiser <i>et al.</i> , 1996).	Proteína A de superfície (PspA) (Kim e Weiser, 1998).
Proteína A de ligação à colina (CbpA) (Rosenow <i>et al.</i> , 1997).	Factor de elongação (EF-Ts) (Overweg <i>et al.</i> , 2000).
Piruvato oxidase (Spbx) (Spellerberg <i>et al.</i> , 1996; Overweg <i>et al.</i> , 2000).	
Proteína A de maturação (PpmA) (Overweg <i>et al.</i> , 2000).	
Bacteriocinas (King <i>et al.</i> , 2004).	
Neuraminidase A (NanA) (King <i>et al.</i> , 2004).	
$\beta$ -Galactosidase (BgaA) (King <i>et al.</i> , 2006).	
$\beta$ -N-acetilglucosaminidase (StrH) (King <i>et al.</i> , 2006).	
Ácidos gordos insaturados na membrana plasmática (Aricha <i>et al.</i> , 2004).	

Em seguida abordaremos estas estruturas, à excepção da CbpA e da PspA que já foram referidas anteriormente. Vai ser incluída a pneumolisina, porque é um dos factores que se pensava exibir variação de fase.

### Ácido teicóico

O ácido teicóico é importante na manutenção da integridade estrutural da parede celular. Uma propriedade recentemente atribuída ao ácido teicóico é a presumível ligação a resíduos de D-alanina que reduzem a carga negativa da célula repelindo a ligação dos antimicrobianos catiónicos (Kovacs *et al.*, 2006).

Em 1998 demonstrou-se que a variação de fase está associada a uma variação na expressão de ácido teicóico e de polissacárido capsular, havendo uma relação inversa entre a expressão dos dois carboidratos nestes variantes, o que sugere uma interdependência na sua expressão superficial (Kim e Weiser, 1998).

Em 1999 verificou-se que as diferenças qualitativas, nomeadamente o tipo da cápsula, e a presença ou ausência de polissacárido capsular, não afectam a quantidade do ácido teicóico associado à célula. Por outro lado, as diferenças quantitativas não perturbam o conteúdo do polissacárido associado à célula, mas as diferenças estruturais sim. Quando uma estirpe cresce num meio com etanolamina, um análogo da colina, apresenta uma maior quantidade de polissacárido capsular do que a que cresce num meio com colina, sendo esta quantidade sempre maior nos variantes opacos do que nos transparentes (Kim *et al.*, 1999).

Estes resultados revelam que o ácido teicóico pode ser um factor importante na expressão da cápsula, mas a regulação da expressão destes dois carboidratos e a sua interdependência não está ainda inteiramente esclarecida.

Não contrariando os resultados acima descritos há indícios de haver uma relação entre o polissacárido capsular e o ácido teicóico:

- Ambos estão ligados covalentemente ao peptidoglicano estando indirectamente ligados um ao outro (Fischer, 1997).

- Algumas cápsulas polissacarídicas têm na sua estrutura fosforilcolina, o que sugere que esta tenha sido originada como uma forma modificada do ácido teicóico (Fischer, 2000).

- Os variantes transparentes expressam pelo menos duas vezes mais ácido teicóico do que os variantes opacos, e estes expressam até 5 vezes mais polissacárido capsular do que os variantes transparentes (Kim e Weiser, 1998).

Sendo o ácido teicóico um factor de virulência pneumocócico esperava-se que a expressão deste carboidrato variasse de acordo com a origem das estirpes. Contudo, Spreer *et al.* (2004) verificaram pela técnica de imuno-ensaio que a quantidade de ácido teicóico e lipoteicóico é semelhante entre as estirpes responsáveis por infecções invasivas, não invasivas e de colonização. Observaram também que a expressão e libertação de ácido teicóico e de ácido lipoteicóico é semelhante entre estirpes de origens diferentes durante o crescimento *in vitro*, o

que indica haver outros factores que expliquem as diferenças de invasibilidade e patogenicidade nestas estirpes (Spreer *et al.*, 2004).

### **Polissacárido capsular**

Alterações na produção de polissacárido capsular podem ser obtidas, quer pela duplicação de genes do *locus* capsular levando à ausência de cápsula (Waite *et al.*, 2001; 2003) quer pelo fenótipo de opacidade através de um mecanismo não clarificado que conduz a uma maior ou menor produção de cápsula (Weiser *et al.*, 2001).

È possível que ambas ocorram *in vivo* dependendo das condições do meio.

Descreve-se, mais pormenorizadamente, as duas maneiras diferentes de alterações na produção de polissacárido capsular:

**a)** Os *locus* capsulares têm uma estrutura similar em todos os serótipos à excepção do 3 e 37 (Waite *et al.*, 2003). O *locus* capsular tem uma região central com um número variável de genes *cps* específicos a cada tipo capsular, um gene *cpsE*, que é a transferase do primeiro monossacárido, e uma região de regulação e exportação da cápsula que envolve 4 genes *cpsA,B,C* e *cpsD* localizados a montante do *cpsE* (Guidolin *et al.*, 1994). Waite *et al.* (2003) descreveram o fenómeno de variação de fase capsular nos serótipos 8 e 37 que envolve os genes *cps* e *tts*, respectivamente. A duplicação espontânea duma sequência leva à ausência de produção da cápsula que volta a ser produzida após a excisão dessa duplicação. Este mecanismo é análogo ao encontrado no serótipo 3 (Waite *et al.*, 2001) e noutros serótipos (Guidolin *et al.*, 1994; Kolkman *et al.*, 1996; Morona *et al.*, 2000) e tem uma elevada frequência de reversão (Waite *et al.*, 2001; 2003).

As estirpes sem cápsula têm sido associadas à ocorrência de conjuntivite desde 1977 por Finland e Barnes. Estudos recentes confirmam estas estirpes como sendo as responsáveis por surtos (Carvalho, 2003) e casos esporádicos (Bérron *et al.*, 2005; Porat *et al.*, 2006) de conjuntivite. Ocasionalmente têm sido implicadas noutras infecções pneumocócicas como a otite média e infecções invasivas (Bérron *et al.*, 2005). A ausência de cápsula parece conferir uma vantagem selectiva para causar conjuntivite. Contudo, não se sabe se os pneumococos não tipáveis nunca produzem cápsula ou se perdem a capacidade de a produzir usando a variação de fase quando causam infecção conjuntiva.

**b)** Os variantes opacos expressam maior quantidade de polissacárido capsular do que os variantes transparentes (Kim *et al.*, 1999). Está envolvida uma regulação diferencial da expressão dos gene *cps* do loci do polissacárido capsular (Morona *et al.*, 2000; Weiser *et al.*,

2001). Um dos mecanismos de regulação envolve a fosforilação da proteína CpsD e a concentração de oxigénio no meio (Weiser *et al.*, 2001).

A fosforilação de dois ou mais resíduos de tirosina na proteína CpsD promove o aumento da actividade reguladora negativa desta proteína sobre a biossíntese de polissacárido capsular diminuindo a sua produção (Weiser *et al.*, 2001). Em condições de concentração reduzida em oxigénio a expressão do polissacárido capsular é aumentada nos variantes opacos e mantém-se baixa nos variantes transparentes. Demonstrou-se que a condição de microaerofilia, quando comparada com a condição atmosférica, é suficiente para induzir um aumento significativo na expressão de polissacárido capsular, e que a condição de anaerobiose estrita promove uma estimulação máxima da produção de cápsula. Weiser *et al.* (2001) especulam que durante a pneumonia e durante a otite média há uma limitação na troca de gases, o que leva a uma diminuição da concentração de oxigénio no espaço alveolar e no exsudado inflamatório no ouvido médio, respectivamente. Cria-se assim, durante a infecção, condições apropriadas para a selecção dos variantes opacos.

O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na produção do polissacárido revelou-se ainda mais importante depois de se ter estabelecido uma relação directa entre a quantidade de polissacárido capsular e a eficiência na fuga à fagocitose. Numa experiência realizada na presença da forma purificada da proteína C reactiva humana, em concentrações geralmente encontradas numa infecção e na ausência de anticorpos capsulares, verificou-se que há um aumento da actividade opsonofagocítica contra os variantes transparentes, mas não há uma alteração desta actividade contra os variantes opacos. Os resultados sugerem que a pCr pode ser um factor significativo na opsonização dos variantes transparentes e pode explicar a reduzida virulência deste fenótipo. Esta hipótese é concordante com os estudos que demonstraram que os variantes transparentes ligam mais pCr através da fosforilcolina. Por outro lado, o facto da actividade opsonofagocítica não ter sido alterada contra os variantes opacos, e de se terem observado excepções nalguns serótipos, indica que a quantidade e a estrutura do polissacárido capsular pode influenciar o papel da proteína C reactiva (Kim *et al.*, 1999). Com base nestes resultados foi possível sugerir que a maior virulência dos variantes opacos está relacionada com o aumento da expressão de polissacárido capsular.

### **Autolisina A**

A autolisina A, LytA, é a enzima amidase N-acetilmuramuil-L-alanina (Howard e Gooder, 1974) à qual se deve maioritariamente a autólise pneumocócica (Berry *et al.*, 1989). Durante a

autólise os elementos da parede celular e da célula são libertados, podendo ter um efeito indirecto na capacidade da bactéria se evadir à fagocitose, e potencialmente causar infecção.

Em 1986, Garcia *et al.* descobriram que no mecanismo de secreção da enzima está ausente a sequência sinal típica dos procariotas (Garcia *et al.*, 1986).

Em 1996, verificou-se que a expressão da LytA difere de acordo com o fenótipo da estirpe observando-se maiores expressões da enzima nos variantes transparentes. Neste estudo onde se compararam propriedades de crescimento entre variantes transparentes, opacos e estirpes mutantes com o gene *lytA* inactivo, verificou-se que os três grupos de estirpes entram na fase estacionária ao mesmo tempo. Tanto os variantes opacos como os mutantes LytA<sup>-</sup> entram na fase estacionária com uma absorvância superior à dos variantes transparentes, não sofrendo autólise numa frequência considerável depois de entrarem nesta fase. Os autores concluíram que a menor quantidade de expressão da LytA nos variantes opacos é o factor com maior responsabilidade na menor frequência de autólise neste fenótipo (Weiser *et al.*, 1996).

Em 1995, Saluja e Weiser tinham já constatado que os variantes opacos, tal como as estirpes LytA<sup>-</sup>, são resistentes aos efeitos do desoxicolato e que na sua presença a adição de LytA a culturas de variantes opacos não é suficiente para causar a lise, indicando haver outras diferenças estruturais que podem alterar a susceptibilidade do substrato da parede celular à degradação autolítica contribuindo para a resistência dos variantes opacos à lise celular (Saluja e Weiser, 1995; Weiser *et al.*, 1996).

### **Pneumolisina**

A pneumolisina é uma toxina formadora de poros que está presente no citoplasma. Ela é libertada durante o crescimento exponencial, independentemente da lise celular e da autolisina (Balachandran *et al.*, 2001) ou na lise celular generalizada no início da fase estacionária (Berry *et al.*, 1989).

Em 1998 verificou-se que os variantes transparentes e opacos expressam quantidades semelhantes de pneumolisina, tornando improvável que a pneumolisina seja responsável pela maior virulência dos variantes opacos (Kim e Weiser, 1998). Mais tarde Spreer *et al.* (2004) utilizando a técnica de “immunoblotting” mostraram que a quantidade de pneumolisina extracelular é semelhante entre as estirpes responsáveis por infecções invasivas, não invasivas e de colonização. O mesmo se passa com a quantidade de pneumolisina no citoplasma. Adicionalmente observou-se que a produção de pneumolisina é independente do serótipo e que durante o crescimento *in vitro* não há diferenças na expressão e libertação de pneumolisina entre estirpes responsáveis por infecções invasivas, não invasivas e estirpes de colonização.

Noutro trabalho desenvolvido por Benton *et al.* (1997), descobriu-se que as diferenças na virulência dos pneumococos em modelos de infecção em ratinhos não se devem a diferentes quantidades de pneumolisina.

Em conjunto, estes resultados indicam que a produção e a libertação desta toxina não são suficientes para explicarem as diferenças de patogenicidade entre as estirpes (Benton *et al.*, 1997; Spreer *et al.*, 2004).

### **Piruvato oxidase**

A enzima piruvato oxidase, SpbX faz a descarboxilação do piruvato em acetil fosfato, resultando na libertação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

Em 1996 observou-se que os mutantes pneumocócicos de SpbX não produzem virtualmente nenhum peróxido de hidrogénio e não colonizam eficientemente a nasofaringe (Spellerberg *et al.*, 1996).

Em 2000 verificou-se que os variantes transparentes produzem maiores quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e relacionou-se este facto com a maior expressão de piruvato oxidase nestes variantes (Overweg *et al.*, 2000). Em conjunto estes resultados sugerem que a expressão diferencial da enzima SpbX pode conferir aos variantes transparentes uma maior eficiência em aderirem à superfície das células do hospedeiro (Spellerberg *et al.*, 1996; Overweg *et al.*, 2000).

Foi estabelecido também que a expressão da piruvato oxidase é influenciada pela concentração de O<sub>2</sub> no meio (Overweg *et al.*, 2000). Provavelmente a concentração de O<sub>2</sub> em condições atmosféricas vai coadjuvar a reacção de descarboxilação do piruvato promovendo a expressão da enzima que catalisa esta reacção. Segundo Weiser *et al.* (2001) nestas condições os variantes transparentes são seleccionados e, de acordo com Overweg *et al.* (2000), estes variantes expressam mais SpbX o que promove a aderência ao hospedeiro.

### **Proteína de maturação PpmA e factor de alongação EF-Ts**

A proteína PpmA é expressa em maior quantidade nos variantes transparentes, o que sugere que esteja envolvida directamente na aderência, através da maturação de proteínas de superfície com propriedades de aderência, ou indirectamente pela activação de proteases ou outras proteínas secretadas (Overweg *et al.*, 2000). Esta proteína é também capaz de despoletar a resposta imunitária (Overweg *et al.*, 2000a).

O factor de alongação EF-Ts é essencial no alongamento da cadeia polipeptídica durante a síntese proteica. É possível que a maior produção de EF-Ts nos variantes opacos indique que estes sejam metabolicamente mais activos, o que pode explicar o rápido crescimento destes variantes (Overweg *et al.*, 2000).

### Exoglicosidases NanA, BgaA e StrH

Conhecem-se três neuraminidases, a NanA, a NanB e a NanC. Todas as estirpes isoladas de crianças parecem ter o gene *nanA*, 96% o *nanB* e apenas 51% o *nanC*. A maioria das estirpes tem a combinação *nanA* e *nanB* e a combinação *nanA*, *nanB* e *nanC*. Embora a NanA e NanB sejam essenciais no modo de vida das estirpes causadoras de infecções invasivas e de colonização promovendo a aderência às células do hospedeiro, a presença da NanC parece predispor para a infecção invasiva do líquido cefalorraquidiano (Pettigrew *et al.*, 2006).

Em 2000 verificou-se que a neuraminidase NanA contribui para o desenvolvimento da otite média num modelo de chinchila provavelmente por facilitar a aderência à traqueia da chinchila como demonstrado *ex vivo* (Tong *et al.*, 2002).

Em 2004 demonstrou-se que os variantes transparentes expressam maior quantidade de NanA envolvida na promoção da aderência. Através da análise genética por “microarrays” de 2129 grelhas abertas de leituras constatou-se que os variantes transparentes expressam maior quantidade das neuraminidases NanA e NanB. Verificou-se que o gene *nanA* é regulado positivamente pelos variantes transparentes e que as diferenças na expressão de *nanA* atingem um máximo na fase estacionária. Enquanto que o gene *nanB*, que se situa num regulão diferente, tem a mesma expressão em ambos os variantes (King *et al.*, 2004).

Em 2006 foi possível concluir que para além da NanA os variantes transparentes de estirpes do serótipo 6A produzem maior quantidade de  $\beta$ -galactosidase e de *N*- $\beta$ -acetilglucosaminidase do que os opacos, conferindo-lhes uma maior capacidade de aderência e colonização da nasofaringe humana (King *et al.*, 2006). Contudo, em estirpes do serótipo 6B não se verificaram diferenças na actividade destas duas enzimas nos variantes transparentes, o que sugere que nalgumas estirpes a actividade da enzima NanA pode ser a única responsável pela exposição da manose das glicoproteínas do hospedeiro.

### Bacteriocinas

As bacteriocinas são pequenos péptidos antimicrobianos produzidos por uma grande variedade de bactérias e que estão envolvidos na competição intra e inter-específica. Tipicamente as bacteriocinas têm como alvo microrganismos da mesma espécie ou de espécie próxima. A produção duma proteína específica protege a bactéria produtora da bacteriocina do seu efeito inibidor. Esta proteína é co-transcrita com os genes que codificam o péptido (de Saizieu *et al.*, 2000).

Em 2000 foi identificado um *locus blp* pneumocócico que codifica alguns péptidos tipo bacteriocinas (de Saizieu *et al.*, 2000). Em 2006 constatou-se que a regulação do *locus* é

complexa, provavelmente envolvendo um sistema regulador, uma feromona peptídica e um transportador (Dawid *et al.*, 2007).

No estudo de Dawid *et al.* (2007), não foi possível constatar *in vitro* qualquer actividade mensurável relacionada com as bacteriocinas das estirpes R6 e TIGR4. Contudo identificaram-se duas estirpes causadoras de infecção dos serótipos 6A e 19A com esta actividade.

Confirmou-se que na estirpe 6A a actividade inibitória é regulada pelo sistema regulador do *locus* e requer os dois genes putativos das bacteriocinas *blpM* e *blpN*. Esta estirpe tem capacidade de inibir a estirpe TIGR4 porque as diferenças entre as bacteriocinas produzidas pelas duas estirpes são suficientes para resultarem na falha da proteína imunitária da TIGR4 para se proteger contra as bacteriocinas da estirpe 6A. As bacteriocinas da estirpe 6A e da TIGR4 são diferentes em apenas 5 amino ácidos e pertencem cada uma a um subtipo de BlpMN. Há assim dois tipos de BlpMN, um é semelhante à proteína da estirpe TIGR4 e outro é homólogo à proteína do serótipo 6A. Mas nem todas as estirpes pneumocócicas já sequenciadas possuem bacteriocinas homólogas às BlpMN, um exemplo é a estirpe R6 (Dawid *et al.*, 2007).

A estirpe 19A foi usada num modelo de colonização murino e concluiu-se que as bacteriocinas BlpMN têm de facto um papel relevante na competição intra-específica na nasofaringe. As bacteriocinas podem remover eficientemente os competidores da nasofaringe aumentando potencial para a transmissão da bactéria a outros hospedeiros. Contudo, o serótipo 19A emergiu na era pós vacinação como um serótipo importante como causador de infecções invasivas, o que sugere que poderá haver uma relação entre a produção de bacteriocinas, a capacidade para colonizar a nasofaringe e causar infecção invasiva.

Em 2004 já se tinha verificado que os variantes transparentes expressam mais intensamente as *orfs* homólogas às *orfs* da estirpe TIGR4 envolvidas na produção de bacteriocinas (King *et al.*, 2004). Dawid *et al.* (2007), descreveram que o variante transparente da estirpe 6A tinha uma actividade inibitória muito menor do que o variante opaco mas não apresentava diferenças na imunidade. Esta aparente contradição pode resultar de diferenças na transcrição entre os variantes transparentes e opacos (King *et al.*, 2004).

Se os resultados acima descritos se aplicarem a um maior número de variantes fenotípicos é de crer que a maior expressão de bacteriocinas pelos variantes opacos possa conferir vantagem selectiva na invasão das células do hospedeiro.

### **Lípidos membranares**

O *locus* da opacidade está associado a genes presumivelmente envolvidos no metabolismo da membrana plasmática (Saluja e Weiser, 1995). A partir desta proposição, Aricha *et al.* (2004)

tentaram relacionar a variação de fase com a síntese de fosfolípidos membranares e verificaram que os variantes pneumocócicos exibem diferentes níveis de insaturação nos fosfolípidos membranares.

A membrana celular dos pneumococos é formada por uma camada dupla composta por vários fosfolípidos, glicolípidos e proteínas (Tomasz e Fischer, 2000). As alterações na composição lipídica da membrana tal como o grau de insaturação das cadeias, o comprimento e grau de ramificação das cadeias, alteram as características biofísicas da membrana.

No estudo de Aricha *et al.* (2004) verificou-se que os variantes transparentes e opacos têm o mesmo conteúdo lipídico mas diferentes níveis de insaturação dos ácidos gordos. Nos variantes transparentes a razão entre ácidos gordos insaturados e os saturados é maior do que nos opacos, o que pode explicar a menor microviscosidade membranar observada nestes variantes.

A variação do nível de insaturação dos ácidos gordos entre os variantes opacos transparentes pode resultar da adaptação homeoviscosa. A adaptação homeoviscosa, segundo Sinensky (1974), é o processo no qual as alterações na temperatura ou na pressão hidrostática induzem modificações na actividade das enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos gordos, fazendo com que se altere a proporção de ácidos gordos insaturados nos fosfolípidos membranares.

Nos diferentes nichos no hospedeiro humano as condições de temperatura, concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e pH alteram-se. De acordo com os autores, o menor número de ligações duplas nos ácidos gordos nos variantes opacos deve conferir uma vantagem adaptativa durante a invasão de fluidos geralmente estéreis em condições de stress oxidativo, decrescendo a sua susceptibilidade à peroxidação dos lípidos (Aricha *et al.*, 2004).

Noutro estudo, Sahu *et al.* (2006), usaram a espectroscopia de FTIR (“Fourier Transform InfraRed”) que, em combinação com outros métodos, possibilita distinguir diferentes espécies bacterianas, serótipos, e diferentes quantidades capsulares em pneumococos. Na análise quantitativa verificaram que os variantes opacos possuem uma maior quantidade de carboidratos da cápsula do que os variantes transparentes. Na análise qualitativa observaram que os variantes têm conteúdos lipídicos distintos, contradizendo o estudo anterior, mas não refutam a existência de diferenças a nível da insaturação.

Os dados indicam ainda que na maioria das estirpes grande parte das proteínas celulares dos variantes transparentes e opacos é similar. Os variantes opacos e transparentes de estirpes do serótipo 6A são uma excepção pois apresentam pequenas diferenças no seu conteúdo lipídico e disparidade a nível das proteínas celulares (Sahu *et al.*, 2006).

Estes dois trabalhos vieram comprovar que a maioria dos variantes fenotípicos pneumocócicos se diferenciam ao nível dos lípidos membranares e dos carboidratos da cápsula.

### **Modelo de invasão da mucosa da nasofaringe**

Recentemente Briles *et al.* (2005), conceberam um modelo no qual durante a colonização da nasofaringe o *S. pneumoniae* forma duas populações, uma que continua a colonizar a nasofaringe e outra que invade a mucosa da nasofaringe sem causar sintomas de infecção.

Este modelo resulta de experiências com ratinhos nas quais se verificou o aparecimento de variantes transparentes quando a superfície nasal era lavada com solução salina. Quando o tecido nasal era lavado por homogeneização observavam-se maioritariamente variantes opacos. Isto indica que os variantes opacos invadem o tecido nasal. Contudo, os próprios autores ressaltam que os produtos da superfície dos pneumococos podem ter causado a inflamação.

O modelo defende que uma sub-população pneumocócica invade a mucosa nasal para a manutenção da colonização a longo prazo. Estes variantes devem apresentar vantagens em relação aos que continuam a colonizar a nasofaringe. Não são afectados pelo fluxo de muco nem pela lactoferrina secretada e não competem com os microrganismos da flora nasal. Contudo, os variantes invasivos têm de se proteger da opsonização dependente do complemento e da fagocitose. As colónias da sub-população que invade a mucosa nasal deve ser opaca. Os autores apontam que estes variantes continuam a repovoar a superfície nasal devido à sua capacidade de transitar para a forma transparente. Esta capacidade faz com que se mantenha o reservatório de colónias transparentes necessárias para a propagação entre hospedeiros.

Perante a variedade de trabalhos apresentados que envolvem os variantes transparentes e opacos de *S. pneumoniae*, e face a resultados que nem sempre são concordantes, o único ponto que não parece ser de discórdia é o da variação de fase ser um mecanismo bastante complexo. É neste momento impossível atribuir taxativamente funções a cada um dos variantes. Muito provavelmente os produtos expressos pelos variantes dependem de múltiplos factores, internos e do meio envolvente, e será possivelmente por isso que não se apresentam conforme o esperado em todas as estirpes.

### **Associação entre variação de fase na morfologia e patogénese noutros microrganismos**

Outros microrganismos como o *Haemophilus influenzae* (Weiser, 1993) e *Neisseria meningitidis* (Swanson, 1982; Kupsch *et al.*, 1993) que colonizam a nasofaringe humana exibem variação de fase.

Nestas espécies a variação de fase não resulta da expressão diferencial de proteínas de superfície mas sim duma estreita agregação das células dentro da colónia que altera a passagem de luz transmitida obliquamente modificando a aparência da colónia. As colónias opacas resultam duma maior agregação celular do que as colónias transparentes (Weiser, 1993). Nos

estreptococos dos grupos A e B observam-se colónias com fenótipos distintos que resultam dos diferentes comprimentos das cadeias, sendo que as colónias formadas por cadeias longas são mais opacas devido à maior junção das cadeias (Swanson e McCarty, 1969; Pincus *et al.*, 1992).

No *H. influenzae* e na *N. meningitidis* (excluindo os estreptococos dos grupos A e B) a variação de fase está relacionada com a patogénese.

## **Relação entre a variação de fase na morfologia e a lisogenia fágica**

Este pequeno sub-capítulo serve para dar conhecimento dum modelo que não pondo em causa a variação de fase pode levantar questões quanto ao verdadeiro papel deste mecanismo na patogénese de *S. pneumoniae*.

### **Generalidades sobre os bacteriófagos**

Os bacteriófagos ou fagos são vírus que potencialmente infectam bactérias. Os bacteriófagos de pneumococos foram descobertos na década de 70 por McDonnell. Os fagos podem ser virulentos ou temperados dando origem a dois ciclos possíveis.

Os fagos virulentos ao entrarem na célula utilizam as enzimas bacterianas para se reproduzirem e libertarem para o exterior novas partículas fágicas com lise obrigatória da bactéria, o denominado ciclo lítico (Garcia *et al.*, 1997).

Os fagos temperados ou lisogénicos podem seguir o ciclo lítico ou lisogénico. A escolha depende das condições fisiológicas intracelulares da bactéria (Garcia *et al.*, 1997). Se as condições não forem favoráveis à produção de partículas fágicas ele integra-se no cromossoma bacteriano, denominando-se profago, e replica-se com este, tornando-se lisogénico.

Nos pneumococos os fagos lisogénicos são muito frequentes. Foi estabelecida recentemente uma elevada ocorrência de lisogenia nas populações de pneumococos (Ramirez *et al.*, 1999). Os autores verificaram que de entre 791 estirpes causadoras de infecção a maioria (76%) possuía, para além do gene *LytA*, um ou mais genes homólogos ao *LytA* integrado no seu cromossoma devido à presença do profago. Contudo, este valor pode estar sobrestimado porque tem em conta todos os profagos, os funcionais e os não funcionais. A presença de mais do que um gene homólogo ao *LytA* na mesma estirpe sugere que as estirpes causadoras de infecção são lisogénicas para mais de um fago.

Os fagos lisogénicos provavelmente não contribuem para a variação genética em *S. pneumoniae*. Três estirpes, entre as quais a TIGR4, foram sequenciadas e verificou-se que cerca de 10% do genoma é variável. Nessas estirpes, à excepção da TIGR4 na qual se encontrou um pequeno elemento tipo profago, a variação não se deve à presença de fagos (Tettelin e Hollingshead, 2004) mas principalmente à capacidade dos pneumococos tornarem-se competentes.

Apesar de ser reconhecida a capacidade dos fagos lisogénicos transportarem genes de virulência em diferentes espécies como em *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* nos pneumococos não foram associados a nenhum factor de virulência. Face a estes resultados os profagos nos pneumococos devem ter outro papel sem ser a troca genética (Yother e Hollingshead, 2006).

### **Favorecimento da via lítica ou lisogénica pelos variantes pneumocócicos**

Em 2006, Loeffler e Fischetti mostraram que o profago MM1-1998, inteiramente sequenciado e proveniente duma estirpe do serótipo 24 susceptível à penicilina e isolada em Portugal, induz modificações a favor da colonização ou da virulência no pneumococo que infecta (Loeffler e Fischetti, 2006).

Neste estudo verificaram que o fago, depois de infectar o pneumococo, escolhe a via lítica ou lisogénica de acordo com o fenótipo do variante pneumocócico. Os resultados indicam que os variantes transparentes favorecem a via lisogénica e que os variantes opacos favorecem a via lítica sendo incompatíveis com uma lisogenia estável, perdendo o fago com facilidade. Assim sendo, é possível que a variação de fase tenha um papel no sucesso da lisogenia conferindo à bactéria o controlo sobre os profagos.

Verificaram também que a maior aderência do pneumococo às células da faringe está associada à lisogenia desencadeada pela presença do profago e não ao fenótipo transparente. A lisogenia ao aumentar a aderência das células ao hospedeiro pode contribuir para a persistência dos pneumococos na nasofaringe. Contudo, a transparência deve ser a condição responsável por uma maior autólise (Loeffler e Fischetti, 2006).

No modelo de variação de fase os variantes transparentes expressam maior quantidade de proteínas de superfície que contribuem para a maior aderência às células epiteliais do hospedeiro. Levando em conta os dados de Loeffler e Fischetti, é relevante colocar as seguintes questões:

- A maioria dos variantes transparentes possui um profago lisogénico e é a sua presença que estimula a produção de proteínas de superfície?

- A maior expressão de LytA nos variantes transparentes (Weiser *et al.*, 1996) deve-se ao somatório da maior expressão da LytA pneumocócica e da lisina homóloga de profagos?

Para responder a estas questões terão de ser realizados mais estudos onde se analise a presença de profagos nos variantes transparentes e opacos.

## **As estruturas tipo pili como mecanismo de patogenicidade de *S. pneumoniae***

Neste sub-capítulo pretende-se mostrar que *S. pneumoniae* tem outros mecanismos de patogenicidade que em conjunto se devem complementar.

### **Morfologia das estruturas tipo pili e sua patogénese**

A variação de fase na morfologia é uma característica considerada fundamental no estilo de vida de todos os pneumococos e é um dos mecanismos de patogenicidade usados por esta bactéria. O outro *modus operandi*, recentemente descoberto, inclui o uso das estruturas tipo pili presentes em apenas alguns serótipos, o que evidencia a existência de uma coordenação dos vários mecanismos de virulência nas diferentes fases de interação entre a bactéria e o hospedeiro.

Segundo Barocchi *et al.* (2006), os genes da ilha de patogenicidade *rlrA* são responsáveis pela formação de estruturas tipo pili à superfície da bactéria. As estruturas tipo pili provaram favorecer a adesão às células epiteliais e promover a colonização e a invasão em modelos de infecção em ratinhos. Uma vez estabelecida a invasão do sangue devem acentuar a severidade da infecção.

Os mesmos autores verificaram que estirpes de clones dos serótipos 1 e 7F, raramente isolados de indivíduos saudáveis, não possuem a ilha de patogenicidade *rlrA*. De acordo com Sjostrom *et al.* (2006), estes serótipos estão associados a uma menor severidade da infecção. Isto levou a que os autores sugerissem que pode haver uma relação entre a ausência de pili nas estirpes e uma menor severidade da infecção por elas causada.

### **Factores genéticos implicados na formação das estruturas tipo pili em *S. pneumoniae***

A ilha de patogenicidade *rlrA* tem aproximadamente 14,200 pb. A ilha inclui 7 genes, o gene *rlrA* é um regulador positivo da transcrição tipo *rofA*, os genes *rrgA,B,C* codificam 3 proteínas de superfície com o motivo LPXTG e os genes *strB,C,D* codificam 3 sortases homólogas. A ilha é flanqueada por duas sequências de inserção com repetições invertidas (Hava e Camilli, 2002; Hava *et al.*, 2003).

O repressor da transcrição *mgrA*, localizado na parte externa da ilha, está envolvido na regulação dos genes do pilus (Hemsley *et al.*, 2003). A ilha não está conservada em todos os tipos capsulares de pneumococos (Tettelin *et al.*, 2001), o que sugere que pode ter sido adquirida por transferência horizontal. Este facto é justificado pela ilha ser flanqueada por sequências de inserção que permitiram a sua inserção no genoma por recombinação homóloga ou transposição. Hemsley *et al.* (2003), mostraram que a ilha foi inserida no genoma e integrada em pelo menos uma rede reguladora em estirpes do serótipo 4.

A estirpe TIGR4 possui esta ilha de patogenicidade enquanto que as estirpes R6 e D39, em vez da ilha, possuem uma unidade repetitiva e uma sequência de inserção com 740 pb (Barocchi *et al.*, 2006). Curiosamente o gene *mgrA* está presente em todas as estirpes, o que indica que este gene tem outras funções para além de reprimir a expressão da ilha *rlrA* (Hemsley *et al.*, 2003).

Os pili de *S. pneumoniae* têm a aparência de filamentos flexíveis que medem 0,3 a 3 µm de comprimento, ligam-se a receptores de colagénio no hospedeiro e são compostos por 3 subunidades de pilina. As sortases vão possivelmente catalisar a junção das subunidades de pilina (Telford *et al.*, 2006). Têm sido propostos modelos explicativos da forma como se dá a formação dos pili. Contudo, em pneumococos o processo não está ainda esclarecido.

### **Estruturas tipo pili noutros microrganismos**

As estruturas tipo pili têm sido descritas em bactérias Gram positivas como *Corynebacterium diphtheriae*, *Actinomyces* spp. e, recentemente, nos estreptococos do grupo A e B (Telford *et al.*, 2006). Têm sido, também, descritas em agentes patogénicos Gram negativos como a *Neisseria meningitidis* e a *Neisseria gonorrhoeae*. Em todas estas espécies os pili parecem contribuir para a adesão das bactérias ao hospedeiro. Segundo Weiser *et al.* (1998), o epitopo da fosforilcolina está presente nos pili meningocócicos (*N. meningitidis*) e gonocócicos (*N. gonorrhoeae*). Nas estirpes de *Neisseria* spp. a expressão do epitopo da fosforilcolina e a expressão dos pili exibem variação de fase. Em *S. pneumoniae* os pili parecem não apresentar variação de fase estando presentes ou ausentes nalguns serótipos.

## Regulação da flora microbiana na nasofaringe

A regulação da flora da nasofaringe merece especial atenção pois revela diferentes mecanismos de competição dos microrganismos que habitam esse nicho. O potencial competitivo dos microrganismos vai determinar qual ou quais os microrganismos que prevalecem na nasofaringe. Particular atenção incidirá no potencial competitivo de *S. pneumoniae*.

### Auto regulação da população pneumocócica

Um dos factores a considerar na regulação da população pneumocócica na nasofaringe é o fenómeno da competência e da alólise que promovem a libertação de material genético em concomitância com a morte das células que o libertam.

A transformação é um mecanismo de troca genética entre os pneumococos que implica a capacidade de adquirir ADN livre no meio, denominado competência, e a sua incorporação no genoma por recombinação. Foi pela primeira vez demonstrada *in vivo* em 1998 (Nesin et al., 1998).

A competência não é uma propriedade essencial de todos os pneumococos. Naqueles que são competentes o fenómeno é induzido por uma feromona peptídica (“competence stimulating peptide“, CSP) através de um mecanismo sensor do quorum que permite à bactéria comunicar ao nível intercelular para monitorizar a sua densidade populacional (Havarstein *et al.*, 1995; 1997).

Steinmoen *et al.* (2002) verificaram que numa população pneumocócica o ADN deve ser libertado por apenas uma pequena fracção de 5 a 20% de células, enquanto que a maior parte actua como recipiente desse ADN.

Mais tarde, em 2003, sugeriu-se que numa população competente o mecanismo usado para a libertação do ADN é sobretudo a heterólise em vez da autólise. Ou seja, a libertação de ADN é feita por células não competentes sendo promovida pelo contacto com as enzimas líticas produzidas por células competentes. As lisinas ficam provavelmente ancoradas à superfície das células competentes, mediando o contacto entre a célula competente e a não competente. É possível que a competência por heterólise possa ocorrer em simultâneo com a autólise (Steinmoen *et al.*, 2003).

Guiral *et al.* (2005), propuseram que em *S. pneumoniae* haveria um mecanismo de competência programada, a alólise, que consistia na libertação de factores de virulência por células não competentes induzida por células competentes, favorecendo a troca genética (Steinmoen *et al.*, 2002; 2003).

Os mesmos autores descreveram que a alólise é um mecanismo complexo que envolve um sistema de bacteriocinas (*cibABC*) e três hidrolases da parede celular (*cbpD*, *lytA* e *lytC*) e requer a produção de 6 genes que pertencem, à excepção do gene *lytC*, ao regulão da competência *com* (Guiral *et al.*, 2005).

### **Competição inter-específica na nasofaringe**

Os pneumococos competem com outros habitantes da nasofaringe através da expressão da enzima neuraminidase A e o peróxido de hidrogénio. Outra forma de competição é a concorrência pelos mesmos receptores no hospedeiro.

De acordo com Shakhnovich *et al.* (2002) a neuraminidase A pneumocócica remove o ácido siálico terminal nas glicoproteínas de superfície de outros habitantes da nasofaringe, nomeadamente a *N. meningitidis* e o *H. influenzae*, que pode ser um importante mecanismo de competição pelo mesmo nicho ecológico. A bactéria *N. meningitidis* e algumas estirpes de *H. influenzae* expressam a enzima sialiltransferase que adiciona ácido siálico  $\alpha$ -2,3 à galactose terminal no lipopolissacárido. As proteínas da superfície celular destas e de outras bactérias são sialiladas imitando os receptores do hospedeiro, o que pode ser vantajoso pois permite escapar à resposta imunitária.

Diferentes trabalhos sugerem que o pneumococo tem um efeito inibitório sobre o *H. influenzae* na nasofaringe que pode ser explicado pela acção da neuraminidase. Num destes estudos, realizado em 1954 por May, verificou-se que durante as fases de intensificação de bronquite crónica, quando o pneumococo estava presente, o *H. influenzae* era menos frequente. Quando o pneumococo estava ausente, o *H. influenzae* era mais frequente (Pericone *et al.*, 2000). Noutra verificou-se que a diminuição de casos de colonização e de otite média, causados por serótipos presentes na vacina 7-valente, estava associado a um aumento de cerca de 11% de casos de infecção causados por *H. influenzae* (Eskola *et al.*, 2001).

Os pneumococos produzem elevadas concentrações de peróxido de hidrogénio, pelo metabolismo aeróbio, que pode ser bactericida *in vitro* para outras espécies que habitam a nasofaringe. Num estudo de Pericone *et al.* (2000), de entre várias espécies Gram+ e Gram- testadas verificou-se que o pneumococo é o único que produz *in vitro* mais de 0.1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na fase logarítmica (DO<sub>620nm</sub> = 0,3) em condições de aerobiose.

O meio rico em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado pelo pneumococo permite a sua sobrevivência mas inibe o crescimento de outras espécies que competem pelo mesmo nicho ecológico como o *H. influenzae* e a *N. meningitidis*. O efeito bactericida do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é observável com apenas 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colónias (ufc)/ml de cultura pneumocócica. Contudo, esta concentração não é suficiente para contribuir para o efeito citotóxico observado sobre a barreira epitelial do hospedeiro (Duane *et al.*, 1993; Hirst *et al.*, 2000) que requer  $\geq 10^8$  ufc/ml, uma densidade que não deve ser atingida pelos pneumococos no estado comensal na nasofaringe (Pericone *et al.*, 2000).

A bactéria mais sensível *in vitro* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pneumocócico é o *H. influenzae*, depois a *N. meningitidis* e por fim a *M. catarrhalis*. Isto pode ser explicado pelo facto de haver uma produção diferencial de catalase nestas espécies. O *H. influenzae* exhibe a menor actividade de catalase e o *M. catarrhalis* a maior, de entre as três espécies. Se um efeito similar ocorresse *in vivo* ele poderia explicar as baixas taxas de co-infecção entre os pneumococos e o *H. influenzae* nos casos de otite média e bronquite crónica (Pericone *et al.*, 2000).

Uma outra forma de competição entre o *S. pneumoniae* e o *H. influenzae* é a disputa pelo local de ligação ao hospedeiro. Quer os pneumococos quer o *H. influenzae* expressam a estrutura de oligosacárido fosforilcolina–glucosamina– que é idêntica ao antigénio PAF. Este mimetismo facilita a evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro, e permite que as espécies utilizem as interacções receptor – ligando (das células do hospedeiro) para aderirem e atravessarem mais facilmente na células epiteliais da mucosa. Porém, a presença da mesma estrutura de ligação ao receptor PAF faz com que exista competição entre as duas espécies (Cundell *et al.*, 1995a; Mosser e Tomasz, 1970; Weiser *et al.*, 1997). Adicionalmente a fosforilcolina é imunogénica e os anticorpos gerados contra a fosforilcolina de uma espécie podem promover a eliminação de outra espécie que possua o mesmo epitopo (Briles *et al.*, 1981; Weiser *et al.*, 1998a).

Estas duas espécies podem regular a expressão de fosforilcolina de modo a escaparem ao sistema imunitário. Mas, enquanto a expressão de fosforilcolina é vital para a sobrevivência do pneumococo, no *H. influenzae* ela pode ser suprimida (Weiser *et al.*, 1998a; Yother *et al.*, 1998). Assim sendo, num meio com anticorpos contra a fosforilcolina, o *H. influenzae* pode suprimir a sua expressão e conseqüentemente escapar à resposta imunológica, mas os pneumococos podem apenas reduzir a expressão de fosforilcolina. Isto sugere que no *H. influenzae* o uso da variação da expressão da fosforilcolina como um meio de fuga ao reconhecimento imunológico é mais eficiente do que nos pneumococos, o que torna esta espécie potencialmente mais competitiva.

### **Competição intra-específica**

Num estudo realizado em Portugal apenas 11% das amostras de *S. pneumoniae* recolhidas da nasofaringe de crianças que frequentam creches continham duas estirpes distintas no perfil de PFGE e serótipo. Nessas amostras heterogéneas as estirpes minoritárias representavam entre 14 e 30% da população pneumocócica da amostra (Sá-Leão *et al.*, 2002). A colonização da nasofaringe por diferentes serótipos resulta na competição entre diferentes estirpes de pneumococos. A própria substituição dos serótipos incluídos na vacina 7-valente por outros resulta da competição entre pneumococos de serótipos distintos. Os factores que contribuem para uma maior ou menor capacidade competitiva das diferentes estirpes de *S. pneumoniae* não estão ainda totalmente esclarecidos, mas incluem o uso diferencial dos mecanismos de patogenicidade que pode resultar na capacidade de colonizar densamente a nasofaringe.

## PROFILAXIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

### Profilaxia das infecções pneumocócicas

Este sub-capítulo aborda as vacinas usadas na prevenção das infecções causadas por *S. pneumoniae*.

#### Breve história das vacinas

Na era anterior aos antimicrobianos a maior parte dos indivíduos hospitalizados com bacteriemia pneumocócica vinham a falecer. A incidência de pneumonia lobar nos trabalhadores das minas de ouro da África do Sul era muito elevada. Para que as minas não fechassem Wright, conhecido pelo seu trabalho sobre a vacina tifóide, foi contratado para conduzir ensaios clínicos em 50,000 mineiros. Em 1911, Wright e a sua equipa desenvolveram uma vacina anti-pneumocócica para imunizar este grupo. Posteriormente efectuaram-se vários ensaios clínicos sobre a segurança e eficácia das vacinas polissacarídicas, e na década de 40 duas vacinas hexavalentes foram comercializadas. Simultaneamente com a comercialização de vacinas surgiram os primeiros antimicrobianos eficazes contra os pneumococos, o que fez diminuir a prevalência da infecção pneumocócica (Austrian, 1999).

Com o aparecimento da penicilina deixou de se investir na prevenção da infecção pneumocócica porque se pensava que estas infecções eram totalmente curáveis. Na década de 50 deixaram de se comercializar vacinas anti-pneumocócicas. Quando se percebeu que as infecções pneumocócicas não eram debeláveis tentou-se criar uma nova vacina polissacarídica polivalente e, para isso, efectuaram-se ensaios clínicos que incidiram novamente nos trabalhadores das minas de ouro da África do Sul. A estimativa da eficácia da vacina foi bastante positiva, e levou à comercialização da vacina polissacarídica 14-valente em 1977 nos EUA, que foi substituída pela 23-valente em 1983 (Butler *et al.*, 1999; Austrian, 1999).

### **Resposta imunológica à vacinação**

A eficácia das vacinas contra vários tipos de *S. pneumoniae* está relacionada com a sua capacidade para induzir protecção através dos anticorpos do soro e conferir imunidade às crianças vacinadas. O efeito da vacina vai restringir a colonização da nasofaringe e, conseqüentemente, vai reduzir a transmissão de estirpes de *S. pneumoniae* das crianças vacinadas para as crianças e adultos que não foram vacinados, potencialmente reduzindo os casos de colonização e infecção na população (Kelly *et al.*, 2005).

### **Vacina pneumocócica de polissacáridos**

A vacina polissacarídica 23-valente actualmente comercializada contém antigénios contra os serótipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F (Butler *et al.*, 1999). Segundo o “Centre for Disease Control and prevention” (CDC), esta vacina cobre 85% a 90% das infecções pneumocócicas em crianças e adultos nos EUA (CDC, 1997). Para além disso pode conferir protecção contra serótipos que são serologicamente semelhantes a serótipos incluídos na vacina, devido a reacções serológicas cruzadas (Dagan *et al.*, 2002). Contudo, num estudo realizado em 1982, verificou-se que os polissacáridos 9N e 9V incluídos na vacina não induzem uma resposta imunológica satisfatória contra todos os tipos do grupo 9 (9N, 9V, 9A e 9L). Isto significa que os polissacáridos capsulares podem conferir diferentes níveis de protecção contra si próprios e contra os tipos capsulares serologicamente relacionados (Szu *et al.*, 1982).

Os antigénios capsulares induzem anticorpos específicos aos serótipos. Uma semana após a vacinação a quantidade destes anticorpos aumenta e permanece acima dos níveis de pré-vacinação por mais de 5 anos em adultos saudáveis (Musher *et al.*, 1993). Nos indivíduos com certas doenças subjacentes e nos idosos, a concentração dos anticorpos decresce mais rapidamente. Para além disto, a resposta imunológica à vacinação varia de indivíduo para indivíduo, devido em parte a factores genéticos (Musher *et al.*, 1997). Os métodos usados para medir a eficácia duma vacina incluem a quantificação dos anticorpos produzidos após a vacinação. Contudo, estes estudos não tomam em consideração nem a avidéz dos anticorpos, que mede a afinidade funcional do anticorpo ao antigénio, nem a sua actividade opsonofagocítica. Ambos os factores traduzem a actividade funcional dos anticorpos, e podem contribuir para uma melhor estimativa sobre a protecção da vacina. Segundo Anttila *et al.* (1998), os anticorpos anti-polissacárido pneumocócico com maior avidéz são mais eficazes a mediar funções protectoras, sugerindo que a imunidade contra a infecção pneumocócica depende não só da concentração dos anticorpos mas também da sua avidéz.

A eficácia da vacina polissacarídica contra infecção pneumocócica invasiva é de ~50% a 80% entre idosos com idade igual ou superior a 65 anos (Shapiro *et al.*, 1991; Domínguez *et al.*, 2005). A eficácia da vacina decresce com a idade, devido provavelmente a uma deficiente funcionalidade dos anticorpos (Shapiro *et al.*, 1991). Há diferenças relacionadas com a idade no uso do gene da região variável onde se liga o antigénio em resposta aos polissacáridos dos serótipos 4 e 14 pneumocócicos (Kolibab *et al.*, 2005; Smithson *et al.*, 2005), o que pode explicar parcialmente estas diferenças. Contudo, a prevenção da infecção invasiva em indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos demonstrou ser vantajosa em termos económicos (Ament *et al.*, 2000). É actualmente recomendada pela comissão sobre práticas de imunização do CDC, para adultos com mais de 65 anos e indivíduos com idade superior ou igual a 2 anos incluídos em grupos de risco (com doenças crónicas, com asplenia funcional ou anatómica, vivendo em ambientes nos quais o risco de infecção é elevado e imunocomprometidos com elevado risco de infecção) (CDC, 1997).

A frequência de infecção invasiva é maior durante os dois primeiros anos de vida. Infelizmente os polissacáridos da vacina pneumocócica 23-valente funcionam como antigénios independentes das células T, produzindo uma resposta imunitária limitada neste grupo, e em indivíduos com problemas imunológicos (Butler, 1997). Isto poderá explicar em parte a elevada incidência de meningite em crianças até aos dois anos (Ada e Isaacs, 2003). Assim sendo, como os polissacáridos induzem pouca memória imunológica, a duração da protecção é relativamente curta (WHO, 1999). Por outro lado, as crianças até aos 5 anos têm uma resposta mais fraca do que os adultos a alguns serótipos que frequentemente causam infecção invasiva em crianças (ex: 6A, 14, 19F e 23F) (Douglas *et al.*, 1983). Acresce que a vacina não tem um efeito significativo sobre as estirpes que colonizam a nasofaringe, não actuando sobre toda a população de *S. pneumoniae* (WHO, 1999).

A vacina de polissacáridos tem outros aspectos negativos, tais como os resultados contraditórios em relação ao nível de eficácia na prevenção da otite média nos jovens, e na pneumonia não bacteriémica nos idosos (Hausdorff *et al.*, 2000).

### **Vacina pneumocócica conjugada**

A conjugação de um polissacárido bacteriano com uma proteína transportadora induz uma resposta imunológica dependente das células T, conducente a uma maior produção de anticorpos em crianças. As células B de memória são produzidas o que leva a uma rápida e maior estimulação da produção de anticorpos, como resposta às doses subsequentes da vacina (Butler, 1997; Butler *et al.*, 1999; Whitney *et al.*, 2001). Os anticorpos contra o polissacárido capsular

são altamente opsónicos e protegem contra uma infecção pneumocócica subsequente com o mesmo serótipo (CDC, 1997). A presença de um transportador proteico foi também a forma usada para o desenvolvimento das vacinas contra a *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), que são seguras e eficazes em crianças com idade inferior a 2 anos (Butler, 1997). Na vacina conjugada 7-valente cada cápsula purificada está ligada à proteína transportadora, um variante não tóxico da toxina da difteria. A escolha de toxóides como transportadores deve-se ao facto de serem imunogénicos, e a sua ligação aos polissacáridos pode fazer-se directamente ou através de pontes de carbono (Ada e Isaacs, 2003).

A produção de uma vacina que conjuga polissacáridos pneumocócicos com uma proteína transportadora pode, potencialmente, prevenir infecções pneumocócicas em crianças. Contudo, devido à impossibilidade técnica de conjugar os 91 tipos capsulares de *S. pneumoniae*, as vacinas conjugadas têm um número limitado de antígenos (Butler, 1997), o que faz com que os indivíduos vacinados permaneçam susceptíveis a todos os serótipos não incluídos na vacina.

O desenvolvimento de uma vacina conjugada para o pneumococo envolveu a selecção de alguns serótipos prevalentes, que foram individualmente acoplados a uma proteína transportadora imunogénica, a que se seguiram estudos sobre a sua imunogenicidade e toxicidade (Obaro, 2002). O esforço inicial para a obtenção desta vacina baseou-se em dados epidemiológicos dos EUA, tendo sido identificados no período entre 1978 e 1994 os serótipos geralmente associados a meningite, bacteriémia e otite média em crianças com menos de 6 anos de idade (Butler *et al.*, 1999). Cerca de 78% das estirpes expressavam os serótipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Segundo os mesmos autores, uma vacina pneumocócica conjugada com estes serótipos poderia potencialmente prevenir 86% dos casos de bacteriémia, 83% dos casos de meningite e 65% dos casos de otite média em crianças. Contudo, a cobertura conferida pela formulação desta vacina pode variar entre regiões geográficas, devido a diferenças na distribuição dos serótipos e na frequência de doença pneumocócica. Assim sendo, espera-se uma cobertura entre 70-88% de doença invasiva pneumocócica em crianças nos EUA, Canadá, Europa (ex: Inglaterra e país de Gales), Oceânia e África e menos de 65% na América Latina e Ásia (Obaro, 2002). Para assegurar que a formulação da vacina irá ser adequada à população a ser imunizada, impõe-se um programa de vigilância da estrutura populacional de *S. pneumoniae* (Doit *et al.*, 2002), relativamente à distribuição dos tipos capsulares e às alterações do padrão de resistência aos agentes antimicrobianos (Butler, 1997).

A vacina conjugada actual, vacina 7-valente, foi introduzida pela primeira vez nos EUA no início de 2000 (Konradsen e Kaltoft, 2002) e actualmente está licenciada em vários países (Whitney *et al.*, 2001). Esta vacina é composta pelos serótipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F.

Estes serótipos são os mais prevalentes em crianças entre os 6 meses de idade e 2 anos, compreendem a maior parte das estirpes resistentes aos antimicrobianos e são mais representados em indivíduos imunocomprometidos e idosos do que adultos (Hausdorff *et al.*, 2005). Uma potencial vacina conjugada 9-valente incorporaria os serótipos da vacina 7-valente e ainda os serótipos 1 e 5 e uma vacina conjugada 11-valente incorporaria os serótipos da vacina 9-valente e ainda os serótipos 3 e 7F (Butler, 1997).

A vacina 7-valente está comercializada em Portugal desde Junho de 2001, e é recomendada pela comissão sobre práticas de imunização do CDC para todas as crianças até aos 23 meses. É ainda recomendada para crianças entre os 24 meses e os 5 anos, que pertençam a grupos de risco para doença pneumocócica, tais como as que apresentem drepanocitose e outras hemoglobinopatias, imunocomprometidas com infecção por VIH, para além das que manifestam doença crónica, que sejam nativas do Alasca, Índios ou descendentes de Africanos-Americanos, ou que frequentem uma creche (CDC, 2000).

A introdução da vacina 7-valente em diversos países teve maioritariamente efeitos benéficos. Os efeitos directos da introdução da vacina heptavalente consubstanciaram-se na redução da infecção invasiva e não invasiva, em crianças vacinadas, pelos serótipos incluídos na vacina, e na redução da frequência de colonização. Os efeitos indirectos da introdução da vacina, ou seja os benefícios que os indivíduos que não são vacinados recebem dos que foram vacinados, traduziram-se no descréscimo global da colonização e infecção causada pelos serótipos incluídos na vacina. No entanto, verificou-se o aumento da prevalência da colonização e infecção, por serótipos não incluídos na vacina, tanto na população vacinada como na não vacinada (CDC, 2005; Huang *et al.*, 2005; Hammitt *et al.*, 2006; Kyaw, *et al.*, 2006).

### **Potencial cobertura das vacinas**

A categorização dos tipos capsulares em serótipos característicos de países desenvolvidos e serótipos característicos de países em desenvolvimento anteriormente proposta não parece ser muito correcta. Mais de 70 estudos concluíram que a maioria das crianças com infecção invasiva, independentemente da região geográfica, eram portadoras de 10 serogrupos, sendo os serótipos 1 e 14 e os serogrupos 6, 19 e 23 os mais frequentes. Os mesmos serogrupos e o serótipo 3 predominaram também no grupo das crianças mais velhas e adultos (indivíduos geralmente com mais de 18 anos mas que pode compreender crianças desde os 5 anos) (Hausdorff *et al.*, 2000).

Parece, portanto, que os serótipos mais prevalentes são os mesmos em diferentes regiões geográficas. Contudo, a frequência de cada serótipo pode variar geograficamente, o que faz com que a potencial eficácia da vacina 7-valente também varie (Hausdorff *et al.*, 2000).

Por outro lado, existem variações na prevalência dos vários serótipos nas diferentes idades e manifestações das infecções pneumocócicas e os potenciais ganhos de cobertura quando se considera a mudança da vacina 7-valente para a 11-valente podem variar. Recentemente foram analisadas estirpes de diversas regiões geográficas e verificou-se que os serótipos incluídos na vacina 7-valente estão entre os mais prevalentes em crianças entre os 6 meses e os 2 anos. Abrangem, também, a maioria das estirpes resistentes aos antimicrobianos, estando mais representados nos indivíduos imunocomprometidos e nos mais idosos. Porém, os serótipos 1 e 3 incluídos na vacina 11-valente, parecem predominar nos recém nascidos (< 28 dias) e em crianças mais velhas, e estão associados a casos de pneumonia grave e peritonite, enquanto que apenas o serótipo 1 parece predominar em casos de surtos de infecção invasiva em adultos (Hausdorff *et al.*, 2005). Estudos recentes no Gana e Burkina-Faso revelaram casos de surtos de meningite causados por estirpes do serótipo 1 com genótipos similares nos dois países (Leimkugel *et al.*, 2005; Yaro *et al.*, 2006). Tendo em consideração estes resultados alguns autores defendem que a vacina conjugada 11-valente pode conferir uma protecção consideravelmente maior do que a vacina 7-valente mesmo em países onde a cobertura desta última é elevada.

### **Vacinas pneumocócicas do futuro**

As vacinas conjugadas apresentam algumas desvantagens, entre as quais o número limitado de tipos capsulares que podem ser incluídos na vacina, a produção pelo hospedeiro de uma elevada quantidade de anticorpos, específicos a apenas alguns tipos capsulares, e a possibilidade de substituição de serótipos ao longo do tempo.

Para contornar estas limitações continuam a decorrer estudos em vacinas constituídas por proteínas imunogénicas durante a colonização e comuns a todos os serótipos de pneumococos que terão potencialmente um maior impacto na prevenção da infecção (Ogunniyi *et al.*, 2000). Essas proteínas não capsulares incluem a neuraminidase, autolisina, pneumolisina, proteínas A e C de superfície (PspA e PspC), adesina A de superfície (PsaA), proteínase A putativa de maturação (PpmA), a proteína G de ligação à colina CbpG e o transportador de poliamina potD (Whitney *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2006; Shah e Swiatlo, 2006). Estas proteínas dariam potencialmente protecção contra todos os serótipos e induziriam uma resposta dependente das células T com memória imunológica (Butler *et al.*, 1999). A produção duma vacina contra as

estruturas tipo pili faria parte de uma outra estratégia, que cobriria os serótipos com maior resistência aos antimicrobianos. Por outro lado, os componentes celulares que participam na transformação foram também propostos como constituintes de uma vacina, visto que a perda de função da transformação poderia limitar a importação dos genes de resistência aos antimicrobianos, responsáveis pela síntese da cápsula ou codificando factores de virulência (Tuomanen, 1999).

Uma nova direcção inclui as vacinas de ADN compostas por um plasmídeo de ADN com um gene que codifica uma proteína imunogénica. Estas vacinas têm a vantagem de serem produzidas facilmente e de serem mais estáveis, durante o armazenamento e distribuição, do que as vacinas compostas por microrganismos inactivados ou atenuados, fracções sub-celulares ou proteínas recombinantes (Whalen, 1996).

## CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* E TERAPÊUTICA ANTIMICROBIANA

Vai ser abordada a forma como se faz o estudo epidemiológico de *S. pneumoniae*, que compreende a caracterização do fenótipo (serotipagem e determinação da resistência aos antimicrobianos) e a caracterização genómica por técnicas moleculares. Vai-se também abordar brevemente o tratamento das infecções pneumocócicas através da terapêutica antimicrobiana.

### Métodos usados na serotipagem

A serotipagem baseia-se na diversidade estrutural dos polissacáridos capsulares. O método mais comum é a tipagem baseada na reacção de Quellung usando soro de coelho contra os vários polissacáridos capsulares (ver capítulo II). Contudo, é um método dispendioso, moroso e que requer experiência para interpretar os resultados. Devido às suas desvantagens criaram-se métodos alternativos de tipagem pneumocócica que no entanto, não conseguiram ainda superar a eficácia do método convencional.

A maior parte deles são testes imunológicos, como o teste de aglutinação, usando ou estafilococos ricos em proteína A, ou usando partículas de látex cobertas com soro anti-pneumocócico, ou partículas cobertas com igG de soro de coelho (Arai *et al.*, 2001). A precipitação capilar, usando sobrenadante de cultura líquida e tipagem com soro específico, é outro método adoptado (Henrichsen, 1999). Mais recentes são os ensaios de “dot blot”, no qual as estirpes são testadas usando anticorpos primários e secundários contra serótipos ou serogrupos prevalentes (Fenoll *et al.*, 1997), e a técnica de ELISA específica ao serótipo para a detecção de 13 polissacáridos capsulares na urina (Leeming *et al.*, 2005).

Outros testes recorrem à amplificação da sequência de ADN, como a reacção de polimerização em cadeia para análise dos genes capsulares (Brito *et al.*, 2003). A digestão com enzimas do *locus* da cápsula por PCR-RFLP originando padrões genéticos específicos a cada serótipo (Batt *et al.*, 2005) é um outro método utilizado. Finalmente, a pirosequênciação é uma

técnica de sequenciação do ADN em tempo real, que permite detectar o pirofosfato inorgânico resultante da incorporação de nucleótidos pela polimerase de ADN. Esta técnica possibilita diferenciar os serótipos 6A e 6B que têm um polimorfismo num nucleótido no *locus* do polissacárido capsular (Pai *et al.*, 2005b).

## **Antimicrobianos: Mecanismos de acção e resistência de *S. pneumoniae***

A classificação dos antimicrobianos potencialmente usados no tratamento de infecções por *S. pneumoniae* ou utilizados como marcadores clássicos vai ser feita de acordo com o seu efeito na bactéria. Segue-se a descrição dos antimicrobianos, o seu mecanismo de acção e resistência, e a base genética da resistência aos antimicrobianos.

### **i) Inibidores da síntese proteica**

#### **Macrólidos, lincosamidas e estreptograminas**

Os macrólidos são anéis de lactonas de 14 (eritromicina e claritromicina), 15 (azitromicina) ou 16 (josamicina, espiramicina e tilosina) átomos ligados a açúcares via ligações glicosídica (Roberts *et al.*, 1999).

O primeiro macrólido introduzido no mercado foi a eritromicina em 1952. Os novos derivados têm uma penetração intracelular e tecidual melhorada, uma maior estabilidade e uma menor interacção com os outros agentes antimicrobianos (Roberts *et al.*, 1999).

Estes compostos inibem a síntese proteica estimulando a dissociação da molécula de peptidil-tRNA dos ribossomas durante o processo de alongação, o que resulta na terminação precoce da síntese da cadeia peptídica (Roberts *et al.*, 1999). A sua acção é bactericida para a maioria das bactérias gram-positivas (Prescott *et al.*, 1996).

A quinupristina e a dalfopristina são derivados das estreptograminas pristinamicina IA e IIB (Fekety, 2000). Cada derivado exerce uma actividade antibacteriana limitada e bacteriostática contra os pneumococos mas, em conjunto, exercem uma actividade acrescida resultante de um efeito sinérgico e têm um efeito bactericida (Kaplan e Mason, 1998; Fekety, 2000). Estes compostos inibem a síntese proteica ligando-se irreversivelmente a diferentes locais da subunidade 50S do ribossoma. A quinupristina inibe a alongação, enquanto que a dalfopristina interfere com a peptidil transferase (Fekety, 2000).

A resistência dos microrganismos aos macrólidos deve-se à acção do gene *erm* ("erythromycin ribosome methylase") que codifica a enzima adenina-N<sup>6</sup>-metiltransferase que adiciona um ou dois grupos metil a uma adenina na molécula 23S do rRNA. Contudo, o local de ligação da eritromicina na subunidade 50S ribossómica sobrepõe-se ao local de ligação dos novos macrólidos e dos antibióticos estruturalmente não relacionados com os macrólidos, como as lincosamidas (sendo a clindamicina a mais comum) e a estreptogramina B. Os microrganismos que possuem o gene *erm* são portanto resistentes aos macrólidos, lincosamidas e à estreptogramina B, resultando no fenótipo MLS<sub>B</sub> (Roberts *et al.*, 1999). Nos pneumococos, para além de se encontrar o fenótipo MLS<sub>B</sub> [( frequentemente devido à presença do gene *erm(B)*] em que as estirpes exibem uma resistência elevada aos macrólidos, ocorre também o fenótipo M cujas estirpes exibem uma resistência baixa ou intermédia aos macrólidos com anéis de 14 e 15 membros, devido à acção dos genes *mef* ("macrolide efflux pump") que actuam através do efluxo do agente antibacteriano para fora da célula (Low, 2002). O gene *mefA* é geralmente encontrado em estirpes clones de England<sup>14-9</sup> e é transportado por um transposição Tn1207.1 (Santagati *et al.*, 2000). O gene *mefE* que se encontra em diferentes serótipos e clones situa-se num elemento com cerca de 5,5 kb MEGA ("macrolide efflux genetic assembly") (del Grosso *et al.*, 2002). Quer o *mef(A)* e *mef(E)* fazem parte dum operação que inclui o gene *mel* a jusante (Santagati *et al.*, 2000; Gay e Stephens, 2001). Segundo Ambrose *et al.* (2005), o sistema de efluxo em *S. pneumoniae* é um sistema duplo que requer a acção dos genes *mef(E)* e *mel* para conferir resistência elevada aos macrólidos.

Recentemente um novo gene *mef(I)* foi descrito em duas estirpes do serótipo 11A (Cochetti *et al.*, 2005). Outros mecanismos de resistência foram descobertos em apenas algumas estirpes. Estes mecanismos incluíam mutações numa região altamente conservada no domínio V na molécula 23S do rRNA e nas proteínas ribossómicas L4 e L22 (Reinert *et al.*, 2003).

Os dois fenótipos podem-se distinguir por métodos laboratoriais através da avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Gill *et al.*, 2000). O fenótipo MLS<sub>B</sub> é detectado pela resistência à eritromicina e à clindamicina, enquanto que o fenótipo M é detectado pela resistência à eritromicina e susceptibilidade à clindamicina (Roberts *et al.*, 1999).

As estirpes que possuem os dois determinantes de resistência, *erm(B)* e *mef(A)*, constituem, na maioria dos países, menos de 3% dos casos. O fenótipo destas estirpes não se distingue do das estirpes que possuem apenas o gene *erm(B)*, usando para o efeito as técnicas laboratoriais descritas (Low, 2002). Para além do gene *erm(B)* foram detectados no género *Streptococcus* mais genes de resistência à eritromicina [(*erm(A)*, *erm(C)*, *erm(F)* e *erm(Q)*] (Roberts *et al.*, 1999).

O fenótipo de resistência MLS<sub>B</sub> é mais prevalente na Europa, Japão e África do Sul, enquanto o fenótipo M predomina nos EUA e Canadá (Melo-Cristino *et al.*, 2003).

### Tetraciclinas

Os primeiros membros da classe das tetraciclinas a serem descobertos foram a clorotetraciclina e oxitetraciclina no final de 1940. As tetraciclinas são compostos que consistem em quatro anéis hexaméricos fundidos. A investigação destes agentes produziu três gerações de tetraciclinas. A primeira (1948 a 1963) é constituída por compostos naturais, e a segunda (1965 a 1972), que inclui quer tetraciclinas naturais quer semi-sintéticas. Da terceira geração fazem parte as glicilciclinas, cujo desenvolvimento se deveu à descoberta dos mecanismos de resistência à tetraciclina (Chopra e Roberts, 2001).

A sua acção bacteriostática deve-se à ligação do agente à subunidade 30S ribossomal que leva à perturbação da estrutura do local A (aceitador) do ribossoma. Esta perturbação, ao impedir o alinhamento do terminal aminoacil do tRNA com o codão do mRNA, inibe a síntese proteica (Standiford, 2000).

As estirpes do género *Streptococcus* podem exibir um dos genes de protecção ribossomal *tetM*, *tetO*, *tetT*, e *tetQ*, sendo o gene *tetM* mais comum do que o gene *tetO* em *S. pneumoniae* (Doherty *et al.*, 2000). A resistência à tetraciclina é conferida pela presença de um ou de ambos os genes *tetO* e *tetM* em *S. pneumoniae*. Estes genes codificam proteínas citoplasmáticas que reduzem a susceptibilidade do ribossoma à acção da tetraciclina e conferem ainda resistência contra a doxiciclina e minociclina (Chopra e Roberts, 2001). Os genes *tetQ* e *tetM* estão frequentemente associados a um transposição que transporta um gene *erm*. Em *S. pneumoniae* o gene *tetM* encontra-se geralmente associado ao gene *erm(B)* no transposição Tn1545, o que explica o facto da resistência à tetraciclina estar frequentemente associada à resistência à eritromicina (Roberts *et al.*, 1999). Este transposição pertence a uma classe representada pelo Tn916 que codifica a resistência mediada pelo *tetM* à tetraciclina mas não à eritromicina. Um elemento central na biologia destes transposões é a integrase (*int*) e a excisionase (*exc*) que medeiam a transferência dos genes para a bactéria (Clewell *et al.*, 1995). A variação alélica do gene da integrase (*int*) foi sugerida como ferramenta para monitorizar o movimento e a biologia populacional destes transposões (Doherty *et al.*, 2000). A localização do gene *tetO* deve ser cromossomal não se conhecendo qual o elemento genético ao qual está associado.

Os genes de efluxo *tetK* e *tetL* também se encontram no género *Streptococcus*. Estes codificam proteínas associadas à membrana que bombeiam a tetraciclina para fora da célula, de modo que a concentração intracelular deste agente não afecte o ribossoma da bactéria. Estes

genes encontram-se geralmente em pequenos plasmídeos e os seus produtos não conferem resistência contra a minociclina e as glicilciclinas (Chopra e Roberts, 2001).

### **Cloranfenicol**

O cloranfenicol foi o primeiro antibiótico de largo espectro a ser descoberto (Wilcox, 1997) e cuja produção em larga escala foi relativamente económica (Standiford, 2000). Parece entrar na célula por um processo dependente de energia e, uma vez no citoplasma, inibe a síntese proteica. Este composto liga-se reversivelmente à subunidade 50S do ribossoma num local que impede a ligação do terminal aminoacil do tRNA ao ribossoma. A inibição da síntese proteica desencadeia um efeito bacteriostático contra a maior parte dos microrganismos sensíveis. Contudo, este agente é bactericida contra *S. pneumoniae* (Standiford, 2000). O cloranfenicol, embora tenha um espectro de acção vasto, é tóxico devido à sua acção no ribossoma 70S existente nas mitocôndrias dos mamíferos, tendo por isso um uso limitado (Prescott *et al.*, 1996; Standiford, 2000).

O mecanismo de resistência ao cloranfenicol deve-se à presença da enzima cloranfenicol acetiltransferase, codificada pelo gene *cat* (Schrag *et al.*, 2000), que acetila o antibiótico originando um derivado diacetil inactivo (Standiford, 2000) que se encontra, por exemplo, no transposão Tn5252 (Ayoubi *et al.*, 1991). Um outro mecanismo de resistência deve-se a mutações nos genes responsáveis pela subunidade do rRNA, que levam a uma diminuição da afinidade dos ribossomas para o composto antimicrobiano (Salyers e Whitt, 2001).

### **Oxazolidinonas**

As oxazolidinonas, como o linezolid, são uma classe de antibióticos bacteriostáticos obtidos por síntese orgânica. A molécula inicial foi manipulada até ao desenvolvimento de dois agentes: eperezolid e linezolid (Donowitz, 2000).

O seu mecanismo de acção é único e envolve a inibição de um passo inicial da síntese proteica. Estes agentes ligam-se à subunidade 50S do ribossoma, provavelmente no mesmo local de ligação do cloranfenicol e lincosamidas. Contudo, ao contrário destes, as oxazolidinonas não interferem com a elongação peptídica e não inibem a formação do complexo com o tRNA iniciador. Pensa-se que se ligam à subunidade 50S num local perto da interface com a subunidade 30S, resultando em alterações que evitam a formação do complexo de iniciação 70S, bloqueando assim o início da síntese proteica (Donowitz, 2000).

O mecanismo de acção das oxazolidinonas é diferente da dos outros antimicrobianos, o que resulta na inexistência de resistência cruzada. Em 2005, verificou-se que a obtenção *in vitro* da resistência ao linezolid era mais rápida quando as estirpes susceptíveis, ou com resistência

intermédia à penicilina, eram resistentes à eritromicina, mais do que quando as estirpes eram susceptíveis à eritromicina (Carsenti-Dellamonica *et al.*, 2005).

## ii) Inibidores da parede celular

### $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem um grupo de agentes que têm em comum, na sua estrutura química, um anel  $\beta$ -lactâmico que é essencial para a actividade antibacteriana. As cadeias laterais determinam parte do espectro antibacteriano, e as propriedades farmacológicas de cada um dos compostos (Chambers, 2000). Incluem uma grande variedade de agentes tais como as penicilinas (penicilina e amoxicilina), as cefalosporinas de segunda geração como a cefuroxima, e de terceira geração como a cefotaxima e a ceftriaxona.

Há quatro grupos ou gerações de cefalosporinas que diferem no seu espectro de actividade. Todas elas, com excepção da primeira geração, têm actividade anti-pneumocócica. A primeira geração de cefalosporinas é a de maior actividade contra as bactérias Gram positivas, embora não apresente actividade significativa contra *S. pneumoniae*. As cefalosporinas de segunda geração têm uma actividade variada contra bactérias Gram positivas e uma actividade acrescida contra bactérias Gram negativas. As de terceira geração são mais activas contra as bactérias Gram negativas. Na quarta geração incluem-se compostos que têm actividade contra cocos Gram positivos e uma variedade de bactérias Gram negativas (Karchmer, 2000).

O mecanismo de acção dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos consiste em bloquear o último passo da síntese da parede celular, o que é possível devido à semelhança estrutural do substrato natural das proteínas de ligação à penicilina "Penicillin Binding Proteins" (PBPs) e o antibiótico (inibição competitiva). *S. pneumoniae* contem seis PBPs, cinco das quais (2x, 2B, 1A, 1B e 2A) têm elevado peso molecular e um domínio transpeptidase com um papel importante na síntese da parede celular, enquanto que a PBP3, de baixo peso molecular, é uma carboxipeptidase que deve regular o grau de interligação do peptidoglicano. Estas proteínas catalisam a transpeptidação e transglicosilação dos constituintes da parede celular. Os  $\beta$ -lactâmicos bloqueiam a síntese de peptidoglicano pela inactivação simultânea de múltiplas proteínas de ligação à penicilina principalmente as de elevado peso molecular, resultando na estimulação de enzimas endógenas autolíticas, as autolisinas, que degradam o peptidoglicano da parede celular bacteriana (Prescott *et al.*, 1996; Chambers, 2000; Salyers e Whitt, 2001).

Um dos mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos é a produção de enzimas do tipo  $\beta$ -lactamase que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico inactivando o agente. Um outro mecanismo, este utilizado por *S. pneumoniae*, consiste na alteração do alvo do antibiótico, as

proteínas de ligação à penicilina. A acumulação de múltiplas mutações, frequentemente em mais do que um dos genes das PBPs, faz diminuir a afinidade destas proteínas para a maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Hakenbeck *et al.*, 1980). Uma mutação pode não ser suficiente para a sobrevivência do pneumococo e, embora as PBPs não se encontrem próximas no cromossoma, várias PBPs podem ser transformadas simultaneamente *in vitro* (Muñoz *et al.*, 1992). O operão MurMN, envolvido na síntese de um substrato alternativo para as PBPs, é requerido para a expressão da resistência mediada pelos PBPs. Mutações neste operão podem conferir elevada resistência à penicilina e cefalosporinas (Smith e Klugman, 2001). A transferência destes genes mutados entre espécies do mesmo género ou entre géneros (*Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*) é um outro importante mecanismo de disseminação de resistência (Chambers, 2000). Isto indica-nos que a acumulação de mutações pontuais e a recombinação tiveram um papel importante na evolução da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *S. pneumoniae* (Maiden, 1998).

As PBPs 2x, 2B e 1A alteradas são as que mais contribuem para uma elevada resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Reichmann *et al.*, 1996). A elevada resistência às cefalosporinas de terceira geração é mediada apenas pela alteração das PBPs 1A e 2x (Muñoz *et al.*, 1992). O nível da resistência cruzada à penicilina e cefalosporinas depende do número e localização das alterações destas proteínas (Maiden, 1998). A proteína PBP2x é essencial na síntese do peptidoglicano e na divisão celular (Morlot *et al.*, 2003), e é a primeira PBP a sofrer alterações no desenvolvimento da resistência à penicilina e cefalosporinas (Reichmann *et al.*, 1996; Smith e Klugman, 2005). Recentemente verificou-se que numa estirpe com elevada resistência à penicilina e à cefotaxima, um conjunto de seis substituições de amino ácidos na PBP2x eram essenciais para conferir essa elevada resistência (Smith e Klugman, 2005). Por outro lado, apenas alguns autores identificaram os PBPs 1B, 2A e 3 como determinantes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. As proteínas 2x, 2B e 1A alteradas são codificadas por genes com uma organização em mosaico nos quais porções dos genes foram substituídas por variantes alélicas que diferiam até cerca de 25% na sequência de ADN (Hakenbeck, 2000). Há também evidência de mosaicismo no gene *murM* e, possivelmente, no gene *pbp2a* (Chesnel *et al.*, 2005) e *nanA* (King *et al.*, 2005). A maioria dos genes mosaicos descritos até à data deve ter surgido como resultado de transformação usando ADN heterólogo (Maiden, 1998).

Outro mecanismo de resistência foi identificado em estirpes de laboratório onde a resistência é acompanhada por uma deficiência ao nível da transformação associada a mutações fora dos genes das PBPs. Um destes genes codifica para a proteína CpoA, uma suposta glicosiltransferase, e outro para a CiaH, uma proteína cinase de histidina. Estão provavelmente envolvidos na biossíntese da parede celular numa fase anterior à que envolve as PBPs. O gene

*ciaH* faz parte do sistema de transdução de sinal *ciaRH* que inclui um gene regulador *ciaR*. Mutações no gene *ciaH* resultam na estimulação da produção de bactoprenol e na repressão da expressão do locus da competência *com*. O bactoprenol é um transportador lipídico responsável pelo transporte dos precursores da parede para o folheto externo da membrana citoplasmática. A proteína CpoA poderá estar envolvida na síntese de ácido teicóico o que também poderá afectar a disponibilidade do bactoprenilfosfato para participar na biossíntese do peptidoglicano. Não se sabe se a operação *cpoA* e se o sistema *cia* têm uma função no desenvolvimento da resistência *in vivo* conferindo protecção contra os inibidores da parede celular (Hakenbeck *et al.*, 1999).

O sistema *ciaRH* é activado durante o estado de competência e na fase estacionária onde parte da população sofre lise, sendo necessário para controlar a lise induzida pela competência e para as células saírem do estado de competência (Guiral *et al.*, 2005). Recentemente verificou-se que nas estirpes resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos com mutações no gene *pbp2x*, o sistema *ciaRH* evita a acção deletéria destas mutações e diminui a autólise. Quando o sistema está inactivado não confere protecção contra estes efeitos nem contra os efeitos dos inibidores da parede celular, tais como os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, resultando na lise da bactéria (Mascher *et al.*, 2006).

Embora a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tenha aumentado, certos agentes desta classe continuam a ser activos contra estirpes que apresentam um baixo nível de resistência. Com base nestas observações o “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI) introduziu em 2002 novas concentrações críticas (“breakpoints”) para a amoxicilina, cefotaxima e ceftriaxona, que se mantêm em 2006, o que fez diminuir o número de estirpes que seriam classificadas como resistentes e intermédias (Low, 2002).

### **Glicopéptidos**

A descoberta da vancomicina surgiu num programa iniciado na década de 50 com o intuito de tratar infecções por *Staphylococcus* resistentes à penicilina. Em 1952 isolou-se a espécie *Streptomyces orientalis* produtora duma substância activa contra bactérias Gram positivas. Mais tarde, esta substância foi purificada e nomeada vancomicina. Em 1958 este antimicrobiano foi aprovado, sendo posteriormente publicados estudos que confirmaram a sua eficácia. Devido à sua toxicidade a vancomicina foi reservada apenas para infecções com bactérias resistentes a outros antimicrobianos (Levine, 2006).

A vancomicina é um complexo glicopeptídico solúvel (Fekety, 2000) que forma um complexo com o precursor do peptidoglicano da parede celular, ligando-se à porção D-Ala-D-Ala do UDP-muramil-pentapéptido após este ter sido transferido do citoplasma celular para o exterior, impedindo a sua ligação à cadeia nascente do peptidoglicano. Esta ligação resulta na

inibição dos dois passos finais da síntese da parede celular: a transglicosilação e a transpetidação necessárias para a polimerização dos peptidoglicanos (Woodford *et al.*, 1995; Fekety, 2000). Este agente antibacteriano pode ainda desregular a síntese de ARN por um mecanismo desconhecido, e afectar a viabilidade dos protoplastos (células bacterianas sem parede celular) através da alteração da permeabilidade das suas membranas citoplasmáticas (Fekety, 2000).

A vancomicina liga-se eficientemente ao alvo e exerce um efeito bactericida imediato. Os mecanismos de acção da vancomicina, únicos e variados, contribuem para a baixa frequência do desenvolvimento de resistência a este composto antimicrobiano, ao qual *S. pneumoniae* é universalmente susceptível (Fekety, 2000). O gene *vncS* parece estar relacionado com a tolerância à vancomicina em *S. pneumoniae* (Schrag *et al.*, 2000).

Existem estirpes epidémicas multiresistentes [resistentes a três ou mais antimicrobianos de classes farmacológicas distintas (Finch, 2002)] nas quais a vancomicina é o único agente capaz de actuar (Levine, 2006). O seu uso frequente pode ameaçar, a longo prazo, a eficácia da vancomicina contra *S. pneumoniae* (File, 2002).

A vigilância da susceptibilidade de *S. pneumoniae* às cefalosporinas de terceira geração e à vancomicina é essencial devido ao seu uso na terapêutica dos casos de meningite, em que se suspeita que o agente etiológico possa ser *S. pneumoniae* com susceptibilidade diminuída à penicilina, situação em que a escolha de outros antimicrobianos é muito limitada devido à necessidade de se alcançarem concentrações eficazes no líquido cefalorraquidiano.

### **iii) Inibidores do metabolismo do ácido nucleico**

#### **Fluoroquinolonas**

A primeira quinolona antibacteriana a ser introduzida no mercado em 1960 foi o ácido nalidíxico. As modificações químicas à estrutura central deste ácido levaram ao desenvolvimento de outras quinolonas (ácido pipemídico, ácido oxolínico e flumequina) que formam, em conjunto com o ácido nalidíxico, as quinolonas de grupo I ou de "espectro limitado". Em 1970 apostou-se na produção de congéneres mais potentes. Através da adição dum grupo piperazina ao ácido nalidíxico combinado com um átomo de flúor produziram-se as fluoroquinolonas norfloxacin e ciprofloxacina. Estas, em conjunto com a ofloxacina, levofloxacina (isómero activo da ofloxacina) e outras fluoroquinolonas, constituem as quinolonas de grupo II ou de "espectro alargado" introduzidas no mercado entre 1980 e 1990 (Read *et al.*, 2002). As fluoroquinolonas de grupo II têm actividade contra *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus* spp. e contra outros microrganismos que causam pneumonia "atípica" tal como *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., e *Legionella* spp.

(Moellering, 2002; Read *et al.*, 2002). Com exceção da levofloxacina, e possivelmente da ciprofloxacina, as quinolonas do grupo II têm uma actividade limitada sobre a *S. pneumoniae* (Read *et al.*, 2002).

Em 1990 surgiram as quinolonas de grupo III ou "fluoroquinolonas respiratórias" (Read *et al.*, 2002) com actividade melhorada contra a *S. pneumoniae* e microrganismos anaeróbios (Coyle *et al.*, 2001; Read *et al.*, 2002). Neste grupo incluem-se a moxifloxacina e a gatifloxacina. Está a ser estudada a eficácia clínica destas duas quinolonas em infecções causadas por estirpes de *S. pneumoniae* resistentes aos macrólidos e  $\beta$ -lactâmicos (Read *et al.*, 2002).

Ao contrário dos macrólidos e dos  $\beta$ -lactâmicos as quinolonas não demonstram uma associação com resistência a outras classes de agentes antibacterianos (Read *et al.*, 2002).

De acordo com os valores da CIM<sub>90</sub> (a CIM que inibe 90% das estirpes estudadas) obtidos para o pneumococo, as quinolonas com maior actividade são por ordem decrescente: moxifloxacina > gatifloxacina > levofloxacina = ciprofloxacina (Brueggemann *et al.*, 2002).

As quinolonas actuam através da inibição das enzimas bacterianas, ADN girase (topoisomerase II) e ADN topoisomerase IV, envolvidas no superenrolamento e na decatenação (separação de moléculas de ADN) cromossómica durante a replicação (Brueggemann *et al.*, 2002). A sua inibição resulta na inibição da síntese de ADN. Embora não totalmente compreendido, a formação do complexo entre topoisomerases, ADN e quinolonas resulta na libertação da cadeia dupla de ADN cortada, o que é letal para a bactéria (Read *et al.*, 2002).

As primeiras referências sobre resistência às fluoroquinolonas apareceram nos anos 80 após a introdução da ciprofloxacina (Low, 2002). A resistência às quinolonas deve-se a mutações nos genes que codificam as subunidades das topoisomerases: *gyrA* e *gyrB* para a topoisomerase II e *parC* e *parE* para a topoisomerase IV (Read *et al.*, 2002). As mutações nestes genes ocorrem espontaneamente com uma frequência de 1 em 10<sup>6</sup> bactérias a 1 em 10<sup>9</sup> bactérias (Davidson *et al.*, 2002).

Num estudo realizado por Brueggemann *et al.* (2002), as estirpes de *S. pneumoniae* com mutações no gene *parC* eram resistentes apenas à ciprofloxacina, enquanto que as estirpes isoladas com mutações no gene *gyrA*, ou em ambos os genes *parC* e *gyrA*, eram resistentes a todas as fluoroquinolonas testadas (ciprofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina). Este trabalho veio confirmar que a mutação dos dois genes está na base da resistência de *S. pneumoniae* a um maior número de fluoroquinolonas. Demonstrou-se ainda que a elevada resistência às fluoroquinolonas requer mutações em ambos os genes (Janoir *et al.*, 1996).

A resistência às fluoroquinolonas desenvolve-se dum modo gradual. Estudos de inibição da topoisomerase sugerem que a topoisomerase IV é o primeiro alvo para todas as fluoroquinolonas em microrganismos Gram positivos (Coyle *et al.*, 2001). Recentemente foi revelado que em *S. pneumoniae* a topoisomerase IV é o primeiro alvo para a ciprofloxacina (Pan *et al.*, 1996; Tankovic *et al.*, 1996; Brueggemann *et al.*, 2002), e que a ADN girase é o primeiro alvo para a levofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina (Brueggemann *et al.*, 2002). Foi igualmente sugerido que a falha no tratamento com fluoroquinolonas se deve a estirpes que possuem desde logo a mutação no primeiro alvo, e que aquando da exposição ao antimicrobiano a mutação no segundo alvo é rapidamente seleccionada, originando elevada resistência às fluoroquinolonas (Fuller e Low, 2005).

Os “breakpoints” actualmente usados para determinar a resistência às fluoroquinolonas em *S. pneumoniae* não são adequados para detectar estirpes que têm apenas mutações em *parC*. Assim sendo, há autores que sugerem a diminuição dos valores dos “breakpoints” e o uso duma segunda fluoroquinolona, a ciprofloxacina, como marcador da resistência (Schurek *et al.*, 2006).

O gene *pmrA* identificado em 1999 (Gill *et al.*, 1999) pode codificar um sistema de efluxo de quinolonas em *S. pneumoniae*, e é outro mecanismo de resistência às quinolonas. Contudo, este sistema de efluxo é reduzido ou ineficaz contra as quinolonas do grupo III e contra a levofloxacina (Read *et al.*, 2002). Para além da proteína codificada pelo gene *pmrA*, algumas experiências sugerem a existência em *S. pneumoniae* de outros sistemas de efluxo, codificados por outros genes, que estarão também associados à resistência às fluoroquinolonas (Brenwald *et al.*, 1998; 2003).

No futuro, as modificações químicas ao núcleo das quinolonas podem ainda resultar em antimicrobianos mais potentes, com maior penetração no sistema nervoso central e no líquido cefalorraquidiano, e contra um maior número de bactérias (Andriole, 2005).

#### **iv) Inibidores da síntese do ácido fólico: antagonistas metabólicos**

##### **Trimetoprim**

Trimetoprim é um composto de pirimidina, e foi sintetizado como um inibidor da enzima dihidrofolato reductase para potenciar a actividade das sulfonamidas, através da inibição sequencial da via de síntese do ácido fólico (Zinner e Mayer, 2000). A enzima dihidrofolato reductase é a enzima responsável pelo passo seguinte da síntese de ácido fólico após o passo enzimático bloqueado pelas sulfonamidas. O trimetoprim interfere com a conversão do dihidrofolato para tetrahidrofolato, o precursor do ácido fólico e composto essencial para a subsequente síntese de ácidos nucleicos (Zinner e Mayer, 2000).

Os mecanismos de resistência bacterianos ao trimetoprim incluem alterações na permeabilidade celular, a perda da capacidade de ligação do agente ao alvo e a sobre-produção da enzima dihidrofolato reductase (Zinner e Mayer, 2000), codificada pelo gene *dhf* (Schrag *et al.*, 2000). A produção de grandes quantidades de dihidrofolato reductase com baixa afinidade para o antimicrobiano, mediada por plasmídeos, é o mecanismo de resistência mais importante (Zinner e Mayer, 2000).

### **Sulfonamidas**

As sulfonamidas são derivados da sulfanilamida cuja estrutura química é similar ao ácido para-aminobenzóico (PABA), um composto envolvido na síntese do ácido fólico.

As sulfonamidas inibem competitivamente a incorporação de PABA no ácido tetrahydropteróico, bloqueando a produção de pteridinas e consequentemente a de ácidos nucleicos (Zinner e Mayer, 2000).

A resistência bacteriana é devida a mutações que resultam na sobre-produção de PABA, ou na alteração da estrutura da enzima dihidropteroato sintetase que reduzem a sua afinidade para a sulfonamida (Zinner e Mayer, 2000).

A associação destes fármacos, trimetoprim (bactericida) e as sulfonamidas (bacteriostáticas) numa mistura chamada cotrimoxazol, reforça a inibição da síntese de ácidos nucleicos, que leva à paragem do crescimento ou à morte da bactéria (Precott *et al.*, 1996; Salyers e Whitt, 2001).

### **Base genética da resistência do *S. pneumoniae***

O pneumococo adquire resistência à maior parte dos antibióticos por transformação (implica a entrada de ADN livre na célula, ADN esse que muitas vezes pertence a espécies relacionadas e que é incorporado no cromossoma bacteriano por recombinação homóloga) ou por transferência de transposões (segmentos de ADN que frequentemente codificam para resistência a antibióticos e para funções de auto-transferência). Duas exceções são a resistência ao cotrimoxazol e a resistência às fluoroquinolonas, que parecem resultar da acumulação de mutações pontuais (Schrag *et al.*, 2000; Alou *et al.*, 2001).

O grau de resistência de cada estirpe aos antimicrobianos varia, e é medido pela CIM do antibiótico. Diferentes CIMs relacionam-se com diferentes alterações genéticas. A resistência intermédia a  $\beta$ -lactâmicos pode resultar, por exemplo, de uma só transformação envolvendo os genes *pbp*, enquanto que a resistência elevada resulta de transformações sequenciais que poderão ter sido precedidas por mutações pontuais (Schrag *et al.*, 2000).

## Disseminação da resistência aos antimicrobianos

A escolha do antibiótico a usar é muitas vezes empírica e pode veicular um aumento da resistência aos antimicrobianos, quer no indivíduo quer na comunidade. Neste sub-capítulo vamos perspectivar os estudos de monitorização da resistência em *S. pneumoniae*, principalmente a resistência às três classes de antimicrobianos geralmente usados no tratamento anti-pneumocócico, realizados em diferentes países e em Portugal. Abordaremos também o problema da frequência de creches na dispersão de *S. pneumoniae*.

### Condicionalismos da terapêutica anti-pneumocócica

Na terapêutica das infecções pneumocócicas a escolha do antibiótico a usar é muitas vezes empírica, porque no momento da prescrição raramente se conhece a identificação do agente etiológico e a sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Uma política mais restritiva na prescrição dos agentes antimicrobianos (Konradsen e Kaltoft, 2002), e também o uso adequado desses agentes na dose e no período correctos, é provavelmente a melhor maneira de evitar a selecção e a disseminação da resistência aos antibióticos (Schito, 2002).

### Antibióticos e resistência

Os antibióticos ao serem administrados eliminam bactérias susceptíveis que fazem parte da flora comensal da nasofaringe, que de outro modo poderiam limitar a expansão dos microrganismos patogénicos e, simultaneamente, favorecem o crescimento das bactérias comensais resistentes. A proliferação destas bactérias resistentes pode ser nociva, uma vez que os seus genes de resistência podem transmitir-se às bactérias patogénicas (Levy, 1998).

Apesar da relação entre as alterações na prevalência de microrganismos resistentes e o uso de antibióticos ser difícil de estabelecer, há um consenso geral e indicações substanciais de que o uso terapêutico e profilático do antibiótico está associado à emergência de microrganismos resistentes, quer no hospital quer na comunidade (Melo-Cristino, 1999). Em 2001, conseguiu-se correlacionar significativamente a resistência a certos antimicrobianos, nomeadamente aos macrólidos e ao cotrimoxazol, com o seu uso (Pihlajmaki *et al.*, 2001).

Os antibióticos ao afectarem a população bacteriana do indivíduo também a afectam na comunidade em que o indivíduo está integrado. Verificou-se que o consumo elevado de

antibióticos nos hospitais, centros de saúde e até em explorações agro-pecuárias, onde os antibióticos não são geralmente prescritos por razões terapêuticas, faz aumentar o número de bactérias resistentes na comunidade. A disseminação de microrganismos resistentes está ainda facilitada pelas frequentes deslocações dos seus hospedeiros humanos (Levy, 1998).

O uso recente de antibióticos aumenta quer o risco de transmissão de pneumococos resistentes, quer o desenvolvimento de doença invasiva causada por estirpes resistentes. A relação entre o uso recente de antibióticos e o risco de um indivíduo ser portador de estirpes resistentes pode dever-se a três mecanismos: o aumento da densidade de um clone resistente que está presente na nasofaringe antes do uso do antimicrobiano, a substituição de pneumococos sensíveis por pneumococos resistentes adquiridos na comunidade durante ou após a terapêutica e, finalmente, a evolução dentro do próprio hospedeiro de uma população de pneumococos resistentes devido à pressão selectiva do antimicrobiano (Schrag *et al.*, 2000).

A resistência aos antibióticos varia grandemente com a localização geográfica, com o agente antimicrobiano e com a variação local no seu uso. Como exemplo, em 20 anos de uso da ceftriaxona não se desenvolveu resistência significativa a este antibiótico  $\beta$ -lactâmico no pneumococo, talvez porque este agente está disponível apenas por via parentérica, o que significa que há um maior controlo sobre a dose dada ao doente (Schito, 2002). Em Itália, onde se verifica uma menor resistência à penicilina quando comparada com outros países mediterrâneos (Felmingham *et al.*, 2000), há uma preferência pelo uso de cefalosporinas injectáveis de terceira geração em certas infecções (Schito, 2002).

Nos EUA a resistência aos antimicrobianos em *S. pneumoniae*, com excepção da resistência às fluoroquinolonas, está a decrescer. São apontadas algumas razões para o sucedido que deverão ser tomadas como exemplos a seguir. As campanhas para encorajar o uso mais apropriado dos antibióticos; o aumento do uso das vacinas anti-pneumocócicas; a menor prevalência das infecções respiratórias causadas por vírus que teve como resultado um decréscimo das infecções causadas por *S. pneumoniae* e conseqüentemente numa menor pressão selectiva associada ao uso de antibióticos; finalmente, o aumento do uso das fluoroquinolonas fez decrescer o uso dos outros antimicrobianos e da resistência a eles associada (Doern *et al.*, 2005).

### **i) Penicilina**

A penicilina (antibiótico  $\beta$ -lactâmico) é o antimicrobiano de eleição porque os pneumococos parecem ser uma das bactérias patogénicas mais vulneráveis à penicilina (Bryan, 1999). Contudo, estirpes com resistência elevada à penicilina definida por uma CIM  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  (CLSI, 2006) pode não constituir uma ameaça nas infecções não meníngeas, mas na meningite as

estirpes com elevada resistência à penicilina não respondem ao tratamento com este antibiótico (Schito, 2002). A classe das estirpes com resistência intermédia à penicilina é definida por uma CIM entre 0,12 µg/ml e 1 µg/ml (CLSI, 2006). Na terapêutica de infecções, nas quais se suspeita poderem ser causadas por *S. pneumoniae*, a crescente preocupação com os pneumococos resistentes à penicilina faz com que se utilizem cada vez mais cefalosporinas de terceira geração, as novas fluoroquinolonas e a vancomicina (File, 2002).

A introdução da penicilina ocorreu em 1943 e nessa altura as estirpes eram universalmente susceptíveis à penicilina (CIM 0,008 a 0,015 µg/ml). Segundo Jacobs e Appelbaum (1995) o desenvolvimento da resistência em *S. pneumoniae*, *in vitro* e *in vivo* (usando o rato como modelo experimental), verificou-se pouco depois da introdução da penicilina. No Homem, a primeira estirpe resistente à penicilina foi identificada em 1967, na Austrália. Esta tinha resistência intermédia à penicilina (CIM = 0,6 µg/ml) e à tetraciclina (CIM = 5 µg/ml) (Klugman, 1990). De acordo com Tomasz *et al.* (1998), estirpes resistentes foram subseqüentemente identificadas na Nova Guiné em 1969, mas eram susceptíveis a outros antimicrobianos. Mais tarde, em 1977, ocorreu uma epidemia pneumocócica na África do Sul causada por estirpes com resistência elevada à penicilina (CIM = 2 a 8 µg/ml) e resistência a outros agentes. O primeiro caso divulgado de infecção causada por pneumococos resistentes à penicilina nos EUA (CIM = 0,25 µg/ml) ocorreu em 1974 num doente com drepanocitose que desenvolveu meningite. Desde 1974 a 1984 foram documentados em todo o mundo casos de estirpes resistentes à penicilina (CIM ≥ 0,1 µg/ml) (Klugman, 1990). O aparecimento de resistência elevada à penicilina e resistência a outros agentes tem sido reconhecido desde 1977 (Jacobs e Appelbaum, 1995). Contudo, o aumento da frequência de resistência à penicilina é um fenómeno relativamente recente. O aparecimento e propagação da resistência podem ser explicados pelo mecanismo de troca dos genes de resistência à penicilina, provavelmente por recombinação homóloga entre uma estirpe susceptível e outra resistente (Coffey *et al.*, 1995).

No recente projecto Alexander, que envolveu 26 países entre 1999 e 2000, cerca de 31% das estirpes não eram susceptíveis à penicilina. Destas, 18,2% exibiam resistência elevada e 13,5% resistência intermédia (Jacobs *et al.*, 2003). Contudo estes valores variam entre países diferentes. Na Europa, é na Holanda que se encontra a menor prevalência de *S. pneumoniae* resistente à penicilina (5%). A maior percentagem, acima de 50%, regista-se na França e na República Eslovaca, sendo igualmente elevada na República da Irlanda e na Grécia (Schito, 2002). Na Alemanha, das 647 estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas de adultos entre 2001 e 2003, apenas 4,2% era resistente à penicilina e 0,9% resistente à cefotaxima (Reinert *et al.*, 2005a). Em alguns países da América do Sul chega a atingir os 60% e na Ásia 80% (Appelbaum,

2002).

Recentemente foram identificadas as estirpes que causaram a epidemia na África do Sul em 1977. Estas 26 estirpes multiresistentes, recolhidas de crianças, pertenciam aos serótipos 19A e 6A e, uma delas, ao serótipo 14. Verificou-se que a grande maioria dos clones encontrados na África do Sul na década de 70 não se expandiram para outros países, à excepção do ST124 e o ST172 presentes numa estirpe do serótipo 14 e 19A, respectivamente (Reinert *et al.*, 2005b). O ST172 foi encontrado em 1996 numa estirpe do serótipo 19A isolado num indivíduo com meningite no Reino Unido, país com relações históricas com a África do Sul, o que sugere ter havido a dispersão do clone através de migração humana.

## ii) Macrólidos

O aumento da resistência aos macrólidos é preocupante, tendo em vista que esta classe de antibióticos é utilizada na terapêutica empírica das infecções respiratórias (File, 2002; Moellering, 2002), e é considerada em vários países a primeira linha no tratamento da pneumonia adquirida na comunidade (PAC) (Moellering, 2002). Por outro lado, a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos está geralmente associada, não só à resistência aos macrólidos como a eritromicina, mas também a outros antibióticos como a tetraciclina e o cloranfenicol (File, 2002).

Na Europa a variabilidade na frequência de resistência aos antimicrobianos é grande. Na Holanda, por exemplo, encontra-se a menor percentagem de resistência aos macrólidos (5%), enquanto que em França e na Itália estes são superiores a 40% (Schito, 2002). Num programa de monitorização europeu SENTRY no qual se analisaram 82 estirpes resistentes à eritromicina verificou-se que em França (87%), Espanha (77,3%), Suíça (80%) e Polónia (100%) as estirpes têm predominantemente o fenótipo de resistência  $MLS_B$ , enquanto que na Grécia (100%) e Alemanha (33%) se encontram elevadas resistências devidas à presença do gene *mef(A)*. Os serótipos 23F e 14 foram os que mais contribuíram para a resistência aos macrólidos na Europa. O clone Spain<sup>23F</sup>-1 é actualmente o mais frequente nas estirpes resistentes aos macrólidos e um clone do serótipo 14 contendo o gene *erm(B)*, de origem polaca, encontra-se já em França (Reinert *et al.*, 2005c).

A resistência aos macrólidos é particularmente elevada na Ásia, tendo atingido, entre 1998 e 2001, 88,3% no Vietname, 85,1% na Coreia do Sul, 76,5% em Hong-Kong e 75,6% na China (Song *et al.*, 2004). A região asiática é onde se registam mais casos de resistência em pneumococos e a Ilha Formosa tornou-se, desde 1996, um dos focos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e macrólidos (Hsueh e Luh, 2002). Num estudo no Japão foram analisadas 145 estirpes responsáveis por infecções no Homem. Cerca de metade apresentava o fenótipo  $MLS_B$  e

a outra o fenótipo M. O serótipo mais prevalente, 19F, era maioritariamente positivo para os genes *mef*, enquanto que outros serótipos frequentes, como o 3, 6A e 6B, eram maioritariamente positivos para o gene *erm(B)* (Kasahara *et al.*, 2005).

Nos EUA, no estudo PROTEKT que incluiu 26.634 estirpes responsáveis por infecções no Homem isoladas de 2000 a 2004, verificou-se que 29% das estirpes eram resistentes aos macrólidos, mas as estirpes *mef(A)* diminuíram de 69% para 60%, o que coincidiu com um aumento de estirpes com ambos os genes de resistência *mef(A)* e *erm(B)*, particularmente em crianças com menos de dois anos. Estas estirpes pertencem maioritariamente a um clone multiresistente aos antimicrobianos (Farrell *et al.*, 2007).

### iii) Fluoroquinolonas

Em doentes com PAC e em risco de estarem infectados com estirpes multiresistentes é, por vezes, recomendado o uso de fluoroquinolonas com actividade acrescida contra *S. pneumoniae*, tal como a levofloxacin, moxifloxacin e gatifloxacin (Coyle *et al.*, 2001; Low, 2002) e a sua prescrição para o tratamento de PAC está a aumentar (Jones *et al.*, 2003).

Os factores de risco para infecção com pneumococos resistentes às fluoroquinolonas são nomeadamente a idade (doentes com mais de 65 anos de idade), história de doença pulmonar obstrutiva crónica (Low, 2002) e exposição prévia às fluoroquinolonas (Davidson *et al.*, 2002; Low, 2002).

O aparecimento de resistência às fluoroquinolonas é grave, uma vez que estes agentes antimicrobianos cobrem uma vasta gama de microrganismos responsáveis pela maior parte das infecções do trato respiratório (Moellering, 2002; 2005).

Embora a incidência mundial de resistência às fluoroquinolonas seja relativamente baixa (< 2%) (Canton *et al.*, 2003), é maior em alguns países como Espanha (7%), Hong Kong (11,8%) e Siri-Lanka (9,5%) (Perez-Trallero *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004a). No Canadá, das 10.657 estirpes causadoras de infecções invasivas isoladas de 1997 a 2005 a resistência à ciprofloxacina aumentou de menos de 1% para 4,2%, e a resistência às restantes fluoroquinolonas foi cerca de 1%. O genótipo mais comum resultou de mutações nos genes *gyrA* e *parC*. Apenas 21% das estirpes apresentaram o mecanismo de resistência de efluxo (Adam *et al.*, 2007). Nos EUA a prevalência da resistência às fluoroquinolonas tem estabilizado, ocorrendo em cerca de 3% das estirpes, presumivelmente devido às restrições no seu uso no tratamento da infecção invasiva pneumocócica (Low, 2004).

### **Resistência de *S. pneumoniae* aos antimicrobianos em Portugal**

Com vista a implementar medidas tendentes a controlar o aumento da resistência aos antimicrobianos, impõe-se uma monitorização da resistência em estirpes de *S. pneumoniae* que tem sido realizada por vários projectos nacionais e internacionais. Em Portugal, no início da década de 90, surgiram estudos liderados por Vaz Pato sobre a epidemiologia de *S. pneumoniae* (Vaz Pato *et al.*, 1995). Desde essa data realizaram-se estudos multicêntricos, quer internacionais como o projecto "Alexander" (participação anual de Portugal desde 1997) (Felmingham *et al.*, 2000), quer nacionais como o projecto Viriato (iniciado em 1999), ambos sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos nas principais bactérias responsáveis por infecção respiratória adquirida na comunidade (Melo-Cristino *et al.*, 2001, Melo-Cristino *et al.*, 2006).

Dados recentes do projecto Viriato indicam que das 1300 estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas e não invasivas, isoladas nos anos de 2003-2004, das quais 1024 foram isoladas de adultos e 276 de doentes pediátricos, 18,4% eram resistentes à penicilina (3,5% com resistência elevada) e 7,1% eram resistentes à cefuroxima. A resistência aos macrólidos foi de 18,8%, onde dominou o fenótipo MLS<sub>B</sub> (83,7%), e à levofloxacina de 0,4%. O número de estirpes com resistência elevada à penicilina e com resistência aos outros antimicrobianos foi maior nos doentes pediátricos (Melo-Cristino *et al.*, 2006).

Vários estudos têm sido dedicados à colonização da nasofaringe de crianças que frequentam creches na região de Lisboa. Num estudo efectuado em dois períodos de 1999, 62% das culturas da nasofaringe das crianças cresceram *S. pneumoniae* (Nunes *et al.*, 2005). Este valor da frequência de colonização em crianças encontra-se na média dos valores encontrados noutros países europeus como a França (Dunais *et al.*, 2003). Cerca de 40% das estirpes era resistente a pelo menos um antimicrobiano, e 26% era multiresistente. A resistência à penicilina foi de 22% (2% com resistência elevada) e à eritromicina de 22% (Nunes *et al.*, 2005). A resistência aos antimicrobianos variou de creche para creche, o que reforça a ideia destas serem potencialmente unidades epidemiológicas autónomas (Sá-Leão *et al.*, 2000). Os serótipos mais frequentemente encontrados em estirpes resistentes foram o 6B (26%), 14 (22%), 19F (16%), 23F (10%) e estirpes não tipáveis (12%). A maioria das estirpes que exibiam um serótipo conhecido eram maioritariamente representantes de clones internacionais, sendo o clone mais frequente o Spain<sup>9V</sup>-3. Estes serótipos incluídos na vacina 7-valente são também os mais frequentemente encontrados noutros países como o Reino Unido (Brueggemann *et al.*, 2003), Suécia (Sandgren *et al.*, 2004) ou Grécia (Syrogiannopoulos *et al.*, 2002), embora com prevalências diferentes. Comparando com os resultados obtidos em 1996 é de referir que as estirpes não tipáveis

aumentaram de número, e que em 1999 surgiu pela primeira vez um clone do serótipo 33F e o clone Spain<sup>6B</sup>-2, em Portugal.

Face à colonização da nasofaringe por estirpes maioritariamente associadas à resistência e a clones internacionais, e considerando o aumento das estirpes não tipáveis bem como o aparecimento do clone 33F, ambos com capacidade para causar otite média aguda (Brueggemann *et al.*, 2003; Porat *et al.*, 2004), torna-se imperativo monitorizar a nasofaringe de crianças que frequentem as creches de modo a compreender melhor a epidemiologia do pneumococo e limitar a sua propagação para a comunidade.

#### **A creche como centro de disseminação de *S. pneumoniae***

De Lencastre e Tomasz (2002) defendem que a nasofaringe de crianças que frequentam creches é o reservatório de estirpes resistentes aos antimicrobianos a partir do qual essas estirpes podem disseminar-se e desenvolver infecção em crianças e adultos. Uma forte indicação em suporte desta hipótese é o facto dos serótipos de estirpes responsáveis por infecções invasivas resistentes aos antimicrobianos recolhidos de adultos e de crianças representarem os mesmos serótipos das estirpes que colonizam as crianças que frequentam creches. Esta semelhança é mantida independentemente da localização geográfica. Os autores defendem ainda que o sistema imunitário imaturo destas crianças vai provavelmente favorecer a persistência na nasofaringe de alguns tipos capsulares. Ou seja, crianças que frequentem creches podem contribuir para a dispersão de pneumococos entre elas e para a comunidade. Uma das explicações avançadas para o aumento da frequência dos serótipos pediátricos (6B, 9V, 14, 19F e 23F) em idosos com mais de 65 anos nos EUA entre 1998 a 1999 foi o maior contacto com as crianças (Feikin *et al.*, 2005). Na África do Sul o maior contacto das mulheres com as crianças faz com que o risco de infecção com os serótipos pediátricos seja maior do que nos homens (Buie *et al.*, 2004). Noutro estudo Huang *et al.* (2005a), verificaram que comunidades com diferentes proporções de crianças a frequentarem creches apresentam uma variação de 4% a 56% na prevalência da colonização pneumocócica.

## Caracterização molecular de *S. pneumoniae*

Neste sub-capítulo final menciona-se a importância da caracterização molecular para a monitorização da epidemiologia de *S. pneumoniae*, e o papel que a rede internacional da epidemiologia molecular pneumocócica tem na coordenação desta monitorização. São também dados exemplos de estudos epidemiológicos onde se releva a importância da recombinação na evolução de *S. pneumoniae*.

### Electroforese em gel de campo pulsado e tipagem de genes “housekeeping”

O aumento da resistência a antibióticos associado à rápida dispersão de alguns clones com capacidade de transferência horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos, genes da cápsula e de virulência, alertou para a necessidade de uma monitorização da epidemiologia de *Streptococcus pneumoniae* em cada país, tendo em vista o seu controlo.

A rede internacional da epidemiologia molecular pneumocócica ("Pneumococcal Molecular Epidemiological Network", PMEN) foi estabelecida em 1997 sob o auspício da união internacional das sociedades de microbiologia (IUMS) com os seguintes objectivos:

- Uma vigilância global das estirpes de pneumococos resistentes aos antimicrobianos.
- Uma padronização da nomenclatura dos clones (país onde foi primeiramente identificado, seguido do serótipo e a ordem pelo qual foi identificado, ex: Portugal<sup>19F</sup>-21)
- A classificação dos clones resistentes.

É incentivada a identificação de clones usando técnicas moleculares, a disponibilização de estirpes de referência de cada clone a partir da "American Type Culture Collection" (ATCC) e a disseminação de informação através da internet (McGee *et al.*, 2001). Os critérios para a inclusão de clones na rede PMEN são os seguintes: o clone deve ter uma vasta distribuição geográfica internacional, deve estar bem estabelecido durante alguns anos e deve ser resistente a um ou mais antibióticos de vasto uso clínico. Outros critérios incluem a publicação prévia de dados sobre o clone e a sua deposição na colecção de clones ATCC.

Uma das técnicas moleculares usadas para a monitorização epidemiológica é a electroforese de campo pulsado em gel de agarose ("Pulsed-Field Gel Electrophoresis", PFGE), que continua a ser a técnica de tipagem molecular de referência para a diferenciação de estirpes.

O desenvolvimento desta técnica deu-se em 1982, quando Schwartz e colaboradores introduziram o princípio de separação de moléculas de ADN maiores que 50 kb, usando campos eléctricos alternados e tendo como base as propriedades de relaxamento do ADN. A aplicação por Chu e colaboradores, em 1986, dos princípios da electrostática para calcular as tensões necessárias de modo a gerar campos eléctricos homogéneos, permitiu o aparecimento da técnica “Clamped Homogeneous Electric Fields” (CHEF) (Lai *et al.*, 1989). No sistema utilizado, baseado na técnica CHEF, o campo eléctrico é gerado por 24 eléctrodos distribuídos hexagonalmente em redor do gel e associados a potenciais eléctricos apropriados. Quando o campo alterna entre duas orientações de 120° de ângulo, as moléculas de ADN com mais de 5 Mb de tamanho podem ser separadas (Chu, 1989). Ao ser aplicado um campo eléctrico as moléculas de ADN no gel migram na sua direcção e esticam em comprimento. A corrente não é fixa, o que permite que as moléculas regressem à sua configuração enrolada entre duas aplicações. Quando o campo eléctrico é aplicado novamente noutra direcção as moléculas mais longas, que enrolam menos do que as moléculas mais curtas, durante a ausência de corrente, movem-se na direcção imposta pelo novo campo com uma menor velocidade do que as moléculas mais curtas. A aplicação alternada da direcção do campo força gradualmente a separação entre grandes moléculas de ADN (Lai *et al.*, 1989; Lodish *et al.*, 2000).

Uma outra técnica de diferenciação molecular é o "Multilocus Sequence Typing" (MLST) no qual se procede à sequenciação de alelos de sete genes “housekeeping” altamente conservados. Conjugando diferentes técnicas de tipagem molecular com os métodos tradicionais de antibiotipagem e serotipagem é possível uma caracterização mais abrangente das populações de *S. pneumoniae*.

Por PFGE obtêm-se perfis de macro-restricção usando a endonuclease SmaI que reconhece o local de restricção 5’...CCCGGG...3’ cortando a ligação entre a citosina e a guanina na dupla cadeia de ADN. As estirpes são depois agrupadas em dendrogramas de acordo com o seu perfil de fragmentos. As estirpes com elevada semelhança são incluídas no mesmo grupo no dendrograma (ver capítulo II). As estirpes representantes dos grupos são sujeitas à sequenciação de alelos de sete genes “housekeeping” altamente conservados, por "Multilocus Sequence Typing" (MLST). Após a sequenciação procede-se à tipagem da estirpe. Para isso, a cada alelo de cada gene é atribuído um número, recorrendo à base de dados online de MLST ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)), que é específico à sequência desse alelo. Da mesma maneira, ao conjunto dos sete alelos corresponde um número, chamado tipo de sequência (ST).

Estes dois métodos são distintos. A variação genética determinada por PFGE parece acumular-se de uma forma mais rápida, o que é uma característica importante para estudos a

curto e médio prazo, como a caracterização de surtos, enquanto que a variação genética determinada por MLST acumula-se de uma forma mais lenta (Enright e Spratt, 1998). Esta diferença faz com que os resultados obtidos por PFGE sejam frequentemente mais discriminatórios do que os obtidos por MLST.

### **A importância da recombinação em *S. pneumoniae***

Para além de fornecer informação importante para a caracterização epidemiológica da população pneumocócica o MLST fornece sequências de fragmentos de 7 genes “housekeeping” de centenas de estirpes. Estes dados podem ser usados em vários aspectos da biologia evolutiva, seja para compreender a evolução das linhagens genéticas dos microrganismos, ou para estimar a contribuição relativa da recombinação e das mutações pontuais numa dada espécie bacteriana (Spratt, 1999; Feil *et al.*, 2000).

Recorrendo ao MLST verificou-se que a recombinação determina fortemente a evolução de *S. pneumoniae* e que a população pneumocócica é de entre as populações bacterianas patogénicas, uma das mais influenciadas pela recombinação (Feil *et al.*, 2001). A recombinação é mais frequente em genes cujos produtos estão sujeitos a uma forte selecção da parte do sistema imunitário do hospedeiro (Brunham *et al.*, 1993) ou a uma selecção pelo uso de antimicrobianos. Para os pneumococos foi estimado que os novos alelos são gerados mais frequentemente por recombinação do que por mutação pontual em cerca de 10 vezes, e que um nucleótido individual dentro dum gene “housekeeping” tem cerca de 50 vezes mais probabilidade de variar por recombinação do que por mutação pontual (Feil *et al.*, 2000).

Porém o serótipo 6A, mas não o 6B, é uma excepção a esta regra. Na Europa e nos EUA a presença do serótipo 6B parece ser mais prevalente do que o serótipo 6A em crianças (Hausdorff *et al.*, 2000). Segundo Robinson *et al.* (2002), os clones do serótipo 6A evoluíram por mutação quase tão frequentemente como por recombinação, enquanto que os clones do serótipo 6B evoluíram quase exclusivamente por recombinação, o que sugere que o serótipo 6A tenha uma maior diversidade genética do que o 6B. Estas diferenças na estrutura populacional observáveis no mesmo serogrupo não são explicáveis pelo fenómeno de transformação, pois a frequência e a eficiência de transformação é idêntica em ambos os serótipos. Contudo, as estirpes do serótipo 6A estão mais associadas à colonização, e as do serótipo 6B à infecção invasiva, sendo a maior parte isolada de crianças com idade inferior ou igual a 5 anos. Estes dois parâmetros apontam para uma relação causal entre a epidemiologia e a estrutura populacional destes serótipos.

A dispersão das características na população de *S. pneumoniae* dá-se por transferência vertical (clonal) e horizontal dos genes. Dois exemplos de transferência vertical incluem as

estirpes multiresistentes do serótipo 23F, isoladas em diversos países, que fazem parte de um clone com origem possível em Espanha, Spain<sup>23F</sup>-1 (Muñoz *et al.*, 1991), e as estirpes pertencentes a outro clone multiresistente do serótipo 6B, Spain<sup>6B</sup>-2, que possivelmente também tiveram origem em Espanha e espalharam-se para a Irlanda na década de 80 (Soares *et al.*, 1993). Em ambos os casos estas estirpes são perfeitamente clonais possuindo genes *pbp* idênticos, expressando o mesmo serótipo e o mesmo perfil genómico resultado de terem um ancestral comum recente. Provavelmente o fenótipo e o genótipo particulares destas estirpes conferiram uma vantagem selectiva para que estas se disseminassem com sucesso. Porém, noutros casos, alelos das PBP idênticos encontram-se em estirpes de serótipos ou perfis genómicos distintos. Isto pode ser explicado pela transferência horizontal dos genes *pbp* e eventualmente também do *locus* capsular, que determina o serótipo, entre estirpes de diferentes linhagens (Coffey *et al.*, 1991; Maiden *et al.*, 1998).

Relativamente à evolução das estirpes sem cápsula estudos indicam haver uma relação genética entre estirpes não tipáveis isoladas de casos de conjuntivite e estirpes não tipáveis de outras origens (Hanage *et al.*, 2006). As estirpes sem cápsula da nasofaringe de crianças evoluíram provavelmente como um grupo distinto das estirpes com cápsula da mesma origem (Sá-Leão *et al.*, 2006). Adicionalmente, a maior parte das estirpes não tipáveis isoladas de crianças com conjuntivite aguda em Israel e isoladas da nasofaringe de crianças saudáveis em Portugal, pertencem a linhagens que perderem o *locus* capsular e que incluem os ST344 e ST448 (Porat *et al.*, 2006; Sá-Leão *et al.*, 2006). Estas estirpes exibem uma elevada resistência aos antimicrobianos o que pode ser explicado pela maior persistência na nasofaringe e uma maior exposição aos antimicrobianos.

Estes resultados sugerem que a forma sem cápsula faz parte de uma linhagem antiga que manteve os genes “housekeeping” e o *locus* capsular intactos, possivelmente por estes representarem vantagens adaptativas. Os pneumococos não tipáveis devem ter perdido a capacidade de produzir cápsula num passado distante pois caso contrário haveria um maior número de estirpes de diferentes serótipos apresentando os mesmos tipos de sequência – ST344 e ST448. Este facto sugere que a variação de fase capsular por duplicação ou excisão duma sequência no *locus* capsular seja um fenómeno pouco comum. Contudo, é de notar que recentemente, em 2006, o ST344 foi encontrado numa estirpe do serótipo 19F (spneumoniae.mlst.net).

## OBJECTIVOS

Partindo de uma ampla colecção de estirpes de *S. pneumoniae* causadoras de infecção invasiva, isoladas em hospitais geograficamente dispersos em Portugal, pretendeu-se aprofundar o conhecimento sobre o fenómeno da variação de fase, descrito por Weiser *et al.* (1994) nos EUA, e dar continuidade ao estudo epidemiológico anteriormente iniciado em Portugal no Instituto de Microbiologia.

Relativamente ao estudo da variação de fase:

1. Optimizaram-se as condições de crescimento que permitissem a melhor visualização dos fenótipos. Garantiu-se que o fenótipo dominante se mantinha ao longo das passagens laboratoriais e do crescimento *in vitro*. Determinou-se a frequência de variação espectável entre os diferentes variantes em algumas estirpes modelo. Pretendeu-se assim reproduzir observações anteriores do grupo de Weiser e estabelecer as condições experimentais para completar os objectivos seguintes.
2. A partir da informação obtida em 1) caracterizou-se o fenótipo de uma ampla colecção de estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas em Portugal de 1999 a 2002, expressando um grande número de serótipos e com um contexto genético previamente descrito. Pretendeu-se estabelecer se a variação de fase era uma propriedade comum a todos os pneumococos e se se verificava que o variante opaco era o mais abundante em estirpes responsáveis por infecções invasivas, como sugerido anteriormente pelos modelos animais.
3. Correlacionaram-se características microbiológicas das estirpes, bem como o seu produto de origem e o sexo e a idade do doente, com o fenótipo de opacidade, com o objectivo de ajudar a explicar as diferenças epidemiológicas observadas entre os diferentes serótipos.
4. Caracterizou-se o fenótipo de opacidade das estirpes responsáveis por infecções não invasivas isoladas em 2003 em Portugal. Pretendeu-se verificar se existiam

assimetrias entre esta população e a população de estirpes responsáveis por infecções invasivas.

5. Testou-se a virulência dos diferentes fenótipos de opacidade num modelo murino. Utilizou-se um modelo de infecção sistémica por injeção intraperitoneal no ratinho de variantes opacos, transparentes e intermédios, isolados da mesma estirpe responsável por uma infecção invasiva no Homem. Se se verificasse que no sangue dos ratinhos mortos eram sempre recolhidos pneumococos opacos comprovar-se-ia que o *S. pneumoniae* usa a variação de fase como um mecanismo de patogenicidade e que os variantes opacos são potencialmente os mais virulentos. Pretendeu-se expandir os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de Weiser com um número limitado de estirpes e confirmar a diferente patogenicidade dos variantes observados.
  
6. Avaliaram-se outros parâmetros previamente relacionados com os variantes de opacidade. Um dos parâmetros seleccionados foi a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase que se esperava ser maior nos variantes transparentes, o que poderia explicar parcialmente a maior aderência deste variante ao hospedeiro. Determinou-se a actividade desta enzima em variantes transparentes e opacos representantes dos serótipos mais prevalentes em Portugal em infecção invasiva. Avaliou-se ainda se a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase diferia entre as estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas com diferentes fenótipos. Pretendeu-se assim avaliar, num painel alargado de estirpes, qual era a variação na actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase e a sua correlação com o fenótipo de opacidade da estirpe ou o tipo de infecção que esta causou.

Relativamente à continuação do estudo epidemiológico da população de *S. pneumoniae*:

7. Caracterizaram-se epidemiologicamente as estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas nos anos de 2004 e 2005. Com este objectivo determinou-se o serótipo e a susceptibilidade a um grupo relacionado de antimicrobianos e identificaram-se os clones e as linhagens genómicas pela aplicação de duas técnicas de caracterização molecular: PFGE e MLST. Pretenderam-se comparar estes resultados com os obtidos nas estirpes isoladas entre 1999 e 2002 e com as estirpes isoladas em 2003. Avaliou-se se a estrutura genética da

população pneumocócica estava em mudança, ou se esta se mantinha estável, após a introdução da vacina 7-valente em Portugal em 2001.

Pretendeu-se ainda comparar as possíveis alterações epidemiológicas na população invasiva de *S. pneumoniae* com as observadas noutros países e com a população de estirpes associadas com colonização assintomática isoladas de crianças em Portugal, com o objectivo de melhor compreender os mecanismos responsáveis por eventuais mudanças que se detectem.

# **CAPÍTULO II – MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS**

## RESULTADOS EXPERIMENTAIS SOBRE A VARIAÇÃO DE FASE

### Identificação e condições de crescimento de *S. pneumoniae*

#### Estirpes bacterianas

Foram recolhidas 465 estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas isoladas entre 1999 e 2002, 617 estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas entre 2004 e 2005 e 148 estirpes responsáveis por infecções não invasivas isoladas em 2003, por 23 laboratórios hospitalares portugueses. Zona Norte: Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia; Hospital Pedro Hispano, Matosinhos; Hospital de Santo António, Porto; Hospital de São João, Porto; Instituto Ricardo Jorge, Porto; Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães; Hospital de Vila Real; Hospital de Santa Luzia, Viana do Castelo; Hospital de São Marcos, Braga; Centro Hospitalar da Póvoa do Varzim / Vila do Conde; Zona Centro: Centro Hospitalar de Coimbra; Hospital Universitário de Coimbra; Hospital Infante D. Pedro, Aveiro; Hospital de Santo André, Leiria e Hospital de São Teotónio, Viseu. Ilhas e Zona Sul: Hospital Cruz de Carvalho, Funchal; Hospital Distrital de Angra do Heroísmo; Hospital do Divino Espírito Santo, Ponta Delgada; Hospital Curry Cabral, Lisboa; Centro Hospitalar de Cascais; Hospital D. Estefânia, Lisboa; Hospital Garcia de Orta, Almada; Hospital Pulido Valente, Lisboa; Hospital dos S.A.M.S., Lisboa; Hospital de São José, Lisboa; Hospital de Santa Maria, Lisboa; Hospital de Santa Marta, Lisboa; Hospital de São Francisco Xavier, Lisboa; Instituto Português de Oncologia, Lisboa; Hospital de Santa Luzia, Elvas e Hospital do Barlavento Algarvio.

Os laboratórios participantes isolaram e identificaram as estirpes que foram enviadas para o laboratório coordenador, o Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, onde se mantiveram conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e onde se efectuaram os restantes estudos.

#### Isolamento e condições de crescimento

As estirpes de *S. pneumoniae* foram isoladas a partir do sangue, líquido cefalorraquidiano, medula óssea, líquido pleural, líquido ascítico, fluido articular e pús de peritonite. De cada doente estudou-se apenas uma estirpe.

As condições de crescimento utilizadas foram as seguintes: as estirpes foram inoculadas em meio “Tryptic Soy Agar” (TSA, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 5% de sangue de carneiro (gelose de sangue) (Probiológica, Belas, Portugal) e incubadas a 35°C durante a noite numa atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Para armazenamento as bactérias foram, em seguida, recolhidas e guardadas em meio de “Tryptic Soy Broth” (TSB, Difco Laboratories Maryland, EUA) com o suplemento de 15% glicerol e congeladas a – 70°C.

### **Confirmação da identificação da espécie**

A susceptibilidade à optoquina (etilhidrocupreína) foi determinada por difusão em disco em meio de gelose de sangue. Utilizaram-se discos de optoquina obtidos comercialmente (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). A optoquina ou cloreto de etil-hidrocupreína é usada para diferenciar o pneumococo de outras espécies do género *Streptococcus* com uma sensibilidade maior do que 95%, devido à sua capacidade de selectivamente inibir o crescimento de *S. pneumoniae* em gelose de sangue em concentrações muito baixas ( $\leq 5 \mu\text{g/ml}$ ). O diâmetro da zona de inibição do crescimento observado nas placas sugere a presença de *S. pneumoniae*, se for igual ou superior a 20 mm, e a presença de outras espécies, se for igual ou inferior a 12 mm sendo rara a observação de valores intermédios (Lund e Henrichsen, 1978).

Nos casos em que surgiram dúvidas na identificação das estirpes foi efectuado o teste de solubilidade em sais de biliar. Os sais de biliar precipitam a reacção lítica natural observada em culturas de pneumococos. Adicionou-se desoxicolato de sódio a uma concentração final de 0,1% (vol/vol) de a uma suspensão bacteriana e a presença de *S. pneumoniae* foi confirmada pelo desaparecimento da turvação indicadora da solubilidade (resultante da lise). Em contraposição outros *Streptococcus* produzem uma suspensão turva pois não são solúveis em sais de biliar (Prescott *et al.*, 1996).

## **Variação de fase em estirpes responsáveis por infecções invasivas**

### **Optimização das condições de crescimento**

Foi variada a composição da atmosfera de incubação, nomeadamente a concentração de oxigénio e de dióxido de carbono, que se sabem influenciar a expressão do polissacárido capsular nos variantes de *S. pneumoniae* (Weiser *et al.*, 2001) e o tempo de incubação até à observação dos fenótipos.

Testaram-se as seguintes atmosferas de incubação: condições atmosféricas não alteradas, microaerofilia criada por métodos químicos ou por extinção da chama de uma vela num recipiente fechado, anaerobiose criada por métodos químicos e atmosfera enriquecida com 5% CO<sub>2</sub>. Usaram-se duplicados de 10 estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas, expressando diferentes serótipos, para avaliar possíveis diferenças entre estas estirpes e entre diferentes serótipos.

Uma das condições de microaerofilia (5% oxigénio, 8% de CO<sub>2</sub> e 87% de nitrogénio) foi criada com o uso de agentes químicos CampyPak Plus™ (BBL Microbiology Systems, Sparks, EUA) num sistema GasPak™ e num exsiccador em que a chama de uma vela no ambiente fechado utiliza uma grande parte do oxigénio, produzindo dióxido de carbono, criando-se uma atmosfera com teor reduzido de oxigénio e elevados níveis de dióxido de carbono. A condição de anaerobiose foi criada com o uso de agentes químicos CampyPak Plus™ num sistema GasPak™. Foi usada uma estufa apropriada para a incubação em atmosfera enriquecida com 5% CO<sub>2</sub>. As culturas foram incubadas durante 16 horas, tal como recomendado por Weiser *et al.*, 1994.

Depois de determinada a condição de crescimento, as colónias foram visualizadas de 3 em 3 horas de modo a seleccionar o tempo de incubação mais adequado à visualização do fenótipo.

## **Resultados**

### **Condições atmosféricas de incubação**

Entre as diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> aquelas que foram mais adequadas à visualização do fenótipo de opacidade foi o exsiccador com vela e a microaerofilia química. Isto verificou-se em todas as estirpes analisadas expressando diferentes serótipos e isoladas de diferentes origens. Foi adoptado o exsiccador com vela por ter sido previamente usado na observação de variantes do fenótipo de opacidade (Weiser *et al.*, 1994) e por ser uma solução mais económica.

Nas quatro diferentes atmosferas de incubação, após 16 h de incubação a 35°C (ver abaixo), o fenótipo dominante manteve-se. Contudo, em atmosfera enriquecida com 5% CO<sub>2</sub> algumas estirpes apresentaram uma depressão central nas colónias transparentes como se estas entrassem mais rapidamente no processo de autólise. Nestas condições também se observou um aumento do diâmetro das colónias nalgumas estirpes. No exsiccador com vela e em microaerofilia obtida por métodos químicos a aparência das colónias foi mais mucóide sugerindo um maior grau de encapsulação (anexo 1, Figura 17).

### **Duração do tempo de incubação**

Verificou-se que as 16 horas de incubação, tal como proposto por Weiser *et al.* (1994), foi o tempo mais adequado para que as colónias se tornassem claramente visíveis e as diferenças no fenótipo se tornassem aparentes em todas as estirpes. Após este período de tempo a morfologia das colónias continuou a mudar adquirindo uma coloração azul/acinzentada. Tendo aumentado de diâmetro a depressão central, sinónimo de lise, nas colónias que já a exibiam, esta tornou-se aparente em algumas das restantes.

### **Determinação da estabilidade do fenótipo**

A estabilidade do fenótipo foi estabelecida em estirpes escolhidas ao acaso e nas estirpes R36 e D39. Foram testadas três estirpes isoladas de infecções invasivas e três de infecções não invasivas. De cada uma das estirpes foram isoladas em duplicado colónias opacas, transparentes e intermédias de acordo com a classificação estabelecida por Weiser *et al.* (1994). A partir dessas culturas procedeu-se a passagens diárias do inóculo em gelose de sangue que foi incubado durante a noite na estufa a 35°C usando o exsiccador com vela, e no final de cada semana as células foram guardadas a -70°C no meio de TSB com 15% de glicerol. O inóculo foi passado com o uso de uma ansa que recolheu um grande número de colónias de modo a serem representativas do fenótipo.

Em meio líquido o procedimento foi o seguinte, 50 µl do inóculo foi semeado em 5 ml de meio C+Y (Lacks e Hotchkiss, 1960) e cresceu durante a noite até atingir a densidade óptica (DO), medida a 620 nm, entre 0,7 a 0,9, correspondente à fase exponencial tardia e início da fase estacionária. A cultura foi guardada a -70°C em meio de 20% de glicerol até ser inoculada no mesmo meio. Este procedimento foi repetido 25 vezes.

Após 25 passagens, em meio sólido ou líquido, todas as estirpes foram observadas na lupa e foram consideradas estáveis se a prevalência de cada um dos fenótipos coincidia com a prevalência observada no início da experiência.

### **Resultados**

O fenótipo manteve-se estável em todas as estirpes, o que significa que as passagens laboratoriais e o crescimento *in vitro* não influenciaram o fenótipo. Assegura-se assim que a caracterização do fenótipo nas estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecção no Homem, que foram passadas pelo menos 5 vezes antes de serem estudadas, é válida.

### **Metodologia para o cálculo da frequência de transição do fenótipo**

A frequência de transição do fenótipo foi estabelecida em estirpes escolhidas ao acaso e nas estirpes R36 e D39. Foram testadas três estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas. Para cada estirpe foi inoculada uma colónia do fenótipo opaco, outra do fenótipo transparente e outra do fenótipo intermédio em cuvetes de vidro com 700 µl de meio C+Y. A experiência foi repetida em dois dias diferentes. As culturas cresceram na estufa a 35°C até ser atingida a densidade óptica de 0.5 medida a 620 nm, tal como previamente descrito (Weiser *et al.*, 1994). A cultura foi diluída sucessivamente para o cálculo das unidades formadoras de colónias (ufc). Inocularam-se 100 µl das soluções diluídas no meio de TSA com catalase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (50 unidades/µl, ver “Meios de cultura”) e incubou-se a 35°C no exsiccador com vela durante 16 h. A contagem das colónias revertentes foi feita em todas as diluições em duplicado.

O cálculo da frequência de transição da estirpe fez-se pela contagem das colónias transparentes (revertentes) numa população de  $10^5$ - $10^6$  ufc proveniente de uma colónia opaca e pela contagem das colónias opacas (revertentes) numa população de  $10^5$ - $10^6$  ufc proveniente de uma colónia transparente. Em seguida a frequência de transição foi obtida dividindo o número de revertentes pelo número total de colónias na placa.

### **Resultados**

O número de colónias revertentes foi proporcional nas diferentes diluições. A frequência de reversão entre o fenótipo opaco e transparente variou entre  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$ , ou seja entre 1 colónia em 1000 e 1 colónia em 1.000.000 reverteu para outro fenótipo. Estes valores mantiveram-se independentemente do serótipo testado e do facto da estirpe ser responsável por infecção invasiva ou não invasiva. Este intervalo de valores foi também o da frequência de reversão entre o fenótipo intermédio e opaco e entre o fenótipo intermédio e transparente.

Dentro da mesma estirpe a frequência de transição entre os variantes foi igual, ou seja se numa estirpe a frequência de transição entre o fenótipo opaco e transparente foi de  $10^{-4}$  então a frequência de transição entre o fenótipo opaco e intermédio e entre o intermédio e transparente foi também de  $10^{-4}$ .

A transição para uma mistura de fenótipos foi sempre rara qualquer que fosse o fenótipo inicial. Neste caso é impossível calcular a frequência de reversão, uma vez que os revertentes representam mais de um fenótipo.

### **Metodologia adoptada para a visualização do fenótipo**

O protocolo adoptado para a visualização do fenótipo de cada estirpe foi o descrito previamente por Weiser *et al.* (1994). Em resumo, as colónias foram dispersas numa solução salina (NaCl 0,84%) até ser atingida uma turvação aproximada à do padrão 1 de McFarland. A suspensão foi diluída até se obter cerca de  $10^5$  ufc/ml, sendo 100  $\mu$ l semeados na superfície de meio de TSA (15 ml), ao qual foi previamente adicionada a enzima catalase na concentração de 50 unidades/ $\mu$ l. Usaram-se placas de petri com grelha de contagem (Greiner Bio-one GmbH, Kremsmünster, Áustria) e as culturas foram incubadas a 35°C num exsiccador com vela durante 16 h.

Foram visualizadas duas placas por estirpe e as placas foram divididas em sectores. As estirpes foram classificadas como opacas, transparentes ou intermediárias se mais de 70% das colónias eram opacas, transparentes ou intermédias, respectivamente. Foram adoptadas as definições de colónia opaca, transparente e intermédia propostas por Weiser *et al.*, (1994) (ver capítulo I). As estirpes foram classificadas como misturas quando nenhum dos fenótipos contabilizava mais de 70% das colónias. Foi possível adoptar este método simples porque houve concordância entre a classificação obtida pela contagem total das colónias e pela estimativa visual da área coberta pelas colónias de cada tipo.

A visualização da variação de fase na morfologia das estirpes foi feita com recurso a uma lupa diascópica Leica MZ75 (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça), equipada com um espelho com uma superfície difusora e outra polida, sob luz transmitida obliquamente (45°). A transmissão de luz neste ângulo, através dum meio translúcido de TSA, possibilitou a observação de colónias com os diferentes fenótipos. À lupa foi ligada uma câmara digital Leica DFC320 (Leica Microsystems Digital Imaging, Cambridge, Reino Unido) e uma fonte de luz Schoott KL 1500 LCD (Shoott Glas, Mainz, Alemanha). As imagens mais representativas do fenótipo de cada estirpe foram registadas.

## **Resultados**

### **Variação intra e inter-estirpes**

A variação de fase nas estirpes de *S. pneumoniae* é facilmente observável. No anexo 1 a figura 18 mostra colónias transparentes e opacas de diferentes estirpes. É de notar que as três estirpes do serótipo 8 (fotografias b, c e d) exibiram colónias opacas e transparentes com uma coloração ligeiramente diferente. Esta observação impôs uma classificação do fenótipo mais flexível do que a proposta por Weiser em 1994, particularmente, na cor e no tamanho das colónias, que nem sempre coincidem com as previamente definidas. As colónias transparentes

foram azuladas (figura 18 a a c) e acinzentadas (d), enquanto que as opacas variaram entre a cor esbranquiçada (a e c) a acastanhada (b e d). Quanto ao tamanho, as colónias transparentes foram geralmente menores do que as opacas e intermédias. Contudo, houve serótipos que apresentaram uma maior uniformidade no tamanho e maior diâmetro das colónias, como os serótipos 3 e 8. O serótipo 14 foi um dos que exibiu colónias de menor tamanho. O anexo 1 mostra ainda, na figura 19, as colónias transparentes, opacas e intermédias, duma estirpe responsável por infecção invasiva do serótipo 5, facilmente identificáveis.

A classificação do fenótipo pode ser dificultada pela existência de variação de fase intracolonal, na qual as colónias exibem secções transparentes e opacas (anexo 1, figura 20), propriedade já observada por Weiser *et al.* (1994). O crescimento confluyente das colónias é outro factor que deve ser contornado através da inoculação bacteriana numa densidade adequada e através do espalhamento uniforme do inóculo.

Não houve diferenças na cor ou tamanho das colónias entre estirpes isoladas de infecção invasiva e não invasiva.

### **Caracterização inicial do fenótipo**

Foram caracterizadas 356 estirpes usando a metodologia adoptada para a visualização do fenótipo. Estas estirpes pertencem à colecção de 465 estirpes de *S. pneumoniae* causadoras de infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002, que foram previamente descritas. As primeiras estirpes caracterizadas foram as isoladas do líquido cefalorraquidiano (LCR), as resistentes à penicilina e foi também caracterizado um grupo de estirpes escolhidas ao acaso não pertencendo às categorias anteriores, perfazendo um total de 154 estirpes (Quadro 3). A maioria (76,6%) das estirpes resistentes à penicilina era resistente a pelo menos três classes de antimicrobianos. Pretendeu-se com esta selecção verificar se as estirpes isoladas do LCR e as que exibiam resistência à penicilina apresentavam uma maior proporção do fenótipo opaco do que as restantes.

**Quadro 3**  
**Estirpes inicialmente avaliadas quanto ao fenótipo de opacidade.**

Parâmetros	Fenótipo <sup>a</sup>			
	Opaco	Transparente	Intermédio	Mistura
<b>Estirpes susceptíveis à penicilina e isoladas do LCR (n=12)</b>	9	1	2	0
<b>Estirpes susceptíveis à penicilina e não isoladas do LCR (n=35)</b>	22	4	6	3
<b>Estirpes com resistência elevada à penicilina (n=22)</b>	4	7	6	5
<b>Estirpes com resistência intermédia à penicilina (n=85)</b>	39 (2 LCR)	31 (3 LCR)	10 (1 LCR)	5
<b>% do total (n=154)</b>	48,1%	27,9%	15,6	8,4%

<sup>a</sup> Fenótipo de estirpes causadoras de infecção invasiva, isoladas entre 1999 e 2002, em Portugal.

Os resultados mostraram que 76% das estirpes puderam ser classificadas nos fenótipos transparente e opaco.

Nas estirpes com resistência intermédia à penicilina houve também uma clara predominância do fenótipo opaco, embora não tão acentuada como nas estirpes anteriores. Porém, nas estirpes com resistência elevada à penicilina houve uma ligeira predominância das estirpes transparentes e uma homogeneidade numérica nos restantes fenótipos. Na totalidade das estirpes resistentes à penicilina o fenótipo opaco foi cerca de 5% superior ao fenótipo transparente.

Nesta etapa concluiu-se que não houve uma relação entre a resistência à penicilina e a opacidade, uma vez que quer nas estirpes resistentes quer nas susceptíveis o fenótipo opaco foi prevalente. Não houve igualmente uma relação entre a opacidade e outros parâmetros como o

sexo e a idade do doente, hospital onde a estirpe foi isolada e inclusão em grupos de estirpes com disseminação internacional.

As estirpes susceptíveis à penicilina que foram isoladas ou não do LCR apresentaram uma predisposição para a opacidade, o que sugere que a opacidade está relacionada com outros parâmetros, independentemente das estirpes serem isoladas do LCR ou de outro fluido geralmente estéril.

Pretendeu-se então saber se a opacidade estava estatisticamente associada ao serótipo em estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas. Segue-se a descrição do tratamento estatístico usado e dos resultados publicados.

### **Associação entre opacidade e serótipo**

Para esta análise seleccionaram-se os 10 serótipos mais prevalentes expressos pelas estirpes responsáveis por infecções invasivas, perfazendo um total de 304 estirpes.

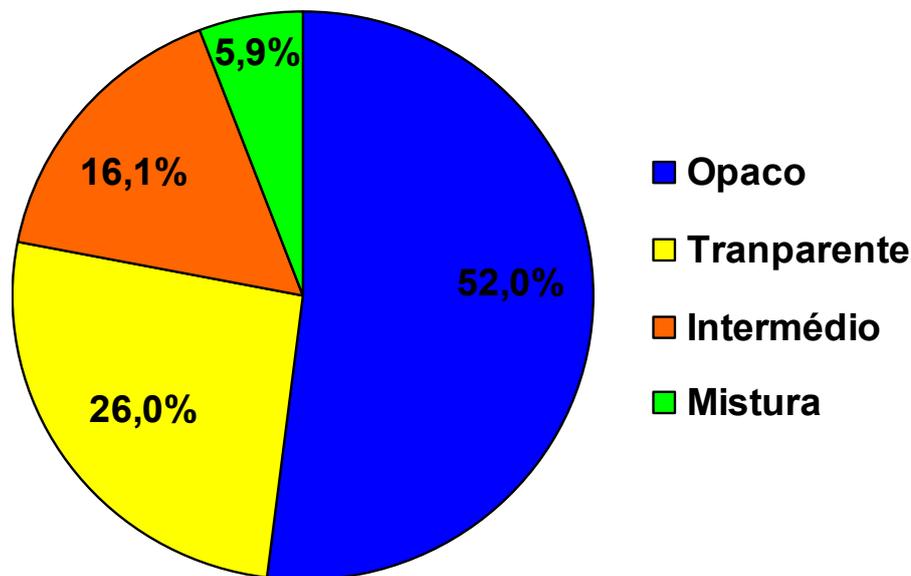
Para estimar a probabilidade de cada serótipo estar associado ao fenótipo opaco foram calculados os “odds ratio” (OR) e um intervalo de confiança de 95% com referência a todos os outros serótipos ou clones. A escolha de usar todos os outros serótipos ou clones para medir o OR específico a cada serótipo foi substanciada pelos estudos de Brueggemann *et al.* (2003) e Sandgren *et al.* (2004).

O OR é calculado da seguinte maneira,  $OR = a \times d / b \times c$ , em que a é o número de estirpes opacas de um dado serótipo ou clone, b é o número de estirpes transparentes desse serótipo ou clone, c é o número de estirpes opacas não pertencentes ao serótipo ou clone e d é o número de estirpes transparentes não pertencentes ao serótipo ou clone. Um OR maior que 1 indica que o serótipo tem uma maior probabilidade de ser opaco, menor que 1 uma menor probabilidade de ser opaco e igual a 1 uma igual probabilidade de ser opaco ou transparente. Quando o intervalo de confiança de 95% atravessa a unidade significa que o resultado não é estatisticamente significativo. Nos serótipos ou clones que possuem apenas estirpes opacas ou só transparentes o “odds ratio” não pode ser calculado.

## **Resultados**

### **Distribuição da variação de fase por serótipo**

Das 304 estirpes, a maioria (n=158, 52,0%) eram opacas. O fenótipo opaco foi duas vezes mais frequente do que o transparente (n=79, 26,0%). Das restantes estirpes 49 (16,1%) tinham o fenótipo intermédio e apenas 18 (n=5,9%) eram misturas (Figura 3).



**Figura 3**

**Percentagem do fenótipo opaco, transparente, intermédio e de misturas de fenótipos, nas 304 estirpes responsáveis por infecção invasiva isoladas, entre 1999 e 2002, em indivíduos com doença invasiva, em Portugal.**

Verificou-se que a proporção do fenótipo opaco em relação ao transparente não é igual em todos os serótipos, existindo uma associação entre certos serótipos e um fenótipo. O quadro 4 mostra a distribuição dos fenótipos pelos 10 serótipos mais prevalentes em infecção invasiva. De modo a ilustrar esta distribuição a figura 21 do anexo 1 mostra um conjunto de 20 fotografias que representam a variação fenotípica entre os 10 serótipos e dentro do mesmo serótipo. Os painéis da esquerda representam maioritariamente colónias com o fenótipo opaco enquanto que os da direita colónias transparentes ou misturas de vários fenótipos, nos serótipos 1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 12B, 14, 19A e 23F.

**Quadro 4**

**Número de estirpes responsáveis por infecções invasivas com fenótipo opaco, transparente, intermédio e mistura de fenótipos, que expressam os 10 serótipos mais prevalentes (n=304), isoladas entre 1999 e 2002, em Portugal.**

Serótipo	Número de STs <sup>a</sup>	Fenótipo (% total)				Total
		Opaco	Transparente	Intermédio	Mistura	
<b>1</b>	4	45 (90,0)	3 (6,0)	1 (2,0)	1 (2,0)	50
<b>3</b>	5	11 (24,4)	26 (57,8)	7 (15,6)	1 (2,2)	45
<b>4</b>	3	21 (77,8)	1 (3,7)	4 (14,8)	1 (3,7)	27
<b>8</b>	2	8 (29,6)	5 (18,5)	10 (37,0)	4 (14,8)	27
<b>7F</b>	1	9 (50,0)	2 (11,1)	7 (38,9)	0	18
<b>9V</b>	5	8 (38,1)	9 (42,9)	3 (14,3)	1 (4,8)	21
<b>12B</b>	4	13 (86,7)	0	2 (13,3)	0	15
<b>14</b>	8	15 (24,2)	28 (45,2)	10 (16,1)	9 (14,5)	62
<b>19A</b>	6	11 (64,7)	3 (17,6)	3 (17,6)	0	17
<b>23F</b>	3	17 (77,3)	2 (9,1)	2 (9,1)	1 (4,5)	22
<b>Total</b>	- <sup>b</sup>	158	79	49	18	304

<sup>a</sup> Diferentes tipos de sequência determinadas em cada serótipo por MLST.

<sup>b</sup> Como 5 STs foram encontrados em diferentes serótipos o número total de STs únicos é de 36.

Nos serótipos 1 (90,0%), 4 (77,8%), 12B (86,7%), 19A (64,7%), 23F (77,3%) e 7F (50,0%) a maioria das estirpes foi classificada como opaca. Nos serótipos 3 (57,8%), 14 (45,2%) e 9V (42,9%) o fenótipo transparente foi o prevalente.

Apesar de no serótipo 8 a maioria das estirpes (37%) ter fenótipo intermédio, este serótipo apresentou os valores mais elevados de estirpes intermédias e, em conjunto com o serótipo 14, os valores mais altos de mistura de fenótipos (15% em cada serótipo).

Os serótipos menos heterogéneos foram os serótipos 12B, 19A e 7F, onde não se visualizaram misturas de fenótipos. No serótipo 12B também não se visualizaram estirpes transparentes. O fenótipo opaco e intermédio foram encontrados em todos os serótipos.

### “Odds ratio” específico para cada serótipo

Nesta análise, para estimar a probabilidade de cada serótipo estar associado ao fenótipo opaco, foram excluídas as estirpes classificadas como intermédias ou misturas. Esta exclusão deveu-se à relação ambígua destes fenótipos com os fenótipos opaco e transparente, aliado ao facto do fenótipo intermédio e mistura de fenótipos serem minoritários na totalidade das estirpes responsáveis por infecções invasivas. Infelizmente o “odds ratio” não foi aplicável ao serótipo 12B porque este não exibia estirpes transparentes. Contabilizaram-se assim um total de 224 estirpes (Figura 4).

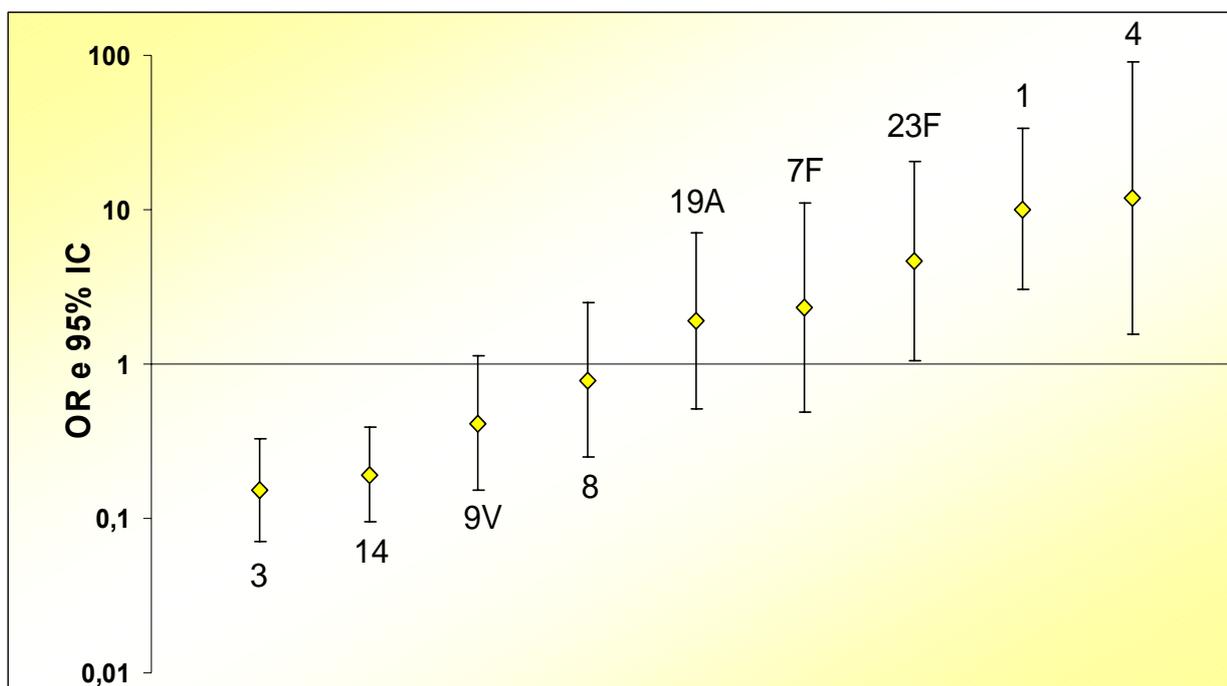


Figura 4

“Odds ratio” (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% específico para cada um dos serótipos das 224 estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas, entre 1999 e 2002, em Portugal.

De acordo com o “odds ratio”, calculado com referência a todos os outros serótipos, e o intervalo de confiança de 95% verificou-se uma associação entre certos serótipos e o fenótipo opaco ou transparente:

- Os serótipos 3 e 14 estavam mais associados ao fenótipo transparentes do que o espectável (OR < 1). O serótipo 3 apresentou um OR = 0,15 (IC 95% 0,07-0,33), o serótipo 14 apresentou um OR = 0,19 (IC 95% 0,10-0,39).

- Nada se pode dizer relativamente aos serótipos 9V, 8, 19A e 7F porque o IC 95% dos seus OR atravessou a unidade. Embora os serótipos 9V (OR = 0,42) e 8 (OR = 0,79) exibissem um OR < 1 e os serótipos 19A (OR = 1,90) e 7F (OR = 2,33) um OR > 1.

- Os serótipos 23F, 1 e 4 estavam associados ao fenótipo opaco (OR > 1). O serótipo 23F apresentou um OR = 4,64 (IC 95% 1,05-20,62), o serótipo 1 apresentou um OR = 10,09 (IC 95% 3,03-33,64) e o serótipo 4 um OR = 11,96 (IC 95% 1,58-90,61).

## **Varição de fase em estirpes responsáveis por infecções não invasivas**

A metodologia adoptada foi a mesma das estirpes responsáveis por infecções invasivas

### **Estirpes responsáveis por infecções não invasivas**

A colecção de estirpes responsáveis por infecções não invasivas isoladas em 2003 em Portugal foi constituída por 148 estirpes, das quais 25 foram recolhidas de crianças e 123 de adultos. Não houve nenhum critério de selecção destas estirpes, todas as estirpes recebidas no laboratório coordenador foram serotipadas e caracterizadas quanto ao fenótipo.

### **Resultados**

Os serótipos mais frequentes foram por ordem decrescente o 3, 23F, 14, 19A, 9V, 8, 7F e 4, contabilizando 93,2% do total das estirpes analisadas. Estes serótipos foram também os mais prevalentes em crianças com excepção dos serótipos 8 e 7F que estiveram ausentes neste grupo etário. O fenótipo mais frequente foi o opaco com 70 estirpes (47,3%). Das restantes, 33 (22,3%) eram transparentes, 26 (17,6%) apresentavam um fenótipo intermédio e 19 (12,8%) uma mistura de fenótipos. No quadro 5 está representada a distribuição dos diferentes fenótipos apenas nos serótipos que tinham pelo menos 10 estirpes (74,3% do total das estirpes).

### Quadro 5

Número de estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções não invasivas com fenótipo opaco, transparente, intermédio e misturas de fenótipos, que expressam os serótipos 3, 23F, 14 e 19A (n=110), isoladas em 2003 em Portugal.

Serótipo	Fenótipo (% total)				Total
	Opaco	Transparente	Intermédio	Mistura	
3	32 (68,1)	12 (25,5)	0	3 (6,4)	47
23F	15 (60,0)	5 (20,0)	0	5 (20,0)	25
14	2 (10,0)	12 (60,0)	2 (10,0)	4 (20,0)	20
19A	3 (16,7)	0	12 (66,7)	3 (16,7)	18

Os serótipos 3, 19A e 23F foram representados por um número semelhante de estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas.

As estirpes responsáveis por infecções não invasivas do serótipo 3 apresentaram uma predominância do fenótipo opaco (68,1%), enquanto que as estirpes responsáveis por infecções invasivas do mesmo serótipo apresentaram uma predominância de estirpes transparentes (57,8%). Uma outra diferença no serótipo 3 foi a ausência do fenótipo intermédio e um maior número de misturas (6,4%) nas estirpes responsáveis por infecções não invasivas.

No serótipo 19A as estirpes responsáveis por infecções não invasivas apresentaram uma predominância do fenótipo intermédio (66,7%) e as estirpes responsáveis por infecções invasivas uma predominância de estirpes opacas (64,7%). O fenótipo transparente esteve ausente nas estirpes responsáveis por infecções não invasivas atingindo os 17,6% nas invasivas. Apenas neste serótipo houve diferenças significativas na distribuição dos fenótipos nas estirpes isoladas de crianças e de adultos. Das 10 estirpes isoladas de crianças, 8 tinham fenótipo intermédio e 2 eram mistura de fenótipos. Das 8 estirpes isoladas de adultos, 3 eram opacas, 4 tinham o fenótipo intermédio e 1 era uma mistura de fenótipos. Ou seja, a prevalência do fenótipo intermédio no serótipo 19A deveu-se essencialmente às estirpes isoladas de crianças.

O serótipo 23F foi maioritariamente opaco quer nas estirpes que causam infecções invasivas (77,3%) quer nas que causam infecções não invasivas (60,0%).

No serótipo 14, apesar da diferença numérica entre as estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas, é de salientar o maior número de estirpes com o fenótipo transparente, 45,2% e 60,0%, respectivamente.

## Experimentação animal

### Protocolo para a determinação da estabilidade do fenótipo em *Mus musculus*

Ratinhos (*Mus musculus*), jovens adultos com 6 semanas, do sexo feminino e da mesma prole foram mantidos e usados em práticas científicas, de acordo com os princípios éticos da experimentação animal em vigor noutros países europeus.

Os ratinhos foram inoculados intraperitonealmente com os variantes opacos e transparentes, previamente isolados, de estirpes responsáveis por infecções invasivas que expressavam os serótipos 1, 8 e 4 e com o variante intermédio duma estirpe do serótipo 4. Estes serótipos são considerados patogénicos nos ratinhos (Briles *et al.*, 1992; Saeland *et al.*, 2000). Foram aferidas duas concentrações bacterianas,  $10^8$  ufc/ml e  $10^3$  ufc/ml. Com o variante intermédio do serótipo 4 foi testada apenas a concentração mais elevada. Cada concentração foi testada em três ratinhos e cada um destes grupos foi colocado em diferentes gaiolas. Em cada ensaio foi usado um grupo de controlo. A experiência decorreu durante 21 dias e neste período o tempo de sobrevivência de cada ratinho foi registado. Nos ratinhos que morreram no decurso do ensaio foi retirado sangue do coração que foi incubado em placas de gelose sangue para se confirmar a causa de morte por infecção por *S. pneumoniae* e verificar se houve alguma alteração no fenótipo. No final da experiência todos os ratinhos sobreviventes foram autopsiados para garantir que nestes ratinhos os pneumococos não estavam presentes no sangue.

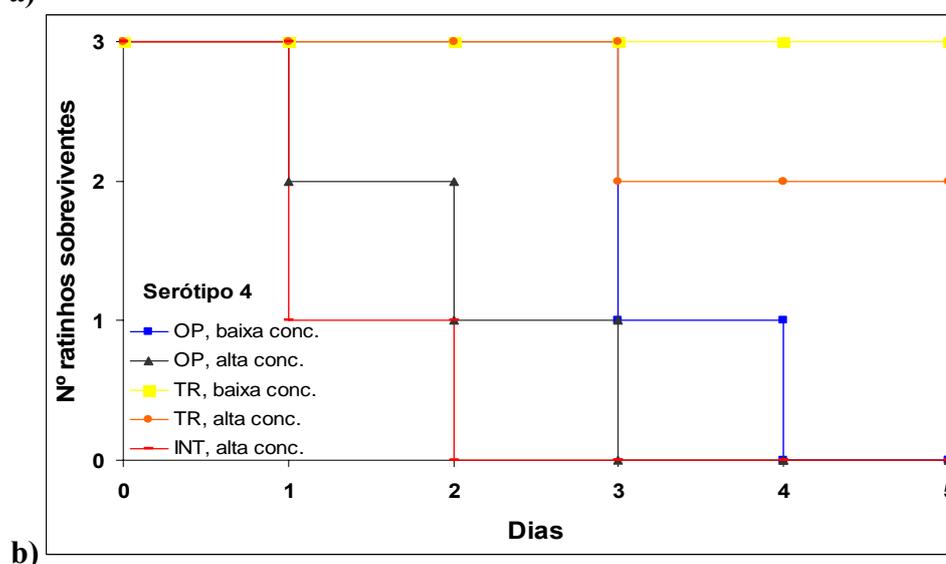
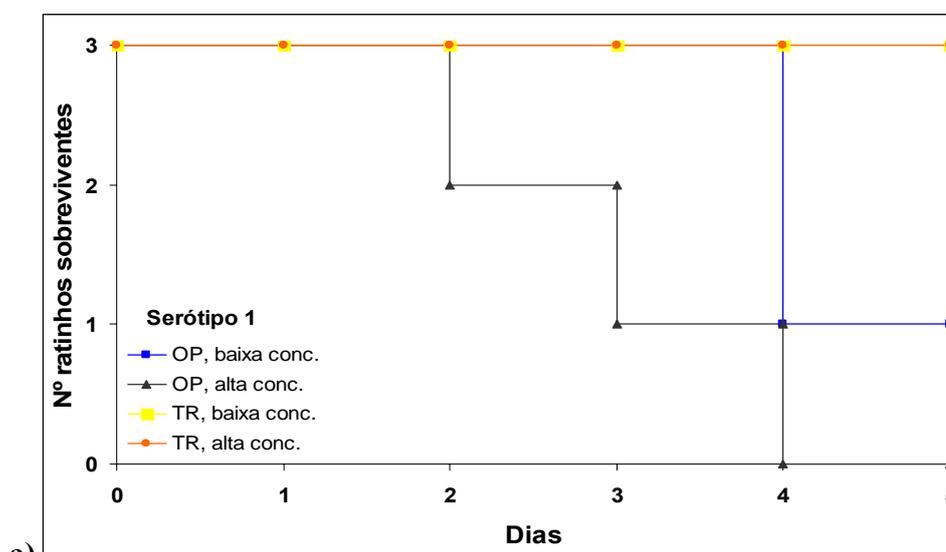
O protocolo sobre a preparação das soluções bacterianas a administrar nos ratinhos foi adoptado de Briles *et al.* (1981). Resumidamente, após crescimento em meio líquido de “Brain Heart Infusion” (BHI, Difco Laboratories, Maryland, EUA), as células foram centrifugadas no início da fase logarítmica a 1600g, durante 15 minutos a 4°C. Após a lavagem e suspensão numa solução não alergénica de lactato de ringer (B. Braun Medical Lda., Queluz de Baixo, Portugal) foi medida a DO a 620 nm. Em seguida, a densidade celular foi ajustada através da adição de lactato de ringer, de modo a ser atingida a concentração desejada de  $10^7$  ufc e de  $10^2$  ufc num volume de 100 µl. Este volume foi administrado na cavidade peritoneal dos ratinhos usando

seringas de 1 ml. Para se confirmar a densidade celular do inóculo fizeram-se diluições sucessivas, tendo-se inoculado em duplicado 100 µl de cada diluição em gelose sangue e incubado a 35°C.

### Resultados da experimentação animal

Foram testados 42 ratinhos mais 4 do grupo de controlo. Na figura 5 estão anotados os dias de sobrevivência de cada ratinho após a inoculação. Como nenhum ratinho morreu após o quarto dia de experiência só estão representados na figura os primeiros cinco dias.

Apenas no serótipo 1 as duas soluções do variante transparente tinham concentrações mais elevadas do que o esperado ( $10^3$  e  $10^8$  ufc/100 µl). Devido ao grande número de ratinhos sobreviventes nas concentrações  $10^2$  e  $10^7$  ufc/100 µl, testou-se também a concentração  $10^9$  ufc/100 µl nos variantes transparentes do serótipo 8 (Figura 5).



Continua na página seguinte

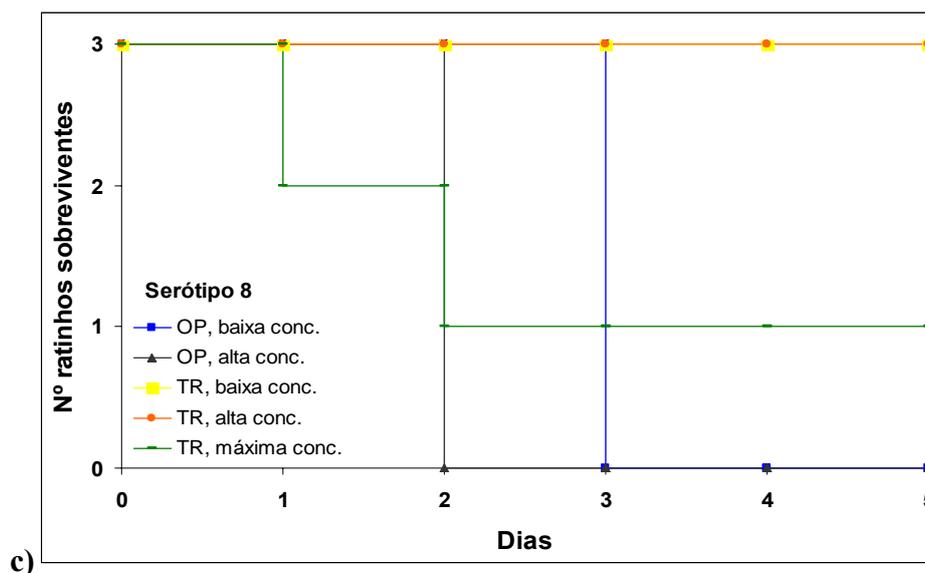


Figura 5

**Dias de sobrevivência de 42 ratinhos após a inoculação de diferentes concentrações de variantes de opacidade isolados de estirpes responsáveis por infecções invasivas.** OP-opaco, TR-transparente, INT-intermédio. Baixa concentração:  $10^2$  ufc/100  $\mu$ l, excepto no serótipo 1 TR ( $10^3$  ufc/100  $\mu$ l). Alta concentração:  $10^7$  ufc/100  $\mu$ l, excepto no serótipo 1 TR ( $10^8$  ufc/100  $\mu$ l). Máxima concentração:  $10^9$  ufc/100  $\mu$ l. a) Estirpe do serótipo 1. b) Serótipo 4. c) Serótipo 8.

Todos os ratinhos que foram injectados com estirpes do fenótipo opaco, em qualquer concentração bacteriana, morreram ( $n=17$ ) à excepção de um. Também morreram os três ratinhos nos quais foi inoculada a estirpe do fenótipo intermédio expressando o serótipo 4. Todos os ratinhos inoculados com culturas do fenótipo transparente, na concentração de  $10^2$  e  $10^3$  e  $10^7$  e  $10^8$  ufc/100  $\mu$ l, sobreviveram ( $n=17$ ) à excepção de um. Porém, dois dos ratinhos administrados com culturas do fenótipo transparente, na concentração de  $10^9$  ufc expressando o serótipo 8, morreram e apenas um sobreviveu (Figura 5).

O facto de nem todos os ratinhos do mesmo grupo, que foram inoculados com a mesma concentração bacteriana, serótipo e fenótipo, terem sobrevivido ou morrido pode dever-se à diferente susceptibilidade dos próprios ratinhos aos pneumococos.

As mortes ocorreram em 4 dias consecutivos, havendo uma tendência clara para as concentrações mais elevadas causarem mais rapidamente a morte dos ratinhos. Tendo em conta apenas o fenótipo opaco parece ter havido uma mortalidade mais célere nos ratinhos administrados com as estirpes dos serótipos 4 e 8 do que do serótipo 1.

Os resultados mostraram que o fenótipo opaco foi mais agressivo do que o transparente no modelo murino porque, nas mesmas concentrações bacterianas, causou uma maior mortalidade. O fenótipo intermédio, testado apenas no serótipo 4, mostrou ser mais agressivo do que o fenótipo transparente e tão agressivo como o fenótipo opaco. Como esperado, os pneumococos recuperados do sangue dos ratinhos que morreram por infecção pneumocócica apresentaram maioritariamente o fenótipo opaco independentemente do fenótipo inicialmente administrado.

Todos os ratinhos controlo sobreviveram até ao final da experiência e não apresentaram pneumococos no sangue.

Todos os ratinhos sobreviventes ao fim de 21 dias de observação, incluindo todos os inoculados com os variantes transparentes, não apresentaram pneumococos no sangue até ao limite de detecção (< 10 ufc/ml).

## **Quantificação da enzima $\beta$ -galactosidase**

### **Ensaio da quantificação da enzima $\beta$ -galactosidase em estirpes de *S. pneumoniae***

O protocolo usado para a obtenção de lisados celulares foi baseado no de King *et al.* (2006), tendo-se procedido a algumas alterações, tal como o uso dos reagentes do Kit “ $\beta$ -galactosidase enzyme assay system with reporter lysis buffer” (Promega corporation, Madison, EUA) para a quantificação da enzima. Resumidamente, as células cresceram em “Todd-Hewitt Broth” (THY, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) com 0,2% de extracto de levedura até à fase estacionária. Considerou-se que a cultura estava na fase estacionária quando a diferença entre duas densidades ópticas lidas a 620 nm, sucessivamente num intervalo de 30 min, era menor do que 0,03. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1600g, durante 15 min a 4° C, lavadas duas vezes com tampão PBS1x e finalmente transferidas para um microtubo em 1ml do mesmo tampão. A lise celular deu-se com a adição à suspensão das células de 3  $\mu$ l de tolueno (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A suspensão foi homogeneizada no vórtex durante 30 seg, incubada a 37°C durante 15 min e depois incubada à temperatura ambiente durante 20 min, até o tolueno evaporar. Em seguida, adicionou-se 50  $\mu$ l do tampão do Kit (“Reporter Lysis Buffer”, 5X) e as células foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 min tendo-se o cuidado de misturar a solução. Finalmente, a solução foi centrifugada durante 5 min a 14000 rpm 4°C e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. Os lisados celulares foram ensaiados imediatamente de

acordo com as instruções do fabricante. O ensaio procedeu da seguinte maneira, adicionou-se à placa de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) 50 µl de cada lisado e 50 µl do tampão do Kit (“Assay Buffer”, 2x). A solução foi misturada e incubada a 37°C durante 1 hora. Durante o período de incubação desenvolve-se uma coloração amarelada que se mantém durante 3 horas. Após terminar a reacção com 150 µl de 1M carbonato de sódio, incluído no Kit, leu-se a absorvância a 415 nm.

Para cada estirpe o valor da actividade da β-galactosidase resultou da média de três amostras e foi determinado em unidades de Miller. A unidade de Miller é igual a  $(1000 \times \text{DO } 415 \text{ nm}) / (t \times v \times \text{DO } 620 \text{ nm})$ , em que t é o tempo de incubação em minutos (60 min), e v é o volume da cultura em ml (1ml).

### **Resultados da actividade da enzima β-galactosidase em variantes opacos e transparentes de estirpes responsáveis por infecções invasivas**

Quantificou-se a actividade da enzima β-galactosidase em 13 estirpes da nossa colecção de estirpes responsáveis por infecções invasivas e que expressavam 9 serótipos diferentes. Os serótipos 1, 3, 7F e 9V foram representados por duas estirpes cada.

Na figura 6 estão representadas as actividades da β-galactosidase nas 13 estirpes responsáveis por infecções invasivas, bem como a média da actividade no total e o desvio padrão calculado com base nestas estirpes.

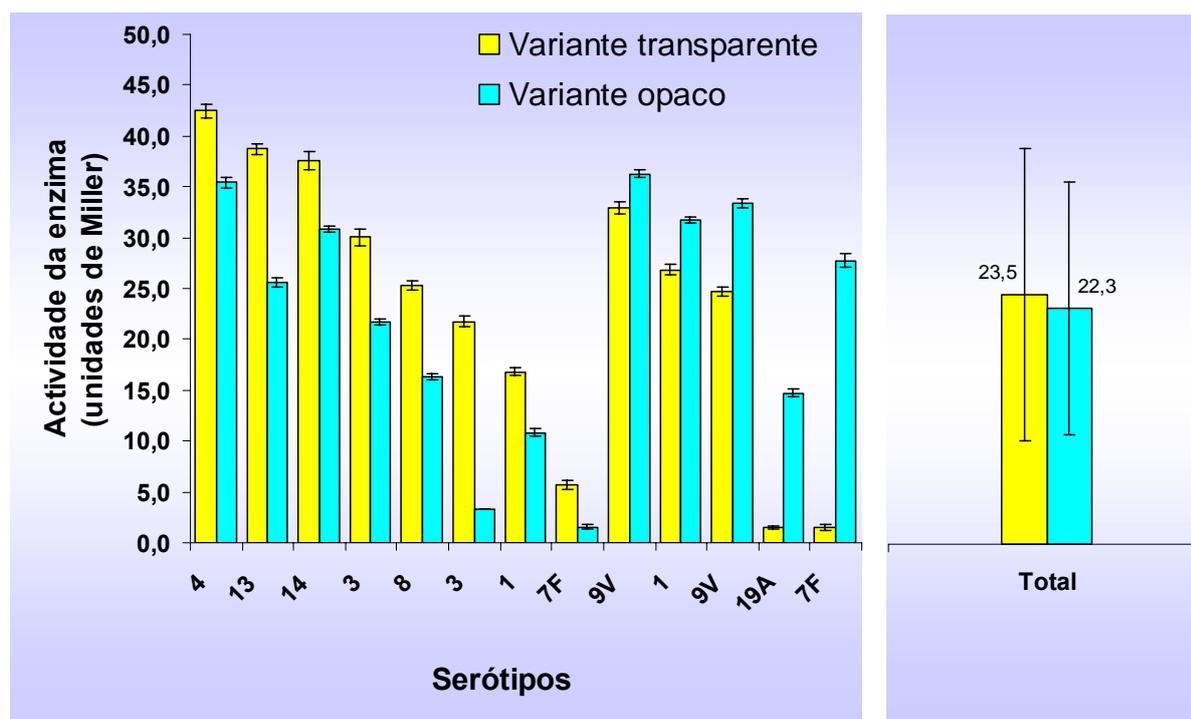


Figura 6

**Actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase em 13 variantes transparentes e opacos, e no total, isolados de estirpes responsáveis por infecções invasivas.**

Parece haver uma predisposição para os variantes transparentes exibirem uma maior actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase embora, em 5 das 13 estirpes estudadas, expressando os serótipos 1 e 9V (2 estirpes), 19A e 7F, a sua actividade tenha sido maior nos variantes opacos (Figura 6). Uma estirpe do serótipo 4 foi a que exibiu a maior actividade enzimática dos variantes transparente (42,5 unidades de Miller) e uma estirpe do serótipo 9V exibiu a maior actividade observada nos variantes opacos (36,3). Duas estirpes do serótipo 7F e 19A exibiram os valores de actividade mais baixos, 1,5 unidades de Miller, de entre os observados nos variantes transparente e outra estirpe do tipo capsular 7F exibiu o menor valor observado nos variantes opacos, 1,5 unidades de Miller (Figura 6).

Para além disto, a diferença no valor da actividade enzimática entre os variantes transparentes e os opacos não ultrapassou as 10 unidades de Miller em 9 estirpes. Nas excepções, uma estirpe do serótipo 3 exibiu uma diferença de 18,5 unidades de Miller, no serótipo 13 e 19A as diferenças foram de 13,1 e 13,2 unidades, respectivamente, e numa estirpe do serótipo 7F a diferença atingiu 26,2 unidades.

Nos serótipos em que se testaram duas estirpes nem sempre houve homogeneidade nos valores da actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Nos serótipos 1 e 7F uma estirpe apresentou

uma maior actividade enzimática no variante transparente e a outra no variante opaco. Nos serótipos 3 e 9V, ambas as estirpes apresentaram uma maior actividade enzimática num dos variantes, os variantes transparentes no caso do serótipo 3 e opacos no serótipo 9V.

Os resultados evidenciam haver uma variabilidade na actividade enzimática dentro do mesmo serótipo e uma variabilidade de serótipo para serótipo. Verificou-se que o desvio padrão foi ligeiramente maior nos variantes transparentes (Figura 6).

Foram também testadas as estirpes D39, R6 e TIGR4, perfazendo um total de 16 estirpes analisadas. Observou-se nas duas primeiras uma maior actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase nos variantes transparentes, e na TIGR4 uma maior actividade nos variantes opacos. A diferença na actividade da enzima entre variantes transparentes e opacos foi muito ténue, não ultrapassando 2 unidades de Miller na estirpe D39 (26,6 unidades de Miller no variante transparente e 24,6 no variante opaco) e R6 (26,1 e 25,6) e 3 unidades de Miller na estirpe TIGR4 (28,1 e 31,1). Nestas estirpes a diferença na actividade da enzima entre o variante transparente e o opaco foi a mais baixa observada de entre todos os variantes analisados.

### **Resultados da actividade da enzima $\beta$ -galactosidase em estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas**

Estudou-se a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase em representantes de cada fenótipo. No total contabilizaram-se 63 estirpes, 36 eram responsáveis por infecções invasivas e 27 por infecções não invasivas que expressavam os dez principais serótipos das estirpes causadoras de infecções invasivas (1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 12B, 14, 19A e 23F). Com isto pretendeu-se determinar se a actividade da  $\beta$ -galactosidase variava de acordo com a origem da estirpe.

Duas estirpes responsáveis por infecções invasivas do serótipo 14 que exibiam o fenótipo opaco e intermédio foram eliminadas por não apresentarem actividade de  $\beta$ -galactosidase mensurável.

Na figura 7 está representada a média da actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase medida nas estirpes opacas, transparentes, intermédias e misturas de fenótipos que foram responsáveis por infecções invasivas ou não invasivas, e no total de 61 estirpes que apresentaram actividade enzimática, bem como o desvio padrão de cada fenótipo.

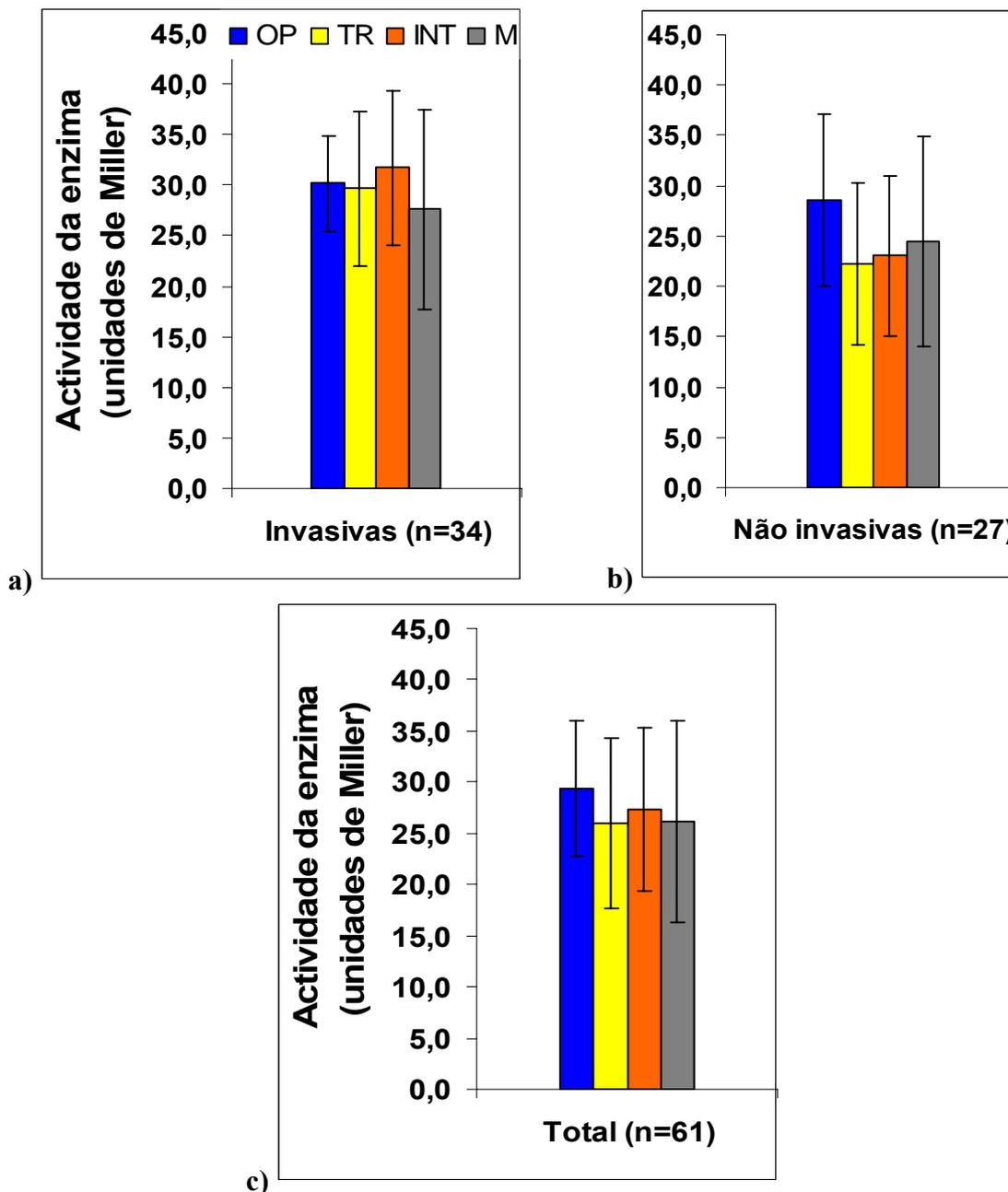


Figura 7

Média e desvio padrão da actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase em estirpes de *S. pneumoniae* com diferentes fenótipos. OP- opaco, TR- transparente, INT- intermédio e M- mistura. a) Estirpes responsáveis por infecções invasivas. b) Estirpes responsáveis por infecções não invasivas; c) Totalidade das estirpes.

É de ressaltar que nem todos os serótipos tinham representantes de todos os diferentes fenótipos nas estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas, o que pode ter influenciado os resultados. Por exemplo, as estirpes causadoras de infecções invasivas do serótipo 7F não apresentaram mistura de fenótipos (Quadro 4), enquanto que as estirpes

causadoras de infecções não invasivas do serótipo 3 e 23F não apresentaram o fenótipo intermédio (Quadro 5). Verificou-se ainda que não houve diferenças notórias na actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase nas estirpes opacas ( $29,4 \pm 6,6$  unidades de Miller), transparentes ( $25,9 \pm 8,3$ ), intermédias ( $27,4 \pm 8,0$ ) e misturas ( $26,1 \pm 9,8$ ), na totalidade das estirpes analisadas (Figura 7c). Não houve também diferenças significativas nos valores da actividade da  $\beta$ -galactosidase nos diferentes fenótipos entre as estirpes responsáveis por infecções invasivas (figura 7a) e não invasivas (figura 7b).

Algumas estirpes apresentaram uma baixa actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, o que se deveu, provavelmente, à variabilidade inerente a essas estirpes e não à sua origem. Os valores mais baixos da actividade enzimática observaram-se nalgumas estirpes responsáveis por infecções não invasivas dos serótipos 19A (11,7 unidades de Miller) e 7F (11,6).

## RESULTADOS EXPERIMENTAIS SOBRE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS EM ESTIRPES CAUSADORAS DE INFECÇÕES INVASIVAS

Os resultados da serotipagem e da resistência aos antimicrobianos assim como a caracterização molecular por PFGE e MLST das estirpes isoladas entre 1999 e 2002, e recentemente publicados, foram comparados com os resultados das estirpes isoladas de 2004 a 2005, estudadas em conjunto com a Dr.<sup>a</sup> Sandra Aguiar do Instituto de Microbiologia Molecular da Faculdade de Medicina de Lisboa. As estirpes isoladas em 2003 foram previamente caracterizadas pela Dr.<sup>a</sup> Sandra Aguiar e os dados foram gentilmente cedidos.

Sempre que se imponha, os dados de 2003 serão referenciados, para uma melhor compreensão da evolução dos parâmetros epidemiológicos.

### Origem das amostras

Do total de 465 estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas analisadas, durante o período de estudo entre 1999 e 2002, 435 (93,5%) foram isoladas do sangue, 18 (3,9%) do líquido cefalorraquidiano e 12 (2,6%) de outros fluidos habitualmente estéreis (pleural e ascítico). A região sul e as ilhas contribuíram com 220 (47,3%) estirpes, a região Norte com 209 (45,0%) e o Centro do País 36 (7,7%). Em cada ano foi recolhido um número de microrganismos que oscilou entre um mínimo em 1999 19% (88/465) e um máximo em 2001 32% (147/465), e que se manteve aproximadamente constante em 2000 e 2002, 24% (112/465) e 25% (118/465), respectivamente.

Apenas 57 (12%) estirpes foram isoladas de crianças com idade inferior a dois anos. Das restantes 409 estirpes, 171 (37%) pertenciam a indivíduos com idade superior ou igual a 60 anos. As estirpes do líquido cefalorraquidiano foram maioritariamente (67%) recolhidas de doentes com idade superior a 18 anos.

Das 617 estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas entre 2004 (n=254) e 2005 (n=363), 531 (86,1%) foram isoladas do sangue, 39 (6,3%) do líquido cefalorraquidiano e 47 (7,6%) de outros fluidos habitualmente estéreis. A região Norte contribuiu com 346 (56,1%) estirpes, a região do Sul e ilhas com 241 (39,1%) estirpes, e o Centro do país com 30 (4,9%).

No total, foram isoladas apenas 70 (11,3%) estirpes de crianças com idade inferior a 6 anos, das quais 35 (5,7%) recolhidas de crianças com menos de 2 anos. Das restantes estirpes, 271 (43,9%) foram isoladas de indivíduos com idade  $\geq 6$  e  $< 60$  anos e 276 (44,7%) de adultos com idade superior ou igual a 60 anos. A maior parte (74,4%) das estirpes isoladas do líquido cefalorraquidiano foram recolhidas de doentes com idade superior a 18 anos.

## Serotipagem

A reacção de Neufeld (ou Quellung) é o método tradicional usado para a serotipagem de *S. pneumoniae*. Sørensen (1993) propôs um sistema de tipagem em xadrez baseado em apenas 14 soros anti-pneumocócicos que reagem com 46 tipos capsulares de *S. pneumoniae* na reacção de Neufeld (Quadro 6).

### Quadro 6

Sistema em xadrez para a serotipagem das estirpes de *S. pneumoniae*<sup>a</sup> (Sørensen, 1993).

"pool" existente	Soros do novo "pool"					Serótipo ou serogrupo não incluído na vacina 23- valente
	P	Q	R	S	T	
<b>A</b>	<b>1</b>	<b>18*</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	
<b>B</b>	<b>19*</b>	<b>6*</b>	<b>3</b>	<b>8</b>		
<b>C</b>	<b>7*</b>				<b>20</b>	24*, 31, 40
<b>D</b>			<b>9*</b>		<b>11*</b>	16*, 36, 37
<b>E</b>			<b>12*</b>	<b>10*</b>	<b>33*</b>	21, 39
<b>F</b>				<b>17*</b>	<b>22*</b>	27, 32*, 41*
<b>H</b>	<b>14</b>	<b>23*</b>		<b>15*</b>		13, 28*
<b>G<sup>a</sup></b>						29, 34, 35*, 42, 47*
<b>I<sup>a</sup></b>						25, 38, 43, 44, 45, 46, 48

<sup>a</sup> Os soros G e I não reagem com os tipos da vacina 23-valente e por isso não estão incluídos no sistema em xadrez. Os serótipos e/ou serogrupos presentes na vacina 23-valente estão indicados a negro.

\* Indicam os serogrupos contendo vários serótipos.

A determinação do serótipo ou serogrupo foi feita pelo recurso ao quadro 6. Trata-se de um sistema em xadrez, pelo cruzamento entre as duas reacções positivas (uma num dos "pools" de soros tradicionais e a outra num dos novos "pools" de soros) (Sørensen, 1993). São testados sucessivamente os nove soros tradicionais de A a I até ser observada uma reacção positiva e a tipagem prossegue testando-se os novos soros, de P a T. No entanto, pode haver uma reacção positiva apenas com um dos soros tradicionais e nesse caso o serogrupo não é um dos incluídos na vacina 23-valente. Quando há duas reacções positivas, estamos na presença de estirpes pertencentes a serogrupos incluídos na vacina 23-valente.

Os serótipos incluídos nos soros P a T foram escolhidos de modo a que cada um dos serótipos ou serogrupos relacionados com a vacina 23-valente reagisse com um destes soros e um dos sete soros A a F e H (os soros G e I não reagem com os serótipos capsulares relacionados com vacinas) (Quadro 6) (Sørensen, 1993). Este sistema em xadrez permite facilmente atribuir às estirpes um dos 21 serogrupos representados na vacina 23-valente utilizando um número mínimo de soros.

Quando a estirpe pertence a um dos seguintes serogrupos: 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 22, 23 e 33 procede-se à determinação do serótipo utilizando soros apropriados (não indicados na Quadro 6). Os serótipos destes serogrupos são determinados pelo padrão de reacções entre as estirpes e os soros.

O teste no sistema em xadrez permite a tipagem de cerca de 90% de estirpes causadoras de infecções invasivas (Henrichsen, 1999).

Segundo Lund e Henrichsen (1978) e Sørensen (1993), as formas rugosas não capsuladas de *S. pneumoniae* reagem negativamente com todos os soros, não sendo por isso tipáveis.

### **Metodologia de serotipagem**

Numa lâmina sobre um fundo escuro são misturados cerca de 3 µl da suspensão bacteriana e 1 µl de soro (Statens Seruminstitut, Copenhaga, Dinamarca), de acordo com o sistema em xadrez proposto por Sørensen (1993). A aglutinação bacteriana, prova de uma reacção positiva, é frequentemente observável a olho nú. A utilização de um microscópio, equipado preferencialmente com contraste de fase e com uma lente de imersão em óleo (ampliação total de 1000x), torna-se necessária apenas quando a aglutinação bacteriana não é visível macroscopicamente.

Quando a reacção é positiva a cápsula torna-se visível pois reage com os anticorpos específicos presentes no soro (Lund e Henrichsen, 1978). Esta imunoprecipitação conduz a uma alteração do índice de refração e as bactérias aglutinam (Sørensen, 1993). Nem sempre a

quantidade dos anticorpos presentes no soro é suficiente para permitir que as cápsulas se tornem visíveis, quando assim é a aglutinação bacteriana é o único critério duma reacção positiva (Lund e Henrichsen, 1978).

## **Resultados da serotipagem**

### **Distribuição dos serótipos por grupos etários**

Os serótipos predominantes que incluíram cerca de metade da totalidade das estirpes foram por ordem decrescente de frequência o 1 (13,1%), 3 (12,2%), 19A (9,6%), 7F (8,1%), 14 (6,5%), e 8 (5,0%). No período de estudo, os serótipos 1, 3, 19A, 7F e 14 foram os mais prevalentes, embora de 2004 para 2005 o serótipo 7F tenha aumentado cerca de 3% ao mesmo tempo que o 14 diminuindo cerca de 4%.

Em função dos diferentes grupos etários, pretendeu-se determinar as alterações na frequência dos serótipos entre os dois períodos de estudo, o período de 1999 a 2002, que representa os dois primeiros anos da introdução da vacina em Portugal, e o período posterior, que decorreu entre 2004 e 2005.

É de realçar que a comparação dos dois períodos de estudo deve ser feita com atenção, uma vez que o primeiro período compreende 4 anos de estudo, abrangendo 465 estirpes, enquanto que no segundo período foram isoladas 617 estirpes em apenas dois anos.

Consideraram-se quatro grupos etários, o grupo de crianças menores de 2 anos, dos 2 aos 6 anos, superior ou igual a 6 anos e inferior a 60 anos, e superior ou igual a 60 anos. Os critérios que orientaram a fragmentação dos resultados por diferentes grupos foram os seguintes:

a) Crianças com idade inferior a 2 anos pertencem a um dos grupos etários considerado de risco para as infecções pneumocócicas (Whitney *et al.*, 2001). A vacina 7-valente é recomendada para todas as crianças até aos 2 anos (CDC, 2000), pelo que a avaliação do potencial impacto da vacinação na redução da doença pneumocócica depende do conhecimento dos serótipos prevalentes nesta população.

b) No grupo dos 2 aos 6 anos, que engloba a população em idade pré-escolar, o contacto entre crianças em creches constitui uma situação em que há transmissão frequente de *S. pneumoniae* (Sá-Leão *et al.*, 2000). De acordo com o CDC (2000), neste grupo etário e em caso de frequência de creche deve ser considerada a vacinação com a vacina 7-valente.

c) O grupo de indivíduos com idade superior ou igual a 60 anos é outro dos grupos etários considerado de risco para as doenças pneumocócicas (Whitney *et al.*, 2001) no qual é recomendada a vacina de polissacáridos 23-valente (CDC, 2000).

As figuras 8 a 11 mostram a frequência dos principais serótipos, expressos pelas estirpes isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005, nos diferentes grupos etários.

Em crianças com menos de 2 anos de idade (n=35) predominou o serótipo 19A (37,1%) não incluído na vacina. Os serótipos 1, 14, 19F e 23F representaram apenas 3 estirpes (8,6%) cada. No período de 1999 a 2002, neste grupo etário (n=57), os serótipos mais frequentes foram o 14 (26,3%), 23F (17,5%), 6B (8,8%), incluídos na vacina, e o 19A (8,8%) não incluído na vacina (Figura 8).

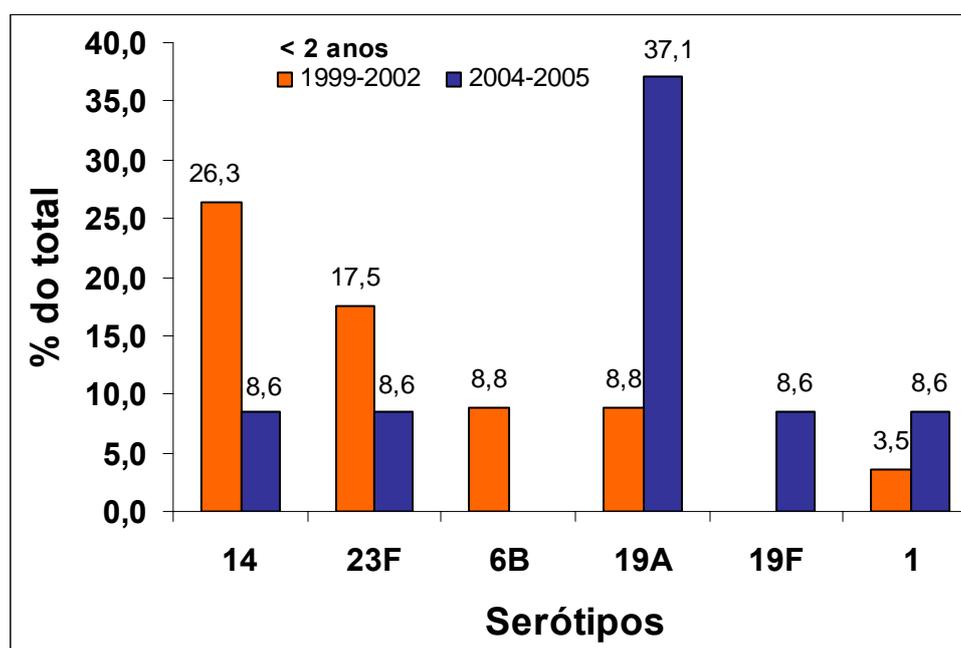


Figura 8

**Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com < 2 anos de idade.**

No grupo de crianças entre 2 e 6 anos de idade (n=35) os serótipos 1 (31,4%), 19A (14,3%) e 7F (11,4%) constituíram mais de metade do número total de estirpes e as restantes estirpes expressavam 10 serótipos diferentes. No período de 1999 a 2002, no mesmo grupo etário (n=25), o serótipo 1 era o mais prevalente (32,0%) em conjunto com o 14 (24,0%) (Figura 9).

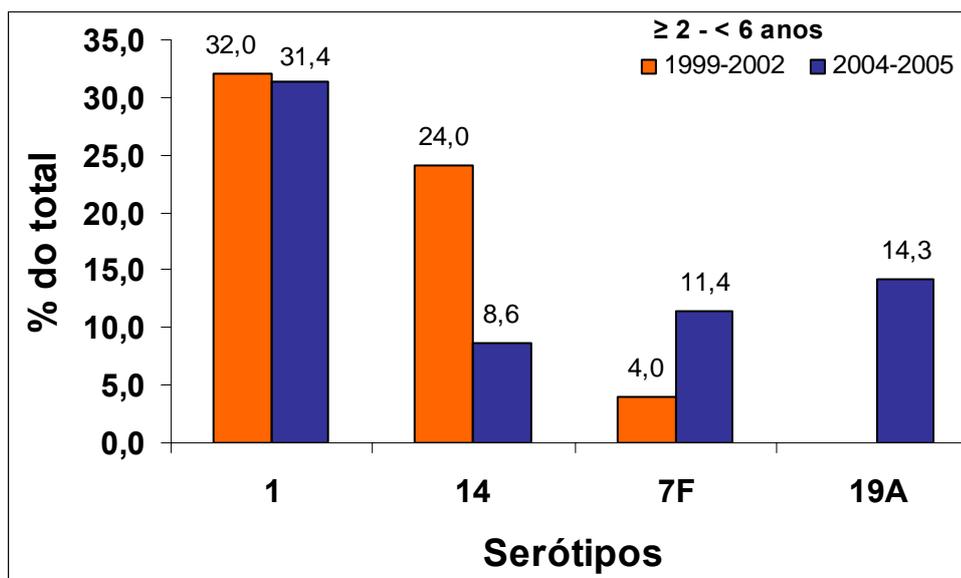


Figura 9

**Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com idade compreendida entre 2 e 6 anos.**

Em indivíduos com idade compreendida entre 6 e 60 anos ( $n=271$ ) bem como no grupo etário  $\geq 60$  anos ( $n=276$ ) houve uma maior dispersão dos serótipos. Os serótipos 1, 3, 7F, 14 e 19A predominaram em ambos os grupos mas numa ordem de frequência diferente. Nos indivíduos com idade compreendida entre 6 e 60 anos os serótipos prevalentes foram, por ordem decrescente de frequência, o 1 (18,1%), 3 (8,1%), 7F (7,7%), 19A (6,6%), 14 (7,0%) e 8 (5,9%), (Figura 10) enquanto que no grupo etário  $\geq 60$  anos os serótipos prevalentes foram o 3 (18,5%), 19A (8,3%), 7F (7,6%), 1 (6,5%), 22F (5,8%) e o 14 (5,4%) (Figura 11). Em ambos os grupos as restantes estirpes expressavam mais de 30 serótipos distintos.

De 1999 a 2002, em indivíduos com idade compreendida entre 6 e 60 anos e com idade  $\geq 60$  anos, também se observou uma grande dispersão dos serótipos. Neste período, nos indivíduos com idade compreendida entre 6 e 60 anos ( $n=210$ ), na lista dos serótipos mais frequentes incluíam-se os serótipos 4 e 9V, enquanto que os serótipos 7F e 19A pouco frequentes. Os serótipos que predominaram foram 1 (13,3%), 14 (8,6%), 4 (8,6%), 8 (7,6%), 3 (6,7%) e 9V (6,2%) (Figura 10). Finalmente, no grupo etário  $\geq 60$  anos ( $n=171$ ), na lista dos serótipos mais frequentes incluíam-se os serótipos 8 e 4, enquanto que os serótipos 19A, 7F e 22F eram pouco frequentes. Os serótipos 3 (16,4%), 14 (13,5%), 1 (7,0%), 8 (6,4%) e 4 (5,3%) constituíram cerca de metade do número total de estirpes (Figura 11).

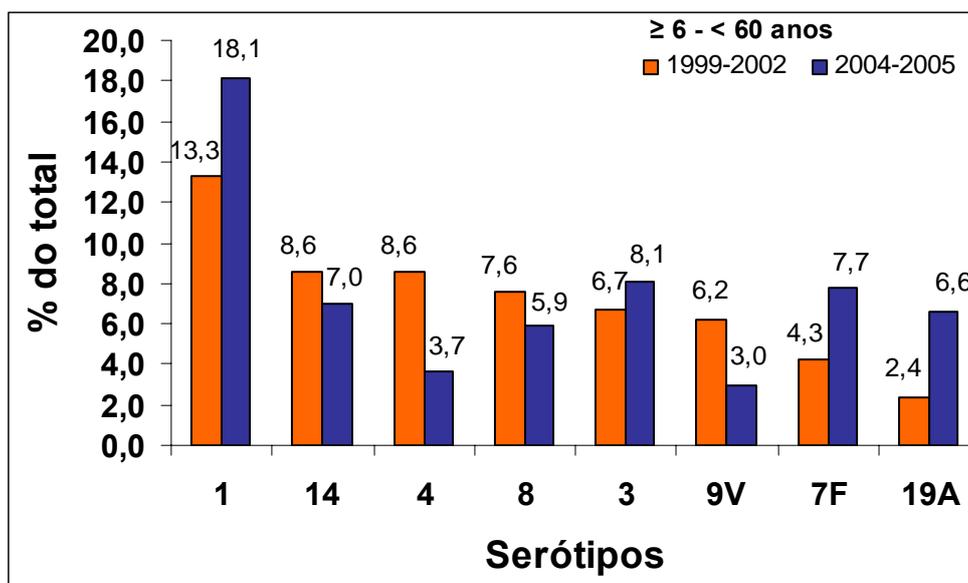


Figura 10

Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em indivíduos com idade compreendida entre 6 e 60 anos.

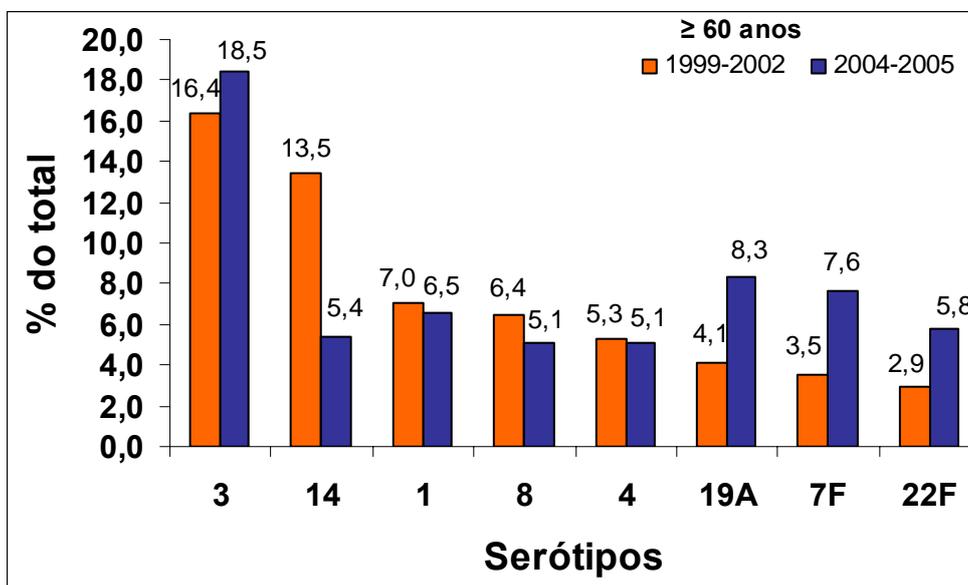


Figura 11

Frequência dos principais serótipos expressos por estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, isoladas entre 1999 e 2002 e entre 2004 e 2005 em Portugal, em adultos com idade  $\geq 60$  anos.

Estes resultados mostram claramente que houve uma alteração da frequência dos serótipos, entre o período de 1999 a 2002 e o período de 2004 a 2005, nos quatro grupos etários. Esta alteração deveu-se, provavelmente, à introdução da vacina conjugada em Portugal. De modo a realçar esta alteração o quadro 7 mostra a ordem e a frequência dos serótipos nas estirpes responsáveis por infecções invasivas, recolhidas de crianças com idade < 6 anos e na totalidade das estirpes, isoladas nos dois períodos de estudo.

### Quadro 7

**Percentagem e ordem de frequência dos serótipos expressos por estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, isoladas de 1999 a 2002 e de 2004 a 2005 em Portugal, em crianças com < 6 anos e na totalidade das estirpes.**

Serótipo	< 6 anos				Total			
	1999-2002 (n=82)		2004-2005 (n=70)		1999-2002 (n=465)		2004-2005 (n=617)	
	Ordem de frequência	% (n)	Ordem de frequência	% (n)	Ordem de frequência	% (n)	Ordem de frequência	% (n)
14	<b>1</b>	25.6 (21)	<b>3</b>	8,6 (6)	<b>1</b>	13.3 (62)	<b>5</b>	6,5 (40)
1	<b>3</b>	12.2 (10)	<b>2</b>	20,0 (14)	<b>2</b>	10.8 (50)	<b>1</b>	13,1(81)
3	<b>6</b>	3.7 (3)	<b>7</b>	2,9 (2)	<b>3</b>	9.7 (45)	<b>2</b>	12,2(75)
4	-	0,0	<b>11</b>	1,4 (1)	<b>4</b>	5.8 (27)	<b>8</b>	4,1 (25)
8	-	0,0	<b>11</b>	1,4 (1)	<b>4</b>	5.8 (27)	<b>6</b>	5,0 (31)
23F	<b>2</b>	17.1 (14)	<b>6</b>	4,3 (3)	<b>6</b>	4.7 (22)	<b>11</b>	3,1 (19)
9V	<b>6</b>	3.7 (3)	-	0,0	<b>6</b>	4.7 (22)	<b>11</b>	3,1 (19)
7F	<b>6</b>	3.7 (3)	<b>3</b>	8,6 (6)	<b>8</b>	3.9 (18)	<b>4</b>	7,8 (48)
19A	<b>5</b>	6.1 (5)	<b>1</b>	25,7 (18)	<b>9</b>	3.7 (17)	<b>3</b>	9,6 (59)
12B	-	0,0	<b>11</b>	1,4 (1)	<b>10</b>	3.4 (16)	<b>14</b>	2,1 (13)
6B	<b>4</b>	9.8 (8)	<b>11</b>	1,4 (1)	<b>11</b>	3.0 (14)	<b>20</b>	1,1 (7)
6A	<b>10</b>	2.4 (2)	<b>11</b>	1,4 (1)	<b>12</b>	2.8 (13)	<b>9</b>	3,6 (22)
NT	-	0.0	<b>11</b>	1,4 (1)	<b>12</b>	2.8 (13)	<b>16</b>	1,8 (11)
18C	<b>10</b>	2.4 (2)	<b>7</b>	2,9 (2)	<b>14</b>	2.6 (12)	<b>16</b>	1,8 (11)

	< 6 anos				Total			
	1999-2002 (n=82)		2004-2005 (n=70)		1999-2002 (n=465)		2004-2005 (n=617)	
5	<b>13</b>	1.2 (1)	-	0,0	<b>14</b>	2.6 (12)	<b>36</b>	0,2 (1)
22F	-	0,0	<b>7</b>	2,9 (2)	<b>16</b>	2.4 (11)	<b>7</b>	4,2 (26)
9N	<b>13</b>	1.2 (1)	-	0,0	<b>17</b>	2.2 (10)	<b>22</b>	0,8 (5)
19F	<b>13</b>	1.2 (1)	<b>3</b>	8,6 (6)	<b>18</b>	1.9 (9)	<b>13</b>	2,9 (18)
10A	<b>10</b>	2.4 (2)	<b>7</b>	2,9 (2)	<b>18</b>	1.9 (9)	<b>14</b>	2,1 (13)
11A	-	0,0	-	0,0	<b>20</b>	1.5 (7)	<b>10</b>	3,2 (20)
33F	<b>6</b>	3.7 (3)	<b>11</b>	1,4 (1)	<b>21</b>	1.3 (6)	<b>20</b>	1,1 (7)
20	-	0,0	-	0,0	<b>22</b>	1.1 (5)	<b>26</b>	0,5 (3)
18A	-	0,0	-	0,0	<b>22</b>	1.1 (5)	<b>26</b>	0,5 (3)
13	-	0,0	-	0,0	<b>25</b>	0,6 (3)	<b>22</b>	0,8 (5)
23A	-	0,0	-	0,0	<b>34</b>	0,2 (1)	<b>18</b>	1,3 (8)
33A	-	0,0	-	0,0	<b>34</b>	0,2 (1)	<b>22</b>	0,8 (5)
15A	-	0,0	-	0,0	-	-	<b>18</b>	1,3 (8)
Outros <sup>a</sup>	-	3.7 (3)	-	2,9 (2)	-	6,0 (28)	-	5,5 (34)

<sup>a</sup> Serótipos com menos de 5 estirpes nos dois períodos de estudo (7C, 9A, 9L, 10B, 10F, 11B, 12F, 15B, 15C, 16F, 17F, 21, 23B, 24A, 24F, 25A, 25F, 31, 34, 35B, 35C, 35F, 36, 37 e 38).

Nas duas fases do estudo, a ordem de frequência dos serótipos, que contabilizaram mais de 50% das estirpes, foi diferente no grupo etário < 6 anos e na totalidade das estirpes.

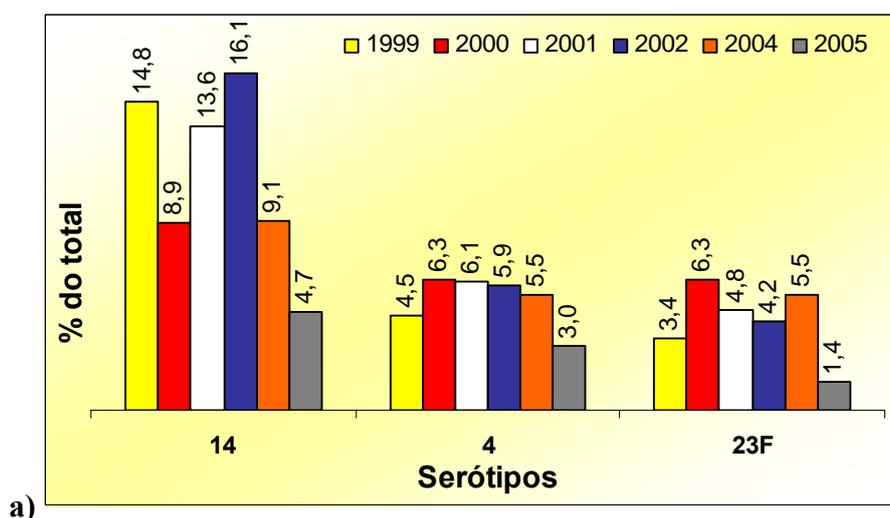
No grupo etário < 6 anos, no período de estudo de 2004 a 2005, os serótipos mais frequentes foram o 19A (25,7%) e o 1 (20,0%), em vez do 14 (25,6%) e do 23F (17,1%) prevalentes no período de 1999 a 2002. De 2004 a 2005 os serótipos 7F e 19F foram os terceiros mais prevalentes, em simultâneo com o serótipo 14, tendo aumentado notoriamente de frequência relativamente ao período entre 1999 e 2002. Surgiram pela primeira vez estirpes que expressavam os serótipos 4, 8, 12B, 22F e estirpes não tipáveis e desapareceram estirpes expressando os serótipos 5, 9N e 9V (Quadro 7).

Na totalidade das estirpes analisadas, no período de estudo de 2004 a 2005, os serótipos mais frequentes foram o 1 (13,1%), o 3 (12,2%) e o 19A (9,6%), em vez do 14 (13,3%), do 1 (10,8%) e do 3 (9,7%) que foram prevalentes de 1999 a 2002. Do grupo dos 10 serótipos mais frequentemente encontrados de 1999 a 2002 estiveram ausentes, entre 2004 e 2005, os serótipos 9V, 12B e 23F e presentes os serótipos 6A, 11A e 22F. Surgiram pela primeira vez os serótipos 15A (Quadro 7), com 8 representantes, e os serótipos 9L, 10B, 12F, 15C, 21, 24A, 34, 35C e 37 com menos de 5 estirpes cada (serótipos incluídos na linha designada, outros, do quadro 7).

### Variação da frequência dos serótipos em cada ano de estudo

Na figura 12 mostram-se as percentagens dos serótipos encontrados na totalidade das estirpes, que estão incluídos ou não incluídos na vacina 7-valente, em cada ano de estudo.

A variação na frequência dos serótipos nem sempre foi observada continuamente de ano para ano, sendo por isso designada como tendência. Foi possível observar uma tendência para os serótipos 4, 14, e 23F (Figura 12a) diminuírem de frequência e para os serótipos 3, 7F e 19A (Figura 12b) aumentarem de frequência. Os serótipos 1, 6A, 6B, 8, 9V, 11A, 18C, 19F e 22F não mostraram uma tendência clara para aumentarem ou diminuírem de frequência e o serótipo 12B manteve-se relativamente estável (Figura 12c).



Continua na página seguinte

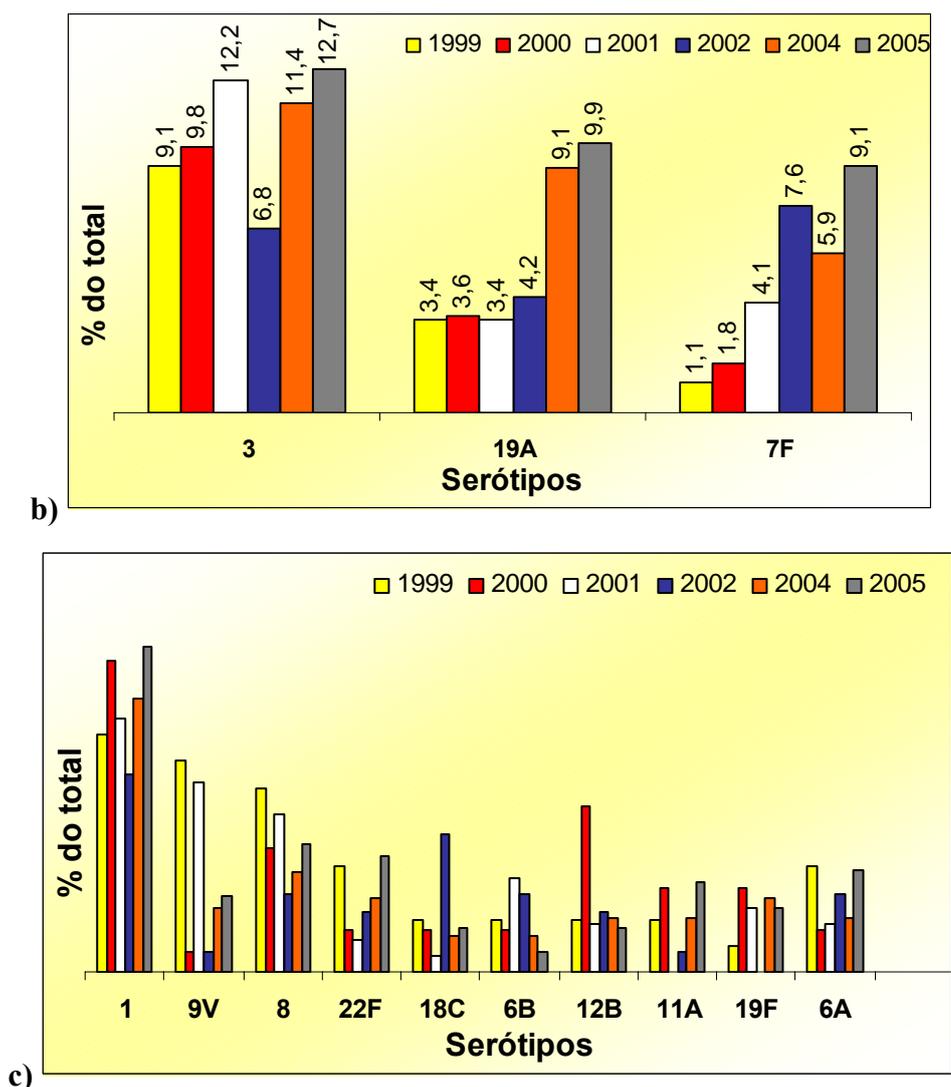


Figura 12

**Proporção de alguns serótipos encontrados na totalidade das estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, em Portugal, em cada ano de estudo.** a) Serótipos em que se observou uma tendência para diminuir de frequência. b) Serótipos em que se observou uma tendência para aumentarem de frequência. c) Serótipos em que não se observou uma tendência de aumento ou decréscimo da frequência.

Dos serótipos incluídos na vacina 7-valente, os serótipos 14, 4 e 23F foram os que evidenciaram uma tendência para diminuir de frequência (Figura 12a, Quadro 7). O serótipo 14, de 1999 a 2002, oscilou entre 8,9% (2000) e 16,1% (2002) e posteriormente decresceu acentuadamente de 9,1% (2004) para 4,7% (2005). O serótipo 4 variou ligeiramente entre 4,5% (1999) e 6,3% (2000) com decréscimo de 5,9% (2004) para 3,0% (2005). A frequência do serótipo 23F variou entre 6,3% (2000) e 3,4% (1999) e decresceu de 5,5%, em 2004, para 1,4%,

em 2005 (Figura 12a). De acordo com os dados de 2003 (Aguiar, comunicação pessoal), foi possível verificar que o serótipo 14 decresceu desde 2002, o 4 desde 2003 (ano onde atingiu a frequência mais elevada), o 23F decresceu desde 2004.

De entre os serótipos que apresentaram uma tendência para aumentarem de frequência nenhum estava incluído na vacina 7-valente. O serótipo 3 aumentou de frequência, de 9,1% em 1999, para 12,2% em 2001, diminuindo para 6,8% em 2002. De 2004 para 2005, foi isolado em 11,4% e 12,7% das estirpes. O serótipo 19A manteve-se quase estável de 1999 a 2002, com valores entre 3,4% (1999 e 2001) e 4,2% (2002). De 2004 para 2005 aumentou de frequência, passando de 9,1% para 9,9%. O serótipo 7F, de 1999 a 2002, cresceu de 1,1% para 7,6% e, apesar de ter obtido apenas 5,9% em 2004, atingiu 9,1% em 2005 (Figura 12b). Tendo em conta os dados de 2003 (Aguiar, comunicação pessoal) foi possível verificar que o serótipo 3 e 19A estão a aumentar de frequência desde 2002 e que houve uma tendência de crescimento no serótipos 7F desde 2003.

Num grande número de serótipos frequentes na população de *S. pneumoniae* causadora de infecções invasivas em Portugal não apresentaram uma tendência clara para crescerem ou decrescerem de frequência (Figura 12c). O serótipo 1 oscilou de 1999 a 2002, entre 8,5% (2002) e 13,4% (2000), tendo de seguida aumentado de frequência de 11,8% (2004) para 14,0% (2005). Segundo os dados de Aguiar (comunicação pessoal), foi possível concluir que houve uma tendência de crescimento neste serótipo desde 2003. O serótipo 9V em 1999 (9,1%) e 2001 (8,2%) tinha frequências muito elevadas, enquanto que em 2000 (0,9%) e 2002 (0,8%) as frequências foram mais baixas. Apesar destas acentuadas variações, parece que o serótipo 9V cresceu desde 2003 tendo atingido em 2004 e 2005, 2,8% e 3,3%, respectivamente.

A frequência do serótipo 8 oscilou de 8,0% (1999) a 3,4% (2002) e aumentou de 4,3% para 5,5%, de 2004 a 2005. Tendo em conta os dados de 2003 é notório que este serótipo subiu e desceu de frequência consecutivamente até 2004. O serótipo 22F oscilou entre 1999 e 2002, registando a frequência mínima de 1,8% e máxima de 4,5%. Houve uma tendência de crescimento neste serótipo desde 2003 (Aguiar, comunicação pessoal) que atingiu 3,1%, em 2004, e 5,0%, em 2005.

O serótipo 18C diminuiu de 1999 (2,3%) até 2001 (0,7%), atingindo em 2002 o seu valor máximo (5,9%). Em 2004 e 2005 cerca de 2% das estirpes expressavam este serótipo. A frequência observada em 2003 permitiu verificar que ele decresceu desde 2002. O serótipo 6B, entre 1999 e 2002, variou entre 1,8% (2000) e 4,1% (2001), atingindo 1,6% em 2004 e apenas 0,8% em 2005 (Figura 12c). De acordo com os dados de 2003 este serótipo decresceu desde 2001.

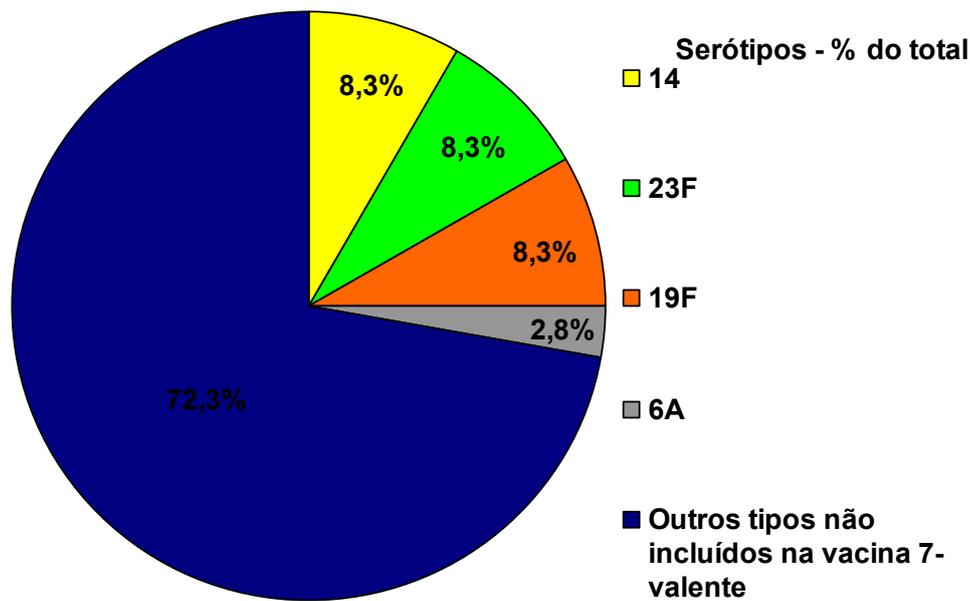
A frequência mais elevada do serótipo 12B deu-se em 2000 (7,1%), nos restantes anos de estudo a frequência manteve-se em cerca de 2%. De acordo com os dados de Aguiar (comunicação pessoal) a frequência deste serótipo permaneceu relativamente estável desde 2001. Em relação ao serótipo 11A, este aumentou de frequência de 2,3% para 3,6% (1999 a 2000) mas, em 2001 e 2002, não foi isolada nenhuma ou quase nenhuma estirpe expressando este serótipo. Depois deste período, o serótipo 11A aumentou de frequência atingindo 2,4% em 2004 e 3,9% em 2005. O número máximo de estirpes expressando o serótipo 11A foi isolado em 2003, tornando difícil prever a real tendência de crescimento deste serótipo.

O serótipo 19F decresceu gradualmente desde 2000, não tendo sido isolado em 2002 e apenas uma estirpe expressando este serótipo foi isolada em 2003 (Aguiar, comunicação pessoal). Em 2004 e 2005 cerca de 3% das estirpes expressavam o serótipo 19F, o que indica que ele aumentou de frequência desde 2003. Finalmente, o serótipo 6A oscilou entre 4,5% (1999) e 1,8% (2000), atingindo 3,4% em 2002. Entre 2004 (2,4%) e 2005 (4,4%) quase que duplicou de frequência (Figura 12c). Por outro lado, o número máximo de estirpes expressando o serótipo 6A foi isolado em 2003, o que reforça o carácter oscilante deste serótipo.

A alteração na frequência dos serótipos 1, 7F, 14 e 19A foi notória em todos os grupos etários analisados. Contudo, como já descrito em “Distribuição dos serótipos por grupos etários” a variação na frequência de alguns serótipos não se deu igualmente em todos os grupos etários. Assim, as alterações nos serótipos 6B e 23F foram mais visíveis nas crianças do grupo escolar, enquanto que as alterações nos serótipos 3, 4, 8 e 9V foram mais visíveis no grupo etário  $> 6$  e  $\leq 60$  anos. As alterações nos serótipos 3, 4, 8 foram também evidentes no grupo  $\geq 60$  anos onde foi visível o aumento da frequência do serótipo 22F.

### **Potencial cobertura das vacinas anti-pneumocócicas**

A potencial cobertura da vacina conjugada 7-valente num grupo etário foi definida como a percentagem de indivíduos desse grupo em que a vacina conferiria imunidade contra o serótipo causador da doença invasiva que os afectou. Na figura 13 representa-se a potencial cobertura da vacina 7-valente em crianças com idade inferior a dois anos. Nestes cálculos incluiu-se o serótipo 6A devido à protecção cruzada conferida pelos anticorpos contra o tipo 6B que se encontra nesta vacina (Dagan *et al.*, 2002).



**Figura 13**  
**Potencial cobertura dos serótipos da vacina 7-valente, nas 35 estirpes de *S. pneumoniae* isoladas, entre 2004 e 2005, em crianças (< 2 anos) com infecções invasivas, em Portugal.**

Verificou-se que a cobertura da vacina seria de apenas 28,6% (n=10) em crianças com menos de 2 anos de idade. Os serótipos incluídos na vacina com representantes neste grupo etário foram os serótipos 14, 23F e 19F com 8,3% (n=3) cada (Figura 13) e o 6A (2,8%, n=1). As restantes 25 estirpes representavam no total 7 serótipos não incluídos na vacina 7-valente (1, 3, 7F, 10A, 19A, 22F, 33F) e estirpes não tipáveis.

A figura 14 mostra a potencial cobertura das vacinas conjugadas, 7-valente, 9-valente, 11-valente e polissacarídica 23-valente, na doença invasiva causada por *S. pneumoniae*, em cada grupo etário.

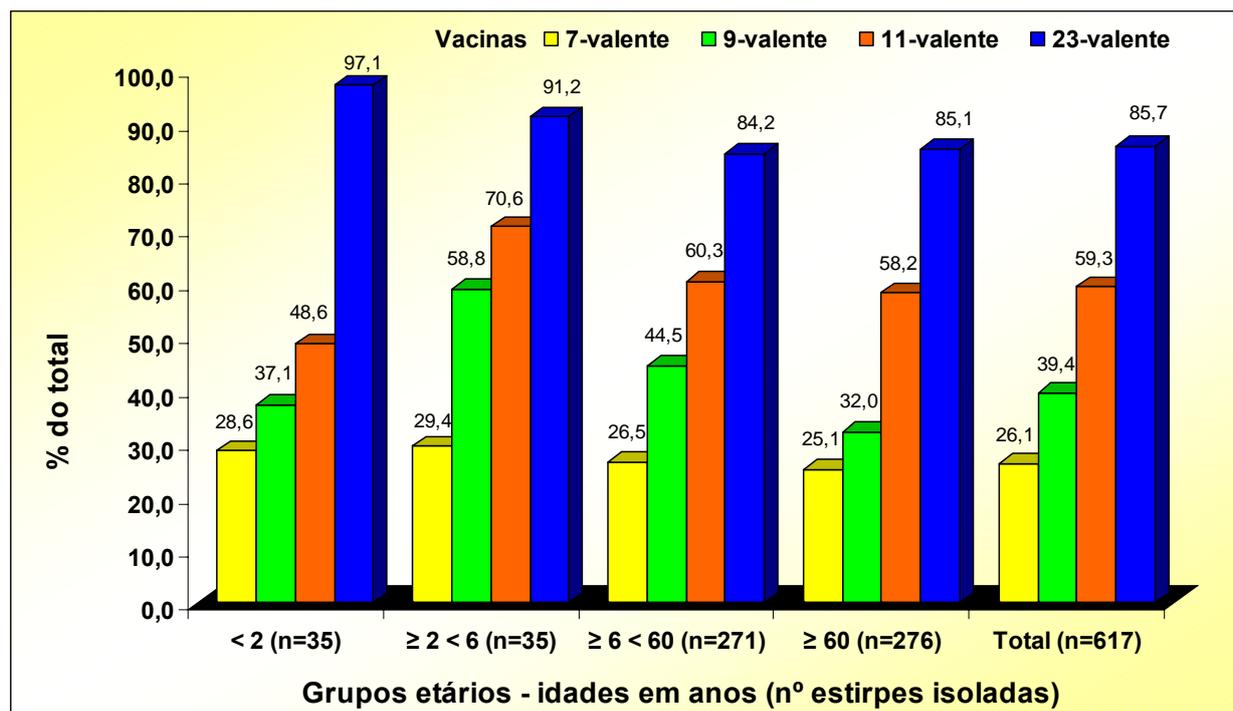


Figura 14

Potencial cobertura das vacinas 7-valente, 9-valente, 11-valente e 23-valente, considerando as estirpes de *S. pneumoniae* isoladas, entre 2004 e 2005, em cada grupo etário, em indivíduos com infecções invasivas, em Portugal.

As potenciais coberturas das três vacinas conjugadas, 7, 9 e 11-valente, seriam superiores no período de 1999 a 2002, sobretudo nas crianças, devido à diminuição da frequência dos serótipos incluídos na vacina 7-valente.

A vacina 7-valente apresentaria uma cobertura abaixo dos 30% em todos os grupos etários: 28,6% (< 2anos), 29,4% (≥ 2-6 anos), 26,5% (≥ 6- 60 anos) e 25,1% (≥ 60 anos) (Figura 14). O número reduzido de infecções em crianças menores de 6 anos de idade, potencialmente evitáveis pela vacina 7-valente, deveu-se sobretudo à diminuição da frequência dos serótipos 6B, 14 e 23F (Figura 8 e 9).

De 1999 a 2002 a cobertura da vacina 7 valente seria de 63,2% (< 2 anos) e 60% (≥ 2-6 anos), valores mais de duas vezes superiores aos encontrados no período de 2004 a 2005 nessas faixas etárias. E seria de 33% (≥ 6 a 60 anos) e 35,1% (≥ 60 anos), valores também superiores aos encontrados no período de 2004 a 2005 nesses mesmos grupos.

A cobertura da vacina 9-valente seria de 37,1% (< 2 anos), 58,8%(≥ 2-6 anos), 44,5% (≥ 6- 60 anos) e 32,0%(≥ 60 anos) (Figura 14). Em crianças entre 2 e os 6 anos, devido à elevada representação do serótipo 1 (Figura 9), a vacina 9-valente teria uma cobertura 2 vezes superior à

7-valente. Este foi o único grupo etário em que a vacina 9-valente cobriria mais de metade dos indivíduos.

De 1999 a 2002, a vacina 9-valente cobriria pelo menos metade dos indivíduos de todos os grupos etários, com a excepção do grupo  $\geq 60$  anos. Foi também em crianças entre 2 e 6 anos que a vacina 9-valente teria a sua mais elevada cobertura, atingindo 92%, substancialmente superior ao valor de 2004-2005, devido à elevada frequência do serótipo 1.

A cobertura da vacina 11-valente seria de 48,6% ( $< 2$  anos), 70,6% ( $\geq 2-6$  anos), 60,3% ( $\geq 6-60$  anos) e 58,2% ( $\geq 60$  anos), protegendo mais de metade dos indivíduos em todos os grupos etários à excepção do grupo  $< 2$  anos (Figura 14). O grupo etário mais favorecido com a introdução da vacina 11-valente seria o grupo  $\geq 60$  anos, no qual a passagem da vacina 9-valente para a 11-valente cobriria mais 26,2% dos casos de infecção pneumocócica invasiva, devido à predominância de estirpes dos serótipos 3 e 7F neste grupo (Figura 11).

A potencial cobertura da vacina 11-valente foi, de 1999 a 2002, mais elevada apesar de, entre 2004 e 2005, se ter observado um aumento da frequência do serótipo 7F, incluído nesta vacina. De 1999 a 2002, a vacina 11-valente cobriria 77,2% ( $< 2$  anos), 96% ( $\geq 2-6$  anos), 60,8% ( $\geq 6$  a 60 anos) e 63,7% ( $\geq 60$  anos). O grupo etário mais favorecido seria também o grupo  $\geq 60$  anos, devido à predominância do serótipo 3.

A cobertura da vacina 23-valente seria de 97,1% ( $< 2$ anos), 91,2% ( $\geq 2-6$  anos), 84,2% ( $\geq 6-60$  anos) e 85,1% ( $\geq 60$  anos) (Figura 14). Para as crianças com menos de 2 anos observou-se um acréscimo de 48,5% na cobertura da vacina 23-valente, em relação à vacina 11-valente, uma vez que o serótipo 19A foi o prevalente neste grupo etário (Figura 8). Este resultado deve ser ponderado com a fraca imunogenicidade da vacina neste grupo etário. Nos outros grupos houve um acréscimo de cerca de 20%, na potencial cobertura da vacina polissacarídica, devido principalmente à presença dos serótipos 8 e 19A nos grupos  $\geq 6 - 60$  anos e  $\geq 60$  e do serótipo 22F no grupo  $\geq 60$  anos (Figura 10 e 11).

A cobertura da vacina 23-valente seria ligeiramente superior entre 2004 e 2005, relativamente ao período de 1999 a 2002, excepto em crianças entre 2 e 6 anos de idade. As diferenças na potencial cobertura desta vacina, entre os dois períodos de estudo, variaram entre 4 a 11% e podem ser atribuídas fundamentalmente ao aumento da frequência do serótipo 19A.

De 1999 a 2002 observou-se um acréscimo entre 16 a 17% na cobertura da vacina 23-valente, em relação à vacina 11-valente, para os indivíduos com idade superior a 6 anos, devido sobretudo à presença do serótipo 8 nos grupos etários ( $\geq 6$  a 60 anos) e ( $\geq 60$  anos) que não foi detectado nas estirpes isoladas de indivíduos com idade inferior a 6 anos.

Nos dois períodos de estudo os serótipos não incluídos em qualquer vacina foram de 14,3% (2004 a 2005) e de 19,4% (1999 a 2002) de todas as infecções invasivas, dos quais 1,8% (2004 a 2005) e 2,8% (1999 a 2002) não foram tipáveis.

Todos estes resultados, em conjunto, evidenciam uma alteração da composição dos serótipos, entre os dois períodos de estudo, e ajudam a clarificar o papel da vacina nesta alteração em cada grupo etário.

## **Resistência aos antimicrobianos**

### **Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos**

A escolha dos antibióticos a serem analisados teve por base a sua utilização clínica e a sua importância como marcadores epidemiológicos. Foram ensaiados a penicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cotrimoxazol, e cloranfenicol. Para que o estudo tivesse uma base informativa mais ampla foi também incluída uma nova fluoroquinolona com actividade anti-pneumocócica a levofloxacina.

A susceptibilidade aos antibióticos eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cotrimoxazol, e cloranfenicol foi determinada pelo teste de difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer, utilizando discos (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), contendo as quantidades recomendadas para cada antimicrobiano (CLSI, 2006). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da penicilina e levofloxacina foram determinadas utilizando tiras de E-teste (AB Biodisk®, Solna, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados de ambos os testes são comparáveis na identificação de estirpes susceptíveis, intermédias e resistentes aos antimicrobianos ensaiados (Wang *et al.*, 1998).

O E-teste permite a determinação da susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos (valor de CIM). Neste sistema, um gradiente de concentração de antibiótico predefinido e estável é usado para determinar a CIM de esse antimicrobiano. Este teste apresenta valores de concentrações sequenciais de acordo com o fabricante, ao contrário dos testes de diluição em meios líquidos ou sólidos (que apresentam valores de diluições duplas) que são os métodos de referência para a determinação das CIMs (CLSI, 2006).

No teste de difusão pela técnica de Kirby-Bauer forma-se uma zona de inibição do crescimento da bactéria, quando esta é susceptível ao antimicrobiano presente no disco. Neste

caso, o antibiótico difunde-se radialmente, sendo a dimensão do diâmetro da inibição função, quer da quantidade do antibiótico nos discos, quer da susceptibilidade do microrganismo.

### **Metodologias de E-Teste e teste de difusão pela técnica de Kirby-Bauer**

As colónias foram dispersas numa solução salina (NaCl 0,84%), até se alcançar uma turvação igual à dos padrões 0,5 McFarland e 1 McFarland (no caso de estirpes fortemente capsuladas), de modo a que o inóculo final fosse de  $5 \times 10^5$  ufc/ml previamente semeadas em placas de gelose Mueller Hinton com suplemento de 5% de sangue de carneiro (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). Os E-testes e os discos de antibióticos foram aplicados na superfície destas placas que foram posteriormente incubadas a 35°C durante a noite (CLSI, 2006).

A interpretação dos resultados do E-teste foi baseada nos valores das concentrações críticas indicadas pelo CLSI (2006). Quando a leitura se posicionou entre dois valores, considerou-se o valor mais elevado, de acordo com as instruções do fabricante (AB Biodisk®, Solna, Suécia). A interpretação dos resultados de susceptibilidade em disco foi baseada na leitura dos valores do diâmetro da inibição, conforme as indicações do CLSI (2006). Com base nestes dados determinou-se o fenótipo de susceptibilidade microbiana (resistência elevada, resistência intermédia ou susceptível).

A estirpe utilizada como controlo foi *S. pneumoniae* ATCC 49619. A determinação da CIM desta estirpe foi efectuada semanalmente e sempre que se utilizou um novo lote de meio, de tiras de E-teste ou de discos contendo antimicrobianos.

### **Resultados da resistência aos antimicrobianos**

#### **Resistência aos antimicrobianos por grupos etários**

A susceptibilidade à penicilina e à levofloxacina das 617 estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas está representada no quadro 8 e 9, onde se apresentam, para além do número de estirpes resistentes aos antimicrobianos ensaiados, os intervalos de variação da CIM, os valores da CIM<sub>50</sub> (valor da CIM correspondente à inibição de metade das estirpes isoladas), da CIM<sub>90</sub> e a resistência aos antimicrobianos (R) exibidos pelas estirpes de *S. pneumoniae*.

As estirpes estão diferenciadas por grupos etários: “pediátricos” ( $\leq 18$  anos) e não pediátricos. Os resultados dos doentes pediátricos foram divididos em três categorias: indivíduos com idade inferior a 6 meses, crianças em idade pré-escolar ( $\geq 6$  meses a  $< 6$  anos), onde se encontram frequentemente clones internacionais em Portugal (de Lencastre *et al.*, 1999), e crianças e jovens com idade superior ou igual a 6 anos e inferior a 18 anos, que, por

conveniência de designação, será o grupo de idade escolar. A inclusão deste grupo é importante pois permite avaliar os resultados das estirpes isoladas de indivíduos onde a frequência da prescrição de antibióticos é mais elevada em relação ao grupo etário seguinte ( $\geq 18$  anos) (McCaig *et al.*, 2003).

#### Quadro 8

**Susceptibilidade à penicilina em estirpes de *S. pneumoniae*, isoladas entre 2004 e 2005, de indivíduos com infecções invasivas em Portugal, em cada grupo etário e no total.**

Grupos etários (nº estirpes)	Penicilina				
	CIM	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	n	R (%)
< 6 meses (n=9)	0,08 - 2	0,016	2	3	33,3
$\geq 6$ meses < 6 anos (n=61)	0,008-12	0,023	1	18	29,5%
$\geq 6 < 18$ anos (n=23)	0,003-0,23	0,023	0,125	6	26,1%
$\geq 18$ anos (n=524)	0,003-4	0,016	0,5	81	15,5
Total (n=617)	0,003-12	0,016	0,5	108	17,5

#### Quadro 9

**Susceptibilidade à levofloxacina em estirpes de *S. pneumoniae*, isoladas entre 2004 e 2005, de indivíduos com infecções invasivas em Portugal, em cada grupo etário e no total.**

Grupos etários (nº estirpes)	Levofloxacina				
	CIM	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	n	R (%)
< 6 meses (n=9)	0,38-1,5	0,5	1,5	0	-
$\geq 6$ meses < 6 anos (n=61)	0,25-2	0,5	0,75	0	-
$\geq 6 < 18$ anos (n=23)	0,38-1	0,5	0,75	0	-
$\geq 18$ anos (n=524)	0,25-4	0,5	1	1	0,2
Total (n=617)	0,25-4	0,5	1	1	0,2

Os resultados verificados para o grupo < 6 meses deve ser encarado com prudência uma vez que o número de estirpes foi reduzido, n=9.

Por análise do quadro 8 verificou-se que a resistência à penicilina apresentada pela totalidade das estirpes foi de 17,5% (n=108). As estirpes isoladas em doentes com idade superior a 18 anos apresentaram uma percentagem de resistência que não diferiu significativamente desta, 15,5%. Em indivíduos com idade pré-escolar e escolar as estirpes isoladas foram as que demonstraram

maior resistência à penicilina, 29,5% e 26,1%. No grupo etário < 6 meses, 33,3% das estirpes isoladas eram resistentes à penicilina mas este valor correspondeu a apenas 3 estirpes.

De 1999 a 2002, na totalidade das estirpes analisadas (n= 465), a resistência à penicilina foi de 23,0% e, em crianças < 6 anos (n=82), foi de 43,9%, valores superiores aos observados no período de estudo de 2004 a 2005, sobretudo em crianças < 6 anos.

De 2004 a 2005 apenas uma estirpe isolada dum indivíduo adulto (82 anos) exibiu resistência intermédia à levofloxacina (Quadro 9). Esta estirpe, do serótipo 9V, mostrava também resistência elevada à penicilina e ao cotrimoxazol e resistência intermédia à tetraciclina. De 1999 a 2002 a resistência (elevada) à levofloxacina foi observada em apenas uma estirpe isolada dum indivíduo adulto que expressava o serótipo 14 e era multiresistente a outros antimicrobianos, entre os quais a penicilina.

No quadro 10 comparam-se, para os diferentes grupos etários, o número de estirpes resistentes aos antibióticos ensaiados, pelo teste de difusão (técnica de Kirby-Bauer).

#### Quadro 10

**Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *S. pneumoniae*, isoladas entre 2004 e 2005, em indivíduos com infecções invasivas em Portugal, em cada grupo etário e no total.**

Antibiótico	Grupos etários (nº de estirpes)								Total (n=617)	
	< 6 meses (n=9)		≥ 6 meses < 6 anos (n=61)		≥ 6 < 18 anos (n=23)		≥ 18 anos (n=524)		n	%
Eritromicina	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Eritromicina	3	33,3	15	24,6	2	8,7	73	13,9	93	15,1
Clindamicina	3	33,3	12	19,7	2	8,7	62	11,8	79	12,8
Tetraciclina	2	22,2	11	18,0	2	8,7	64	12,2	79	12,8
Cotrimoxazol	3	33,3	14	23,0	1	4,3	87	16,6	105	17,0
Cloranfenicol	0	-	3	4,9	0	-	17	3,2	20	3,2

Por análise do quadro 10 verificou-se que a resistência aos antimicrobianos em todas as faixas etárias foi a seguinte: 15,1% (n=94) à eritromicina, 12,8% (n=80) à clindamicina, 12,8% (n=79) à tetraciclina, 17,0% (n=105) ao cotrimoxazol e finalmente 3,2% (n=20) ao cloranfenicol. No grupo etário  $\geq 18$  anos observaram-se valores de resistência aos antimicrobianos que foram semelhantes aos da totalidade das faixas etárias, enquanto que no grupo de crianças com menos de 6 anos registaram-se os valores mais elevados de resistência.

A resistência à eritromicina e à clindamicina nas estirpes isoladas dos indivíduos com idade inferior a 6 meses foi de 33,3% e no grupo de idade escolar foi de 8,7%, sendo muito semelhante no grupo  $\geq 6$  meses  $< 6$  (24,6% e 19,7%) e no grupo  $\geq 18$  anos (13,9% e 11,8%), devido ao mecanismo de resistência cruzada exibido pelas estirpes contra os macrólidos e lincosamidas, referido na introdução (Quadro 10).

Das 93 estirpes resistentes aos macrólidos, o fenótipo de resistência cruzada aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B, fenótipo MLS<sub>B</sub>, observou-se em 76 estirpes (81,7%). O fenótipo M verificou-se em 14 estirpes (15,1%). A maior parte das estirpes, 72,4%, com fenótipo MLS<sub>B</sub> era resistente à tetraciclina (n=55) e 6,6% também ao cloranfenicol (n=5). Apenas 3 estirpes com fenótipo de resistência M exibiram resistência à tetraciclina. Das estirpes isoladas com resistência aos macrólidos, 47 (61,8%) com o fenótipo MLS<sub>B</sub> e 7 (50%) com o fenótipo M, eram resistentes à penicilina e expressavam maioritariamente os serótipos 19A, 14 e no caso das estirpes com o fenótipo MLS<sub>B</sub> também o serótipo 15A.

A resistência à tetraciclina foi mais elevada nos indivíduos com idade inferior a 6 meses (22,2%) e crianças em idade pré-escolar (18,2%), atingindo a frequência mais baixa no grupo de idade escolar (8,7%) e 12,2% no grupo de indivíduos de idade superior ou igual a 18 anos (Quadro 10).

O grupo de crianças com idade inferior a 6 meses e o grupo etário pré-escolar apresentaram as resistências mais elevadas ao cotrimoxazol, 33,3% e 23,0%, respectivamente, tendo o grupo de indivíduos com idade superior ou igual a 18 anos apresentado 16,6%. Estes valores foram cerca de 4 a 8 vezes inferiores ao verificado nas estirpes isoladas de crianças em idade escolar (4,3%).

Apenas no grupo de crianças em idade pré-escolar e no grupo de indivíduos de idade  $\geq 18$  anos houve resistência ao cloranfenicol, nestes grupos etários 4,9% e 3,2% das estirpes eram resistentes a este antimicrobiano.

### Varição da resistência aos antimicrobianos em cada ano de estudo

Ocorreu uma variação na resistência aos antimicrobianos entre os dois períodos de estudo, que nem sempre foi observada continuamente de ano para ano nem em todos os antimicrobianos. Na figura 15 está representada a resistência à penicilina, cotrimoxazol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloranfenicol observadas em cada ano, nos dois períodos de estudo, em crianças com idade inferior a 6 anos.

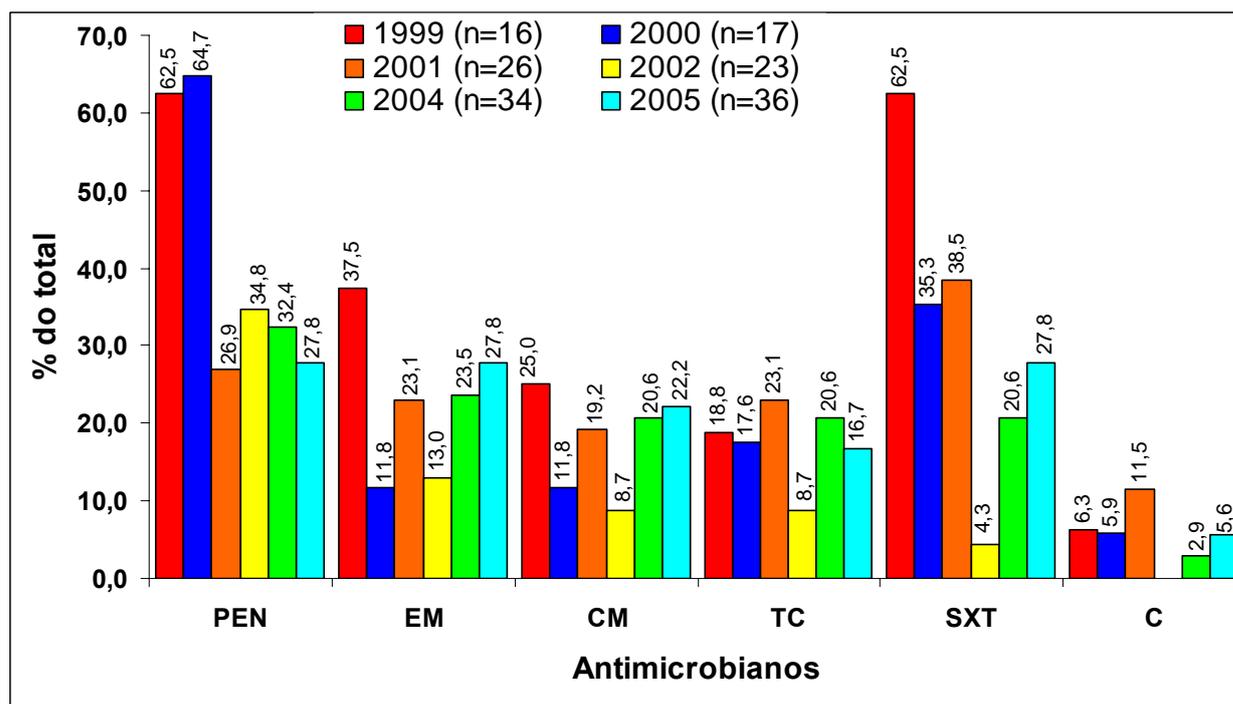


Figura 15

**Resistência aos antimicrobianos nas estirpes de *S. pneumoniae*, isoladas em crianças (< 6 anos) com infecções invasivas, em Portugal, em cada ano de estudo.** PEN- penicilina, EM- eritromicina, CM- clindamicina, TC-tetraciclina, SXT- cotrimoxazol, C- cloranfenicol.

Em crianças com idade inferior a 6 anos, a resistência aos antimicrobianos, à exceção da penicilina, atingiu os valores mais baixos em 2002, precisamente o ano seguinte à implementação da vacina 7-valente. Neste grupo etário, a resistência à penicilina decresceu entre 1999 e 2002, variando entre 62,5% (1999) e 26,9% (2001), e continuou a decrescer de 32,4% (2004) para 27,8% (2005) (Figura 15).

As resistências à eritromicina, clindamicina e tetraciclina mostraram uma tendência para decrescer de 1999 a 2002. O maior valor de resistência à eritromicina e à clindamicina foi registado em 1999 (37,5% e 25,0%, respectivamente) e o menor valor em 2002 (13,0% e 8,7%).

Contudo, a resistência a ambos os antimicrobianos estabilizou entre 2004 e 2005 à volta dos 20%. A resistência à tetraciclina variou de 23,1% (2001) e 8,3% (2002) e, no período de 2004 a 2005, decresceu ligeiramente de 20,6% para 16,7%. Relativamente ao cotrimoxazol, frequentemente associado à resistência à penicilina, o número de estirpes resistentes também diminuiu acentuadamente de 62,5% (1999) para 4,3% (2002), mas aumentou de 20,6%, em 2004, para 27,8%, em 2005. Curiosamente a resistência ao cloranfenicol aumentou de cerca de 6%, valor registado em 1999 e em 2000, para 11,5%, observado em 2001, foi nula em 2002 e quase que duplicou de 2,9% (2004) para 5,6% (2005) (Figura 15).

Na totalidade das estirpes, no período de 1999 a 2002, a resistência aos antimicrobianos atingiu os valores mais baixos em 2000. Assistiu-se, no mesmo período, a uma tendência para a resistência à penicilina decrescer ao longo dos anos. Cerca de 23% das estirpes mantiveram-se resistentes à penicilina, nos quatro anos de estudo de 1999 a 2002, e depois decresceram de 19,7% (2004) para 16,0% em 2005.

A resistência aos outros antimicrobianos, nomeadamente a eritromicina, clindamicina e tetraciclina, flutuou de 1999 a 2002 (valores inferiores a 13%) e parece ter estabilizado entre 2004 e 2005, atingindo, neste período, os valores mais elevados (valores superiores a 11%). O cotrimoxazol apresentou resistências cada vez menores, com valores de 25,0% em 1999, de 19,5% em 2002, e de 14,6% em 2004, contudo 18,7% das estirpes eram resistentes a este antimicrobiano em 2005. O cloranfenicol apresentou a resistência mais elevada em 2001 (4,8%) e menor em 2002 (1,7%), tendo depois decrescido de 3,9% em 2004 para 2,8% em 2005.

Tendo em conta os dados de 2003 (Aguiar, comunicação pessoal) foi possível verificar que o único antimicrobiano cuja resistência decresceu foi a penicilina e os antimicrobianos cujas resistências aumentaram foram a eritromicina, clindamicina e tetraciclina. A tendência para a resistência à penicilina decrescer decorreu desde 2002, na totalidade das estirpes, embora a resistência a este antimicrobiano tenha sido menor em 2003 do que em 2004. A resistência à penicilina atingiu em 2003 o valor mais baixo, em crianças com menos de 6 anos, o que não invalidou a sua tendência para diminuir de frequência, neste grupo etário. A tendência para a resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina aumentarem de frequência iniciou-se em 2002, apesar de, na totalidade das estirpes, a resistência a estes antimicrobianos ter sido maior em 2003 do que em 2004.

A resistência ao cotrimoxazol aumentou e diminuiu consecutivamente em cada ano de estudo, não se podendo prever qual a sua real tendência de crescimento, tanto na totalidade das estirpes como no grupo < 6 anos. A resistência ao cloranfenicol diminuiu desde 2003 na totalidade das estirpes. Contudo, nas crianças com idade inferior a 6 anos, a resistência ao

cloranfenicol apresentou um carácter oscilante em cada ano de estudo e atingiu inesperadamente o seu valor mais elevado em 2003.

A frequência dos fenótipos associados com a resistência aos macrólidos, observados de 2004 a 2005, já foi descrita (ver “Resistência aos antimicrobianos por grupos etários”). Comparando os dados obtidos entre 1999 e 2002 com os obtidos no presente estudo verificou-se que o número de estirpes com o fenótipo MLS<sub>B</sub> (76,7%, 1999 a 2002) e M (23,3%, 1999 a 2002) não se alterou significativamente mas invertiu-se a relação entre estes fenótipos e a susceptibilidade à penicilina. Entre 1999 e 2002, a maior parte das estirpes com o fenótipo MLS<sub>B</sub> e M eram susceptíveis à penicilina e, entre 2004 e 2005, eram resistentes à penicilina. As estirpes com os fenótipos de resistência aos macrólidos e resistentes à penicilina expressavam maioritariamente os serótipos 14, 6B e 19A enquanto que, de 2004 a 2005, estas mesmas estirpes expressavam os serótipos 19A, 14 e 15A, por ordem decrescente de frequência.

Outra alteração foi a presença de estirpes resistentes à tetraciclina com o fenótipo M, não observado no período de 1999 a 2002.

### **Padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos**

Na análise do padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos, quadro 11, considera-se a população de 617 estirpes de *S. pneumoniae* isoladas, entre 2004 e 2005, de indivíduos com doença invasiva, em Portugal. Definiram-se três grupos etários: menor que 6 meses, maior ou igual a 6 meses e menor de 6 anos e maior ou igual a 6 anos.

**Quadro 11**

**Padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos das 617 estirpes de *S. pneumoniae* isoladas, entre 2004 e 2005, de indivíduos com infecções invasivas, em Portugal, em cada grupo etário e no total.**

Padrão de susceptibilidade	Grupos etários (nº de estirpes)						Total	
	< 6 meses		≥ 6 meses < 6 anos		≥ 6 anos		n	%
	n	%	n	%	n	%		
Susceptível a todos os antimicrobianos	4	44,4	36	59,0	396	72,4	436	70,7
Resistente a pelo menos um antimicrobiano	5	55,6	25	41,0	151	27,6	181	29,3
<b>Total</b>	9	1,5	61	9,9	547	88,7	617	100,0
Susceptível à penicilina mas resistente a outros antimicrobianos	2	22,2	7	11,5	64	11,7	73	11,8
Resistente à penicilina	3	33,3	18	29,5	87	15,9	108	17,5
Elevada (CIM ≥ 2 mg/L)	1	11,1	3	4,9	8	1,5	12	1,9
Intermédia (0.12 mg/L > CIM < 1 mg/L)	2	22,2	15	24,6	79	14,4	96	15,6

Os valores do quadro 11 indicam que a maioria (70,7%) das estirpes isoladas apresentaram susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados.

Das 9 estirpes isoladas de crianças < 6 meses, 44,4% foram susceptíveis a todos os antibióticos ensaiados, sendo este o valor mais baixo de entre todos os grupos etários considerados. Das 61 estirpes isoladas de indivíduos com idade superior ou igual a 6 meses e menor que 6 anos e das 547 com idade superior ou igual a 6 anos, as estirpes susceptíveis a todos os antibióticos representaram sempre mais de metade do total, atingindo 59,0% e 72,4%, em cada grupo, respectivamente.

A resistência aos antibióticos, excepto a penicilina, foi no total de 11,8% e foi igual entre o grupo de indivíduos com idade superior ou igual a 6 anos e o grupo de idade superior ou igual a

6 meses e inferior a 6 anos (11,5%). Foi maior no grupo de indivíduos com idade inferior a 6 meses (22,2%) (quadro 11).

Das 9 estirpes isoladas de crianças com idade inferior a 6 meses, a resistência apenas a outros antibióticos que não a penicilina foi a seguinte: 11,1% (1/9) eram resistentes à eritromicina, clindamicina, tetraciclina e ao cotrimoxazol.

De entre as 61 estirpes isoladas em crianças com idade superior ou igual a 6 meses e inferior a 6 anos, 7 exibiram resistência a antibióticos que não à penicilina, 6,6% (4/61) ao cotrimoxazol e à eritromicina, 4,9% (3/61) à tetraciclina e à clindamicina e 1,6% (1/61) ao cloranfenicol.

Das 547 estirpes isoladas de indivíduos com idade superior ou igual a 6 anos a resistência a outros antibióticos foi a seguinte: eritromicina 5,9% (32/547), clindamicina 4,8% (26/547), tetraciclina 4,8% (26/547), cloranfenicol 1,3% (7/547) e cotrimoxazol 6,4% (35/547).

Quanto à resistência à penicilina, considerando todos os grupos etários, 17,5% (n=108) das estirpes exibiram resistência, das quais 15,6% resistência intermédia e 1,9% resistência elevada. A resistência à penicilina observada em estirpes isoladas de crianças com idade superior ou igual a 6 meses e inferior a 6 anos, foi semelhante (29,5%) da apresentada pelas estirpes isoladas dos grupos de doentes com idade inferior a 6 meses (33,3%) e superior à apresentada pelo grupo etário  $\geq 6$  anos (15,9%).

Os valores mais elevados da resistência intermédia e elevada à penicilina foram observados no grupo de indivíduos com idade pré-escolar (24,6% e 4,9%) e no grupo de crianças com idade inferior a 6 meses, no qual duas estirpes (22,2%) apresentaram resistência intermédia à penicilina e somente 1 (11,1%) apresentou resistência elevada (Quadro 11). No grupo de indivíduos de idade superior ou igual a 6 anos o número de estirpes com resistência intermédia (14,4%) à penicilina foi cerca de 10 vezes superior à resistência elevada (1,5%).

Comparando os dois períodos de estudo, a resistência à penicilina aumentou de 16,6% (1999 a 2002) para 33,3% (2004 a 2005) em crianças  $< 6$  meses, que se deveu ao aparecimento de somente uma estirpe com resistência elevada neste grupo etário. É importante ressaltar que em ambos os períodos o número de estirpes incluído no grupo etário  $< 6$  meses não foi significativo, n=12 (1999 a 2002) e n=9 (2004 a 2005). Em crianças com idade  $\geq 6$  meses e  $< 6$  anos, a resistência à penicilina foi de 48,6%, entre 1999 e 2002, tendo diminuído para 29,5%, entre 2004 e 2005, devido ao decréscimo da resistência intermédia de 42,9% (1999 a 2002) para 24,6% (2004 a 2005). No grupo  $\geq 6$  anos e na totalidade das estirpes a resistência à penicilina diminuiu 2,6% e 5,5%, respectivamente, entre os dois períodos de estudo. Esta ligeira diminuição deveu-se, sobretudo, ao decréscimo da resistência elevada à penicilina de 4,7% (1999 a 2002) para valores entre 1,5% ( $\geq 6$  anos) e 1,9% (total) (Quadro 11).

### Antibiótipos e serótipos associados à não susceptibilidade à penicilina

Nos quadros 12, 13 e 14 apresentam-se os serótipos e os respectivos antibiótipos (conjunto de resistências aos antibióticos ensaiados), por grupo etário, de estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas com resistência (intermédia ou elevada) à penicilina.

#### Quadro 12

**Serótipos e antibiótipos de estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, com resistência (intermédia ou elevada) à penicilina, isoladas entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com idade < 6 meses.**

< 6 meses		
Serótipos	Antibiótipo	Total
<b>Resistência elevada à Penicilina</b>		
19A	PEN <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
Subtotal		1
<b>Resistência intermédia à Penicilina</b>		
19A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
14	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup>	1
Subtotal		2
Total		3

PEN- penicilina, SXT- cotrimoxazol, C- cloranfenicol, TC- tetraciclina, EM- eritromicina, CM- clindamicina.

<sup>R</sup>- resistência elevada, <sup>I</sup>- resistência intermédia.

**Quadro 13**

**Serótipos e antibiótipos de estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, com resistência (intermédia ou elevada) à penicilina, isoladas entre 2004 e 2005 em Portugal, em crianças com idade  $\geq 6$  meses e  $< 6$  anos.**

<b><math>\geq 6</math> meses a <math>&lt; 6</math> anos</b>		
<b>Serótipos</b>	<b>Antibiótipo</b>	<b>Total</b>
<b>Resistência elevada à Penicilina</b>		
19A	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
14	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup>	1
14	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup>	1
Subtotal		3
<b>Resistência intermédia à Penicilina</b>		
19A	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	3
19A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
19A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup>	1
19A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
19A	PEN <sup>I</sup>	1
14	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup>	2
14	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
6A	PEN <sup>I</sup> , EM <sup>R</sup>	1
19F	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup>	1
23F	PEN <sup>I</sup>	1
1	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
6B	PEN <sup>I</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
<b>Resistência intermédia à Penicilina</b>		

<b>≥ 6 meses a &lt; 6 anos</b>		
<b>Serótipos</b>	<b>Antibiótipo</b>	<b>Total</b>
Subtotal		15
Total		18

PEN- penicilina, SXT- cotrimoxazol, C- cloranfenicol, TC- tetraciclina, EM- eritromicina, CM- clindamicina.

<sup>R</sup>- resistência elevada, <sup>I</sup>- resistência intermédia.

#### Quadro 14

Serótipos e antibiótipos de estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, com resistência (intermédia ou elevada) à penicilina, isoladas entre 2004 e 2005 em Portugal, em indivíduos com idade ≥ 6 anos.

<b>≥ 6 anos</b>		
<b>Serótipos</b>	<b>Antibiótipo</b>	<b>Total</b>
<b>Resistência elevada à Penicilina</b>		
19A	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup>	2
14	PEN <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
14	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup>	1
23F	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
9V	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup> , LE <sup>i</sup> , TC <sup>I</sup>	1
9V	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup>	1
9A	PEN <sup>R</sup> , SXT <sup>R</sup>	1
Subtotal		8

<b>≥ 6 anos</b>		
<b>Serótipos</b>	<b>Antibiótipo</b>	<b>Total</b>
<b>Resistência intermédia à Penicilina</b>		
14	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup>	14
14	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup>	1
14	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup>	1
14	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	2
14	PEN <sup>I</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
14	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup>	2
14	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
15A	PEN <sup>I</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	5
15A	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
15A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
19A	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R(8)I(1)</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R(7)I(2)</sup>	9
19A	PEN <sup>I</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
19A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup>	1
19A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R(4)I(1)</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	5
19A	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>I</sup> , EM <sup>R</sup>	1
19F	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
23F	PEN <sup>I</sup> , EM <sup>R</sup>	1
23F	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1

<b>≥ 6 anos</b>		
<b>Serótipos</b>	<b>Antibiótipo</b>	<b>Total</b>
<b>Resistência intermédia à Penicilina</b>		
23F	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup>	2
23F	PEN <sup>I</sup>	8
6A	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	2
6A	PEN <sup>I</sup>	1
6A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup>	1
6A	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup>	1
6B	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
6B	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	2
8	PEN <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup>	1
8	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
9V	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
9V	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup>	6
9V	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>I</sup>	1
NT <sup>a</sup>	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>R</sup> , C <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup>	1
NT <sup>a</sup>	PEN <sup>I</sup> , SXT <sup>I</sup> , TC <sup>R</sup> , EM <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	1
<b>Subtotal</b>		<b>79</b>
<b>Total</b>		<b>87</b>

PEN- penicilina, SXT- cotrimoxazol, C- cloranfenicol, TC- tetraciclina, EM- eritromicina, CM- clindamicina.

<sup>R</sup>- resistência elevada, <sup>I</sup>- resistência intermédia.

<sup>a</sup> Estirpes não tipáveis.

As três estirpes resistentes à penicilina, isoladas de indivíduos com idade inferior a 6 meses, pertenciam a dois serótipos, 19A (resistência elevada e intermédia) e 14 (resistência intermédia) e apresentaram diferentes antibiótipos. A estirpe do serótipo 14 era resistente ao cotrimoxazol. As estirpes do serótipo 19A eram resistentes à eritromicina e clindamicina e uma delas era também resistente ao cotrimoxazol e tetraciclina (Quadro 12).

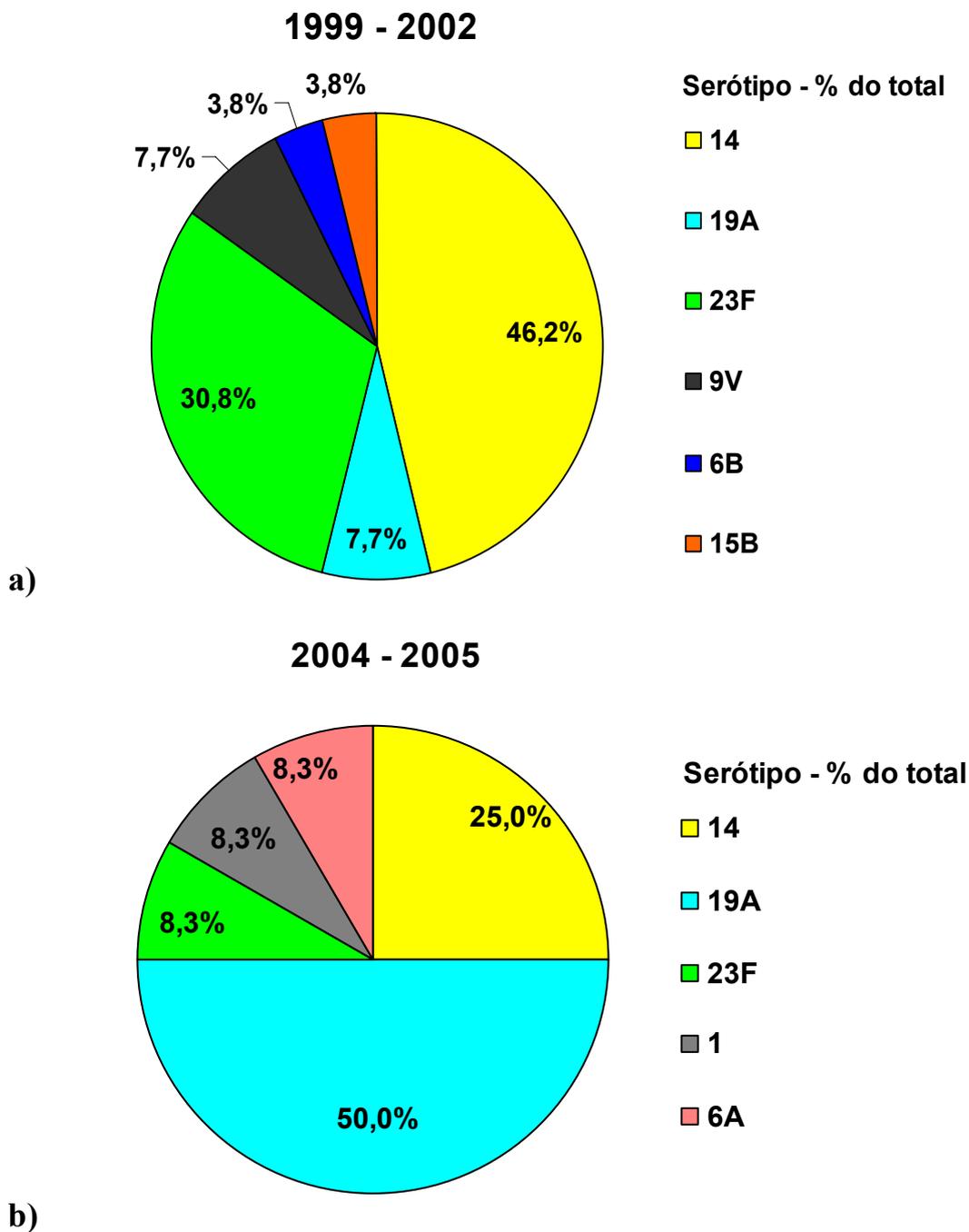
Os pneumococos com resistência elevada à penicilina, isolados do grupo de crianças de idade pré-escolar, pertenciam aos serótipos 19A e 14. Uma estirpe do serótipo 19A apresentava resistência também ao cotrimoxazol, tetraciclina, eritromicina e clindamicina, enquanto que a estirpe do serótipo 14 era resistente ao cotrimoxazol e eritromicina (Quadro 13). No mesmo grupo etário cerca de 70% das estirpes com resistência intermédia à penicilina expressavam os serótipos 19A e 14 e as restantes pertenciam a cinco serótipos diferentes (23F, 6B, 6A, 19F, 1) (Quadro 13). Verificou-se que 60,0% (8/15) eram multiresistentes [resistentes a três ou mais antimicrobianos de classes farmacológicas distintas (Finch, 2002)]. Neste trabalho considerou-se a eritromicina e clindamicina na mesma classe por terem o mesmo mecanismo de acção na bactéria. Observou-se que 13,3% (2/15) eram resistentes apenas à penicilina, 20,0% (3/15) resistentes à penicilina e ao cotrimoxazol, 6,7% (1/15) era resistente à penicilina e eritromicina e 6,7% (1/15) resistente à penicilina, eritromicina e clindamicina. Os padrões de multiresistência foram a resistência à tetraciclina, eritromicina e clindamicina, 26,7% (4/15), a resistência a estes antimicrobianos e ao cotrimoxazol, 13,3% (2/15), a resistência ao cotrimoxazol e tetraciclina, 6,7% (1/15), e finalmente a resistência ao cotrimoxazol, eritromicina e clindamicina, 6,7% (1/15) (Quadro 13).

Nas estirpes isoladas de indivíduos com idade superior ou igual a 6 anos foi onde se encontrou uma maior diversidade de serótipos, 10 serótipos diferentes e estirpes não tipáveis, e de antibiótipos, 11 perfis distintos (Quadro 14). As 8 estirpes com resistência elevada à penicilina, isoladas neste grupo etário, pertenciam aos serótipos 19A, 14, 23F, 9V e 9A e 5 apresentavam multiresistência. Cerca de 75% das estirpes com resistência intermédia, nesta faixa etária, expressavam os serótipos 14, 19A, 23F e 9V e as restantes pertenciam a 9 serótipos distintos (15A, 19F, 6A, 6B, 8) ou eram estirpes não tipáveis. Verificou-se que 49,4% (39/79) das estirpes eram multiresistentes e 11,4% (9/79) eram resistentes apenas à penicilina. O padrão de resistência mais comum foi a resistência ao cotrimoxazol, 29,1% (23/79), à tetraciclina, eritromicina e clindamicina, 17,7% (14/79), e ao cotrimoxazol, tetraciclina, eritromicina e clindamicina, 16,5% (13/79) (Quadro 14).

De 1999 a 2002 os serótipos que representaram mais de metade das estirpes com resistência à penicilina foram o 14 (48,6%) e o 23F (16,8%) e, de 2004 a 2005, foram o 14 (27,8%) e o 19A (26,9%). Estes resultados mostram claramente que o decréscimo de estirpes resistentes que expressavam o serótipo 14 foi acompanhado de um aumento da resistência no serótipo 19A. No entanto, é de realçar que na totalidade das estirpes não susceptíveis à penicilina, os serótipos 6B, 9V, 14, 19A e 23F continuaram a ser importantes, enquanto que os serótipos 1, 6A, 8, e 15A foram associados à resistência à penicilina apenas entre 2004 e 2005. Alguns serótipos ocasionais como o 15B ou o 16F estiveram presentes apenas de 1999 a 2002. Um aumento da dispersão dos serótipos deu-se principalmente nas estirpes com resistência elevada à penicilina. Entre 1999 e 2002 estas estirpes expressavam apenas os serótipos 14, 9V e 19A, enquanto que, entre 2004 e 2005, passaram a expressar os serótipos 19A (33,3%), 14 (33,3%), 9V (16,7%), 23F (8,3%), e 9A (8,3%) (Quadro 12 a 14).

Considerando apenas os sete antimicrobianos analisados no presente estudo, verificou-se que, de 1999 a 2002, existiam 24,3% (26/107) estirpes multiresistentes não susceptíveis à penicilina e, de 2004 a 2005, esse valor aumentou significativamente para 50,9% (55/108). Este incremento deu-se sobretudo no grupo de indivíduos com idade  $\geq 6$  meses e  $< 6$  anos e no grupo de indivíduos com idade superior ou igual a 6 anos, em que pelo menos metade das estirpes com susceptibilidade diminuída à penicilina passou a ser multiresistente.

De modo a realçar as diferenças observadas na frequência dos serótipos que foram expressos pelas estirpes não susceptíveis à penicilina, isoladas de crianças com idade inferior a 2 anos, em cada período de estudo, está representada na figura 16 a percentagem de cada serótipo na população alvo da vacina conjugada.



**Figura 16**

**Serótipos expressos pelas estirpes de *S. pneumoniae* não susceptíveis à penicilina, isoladas de crianças (< 2 anos) com infecções invasivas, em Portugal. a) Estirpes isoladas entre 1999 e 2002. b) Estirpes isoladas entre 2004 e 2005.**

É de notar que a percentagem das estirpes não susceptíveis à penicilina, isoladas de crianças com menos de 2 anos, foi superior de 1999 a 2002, 45,6% (26/57), do que de 2004 a 2005, 34,3% (12/35). Para além disto houve uma alteração dos serótipos entre os dois períodos de estudo. A percentagem de estirpes isoladas expressando o serótipo 14 diminuiu para cerca de metade, de 46,2% (Figura 16a) para 25,0% (Figura 16b), enquanto que a percentagem de estirpes isoladas expressando o serótipo 23F diminuiu para 8,3%, um valor cerca de 4 vezes inferior ao observado de 1999 a 2002 (30,8%). Já o serótipo 19A aumentou de frequência de 7,7% (1999 a 2002) para 50,5% (2004 a 2005) (Figura 16). Estes resultados estão em absoluta concordância com a variação da frequência dos serótipos encontrados na totalidade das estirpes de *S. pneumoniae*, isoladas de indivíduos com infecções invasivas, em Portugal, em cada ano de estudo (Figura 12).

## Caracterização molecular

### Metodologia de preparação e restrição do ADN para electroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A metodologia para a preparação e restrição dos discos de ADN de *S. pneumoniae* foi adaptada de Soares *et al.* (1993). Em resumo, as células recolhidas do meio de glicerol foram semeadas em meio BHI e incubadas num banho a 37°C durante 6 horas, de modo a estarem no início da fase estacionária do seu crescimento. Seguidamente, as células foram centrifugadas em tubos de 15 ml a 1600g durante 15 min a 4°C e posteriormente lavadas com 1 ml de PIV (ver “Meios de cultura”) e centrifugadas durante 5 min a 6100g. As células foram dispersas em 200 µl de PIV após o que foi medida a densidade óptica a 620nm. A densidade celular foi ajustada a uma densidade óptica de 5 através da adição de um volume de PIV apropriado a cada uma das estirpes. Finalmente, as bactérias foram combinadas com agarose líquida ficando imobilizadas em pequenos discos. Para isso adicionou-se 150 µl da suspensão de células à mesma quantidade de agarose [1,5% (p/v) agarose LMP em PIV], ambas as soluções previamente equilibradas a 41°C. Pipetaram-se 20 µl da mistura sobre uma lâmina de microscópio e cobriram-se as gotas com lâminas. Incubou-se durante 5 min a -20°C, após o que os discos foram transferidos para tubos de 15 ml com tampão EC (ver “Meios de cultura”) contendo RNase numa concentração final de 0,1 mg/ml. A incubação ocorreu durante 3 h a 37°C. Em seguida, o tampão de lise foi

substituído por tampão ES (ver “Meios de cultura”) ao qual foi adicionada Proteinase K (Roche, Basel, Suíça) numa concentração final de 1 mg/ml. A digestão das proteínas ocorreu durante 17 h a 50°C. Finalmente os discos foram lavados três vezes em 13 ml de TE (1×) e incubados durante 1 h à temperatura ambiente. Os discos foram guardados nesta solução a 4°C até serem utilizados.

A digestão dos discos compõe-se por três fases: a) equilíbrio, cada disco a ser digerido foi transferido para um microtubo com 500 µl do tampão indicado para a enzima (1× Buffer Tango, Fermentas, Vilnius, Lituânia) e incubado a 25°C durante pelo menos 1 h; b) na restrição removeu-se o tampão e adicionou-se 45 µl da mistura de restrição que contém 15 unidades da enzima SmaI no mesmo tampão e incubou-se durante a noite a 25°C; c) paragem da reacção de restrição, após a digestão adicionou-se 5 µl de solução corante (6×) (ver “Meios de cultura”) e equilibrou-se durante cerca de 10 min. Quando os discos não foram utilizados imediatamente adicionou-se 10 µl de tampão ES e os discos foram mantidos a 4°C até serem usados.

Os fragmentos de ADN cromossómico, gerados pela enzima SmaI, foram separados e analisados como previamente descrito (Soares *et al.*, 1993). Os discos de ADN foram introduzidos nos poços do gel de agarose [1% (p/v) em 0,5×TBE (BioRad, Munique, Alemanha)] e cobertos com a mesma solução de agarose para que os discos não saíssem dos poços durante a separação. O gel foi colocado no aparelho de electroforese CHEF-DR® II (BioRad, EUA). Um disco de “lambda ladder PFG marker” (New England BioLabs, Beverly, EUA) foi usado como marcador de tamanho molecular. A separação decorreu em tampão 0,5×TBE a 13°C, durante 23 horas. Foi aplicada uma voltagem de 6V/cm, e o tempo inicial e final dos pulsos foi de 5 seg e 35 seg, respectivamente.

Após a separação o gel foi corado durante a noite numa solução de 0,5 µg/ml de brometo de etídio, que se intercala nas bases do ADN, descorado em água durante 1 hora e fotografado. Foi assim possível visualizar bandas que correspondem aos fragmentos de ADN cujo tamanho (Kb) é determinado com referência às bandas do marcador de tamanho molecular.

A estirpe de *S. pneumoniae* R36 foi usada como estirpe de referência. Esta estirpe é derivada da estirpe causadora de infecção do tipo capsular 2 usada por Avery e colaboradores para demonstrar a função genética do ADN. Foi usada como estirpe padrão porque, devido à ausência de cápsula, é avirulenta e a sequência do seu genoma está determinada (Hoskins *et al.*, 2001). A incorporação de um padrão de controlo em cada experiência permitiu que a origem e amplitude do erro na medição do tamanho dos fragmentos de ADN fosse determinada (Salamon *et al.*, 1998).

As 26 estirpes que representavam clones internacionalmente reconhecidos (McGee *et al.*, 2001) e que expressavam serótipos existentes na nossa colecção foram gentilmente cedidas pela Doutora Herminia de Lencastre. Estas estirpes foram submetidas à preparação de discos de ADN, o seu perfil genómico foi determinado por PFGE e foi comparado com todas as estirpes do mesmo serótipo e com outros serótipos previamente associados a estes clones.

As estirpes do serótipo 23F foram comparadas com a estirpe de referência PMEN1, que corresponde ao clone internacional identificado em Espanha do serótipo 23F (Spain<sup>23F</sup>-1), PMEN4 (Tennessee<sup>23F</sup>-4), PMEN15 (Taiwan<sup>23F</sup>-15), PMEN16 (Poland<sup>23F</sup>-16) e PMEN26 (Colombia<sup>23F</sup>-26). As estirpes do serótipo 14 foram comparadas com a estirpe de referência PMEN3, que corresponde ao clone internacional (Spain<sup>9V</sup>-3), PMEN5 (Spain<sup>14</sup>-5), PMEN9 (England<sup>14</sup>-9), PMEN10 (CSR<sup>14</sup>-10) e PMEN18 (Tennessee<sup>14</sup>-18). As estirpes do serótipo 6B foram comparadas com PMEN2 (Spain<sup>6B</sup>-2), PMEN8 (South Africa<sup>6B</sup>-8), PMEN12 (Finland<sup>6B</sup>-12), PMEN17 (Maryland<sup>6B</sup>-17), PMEN20 (Poland<sup>6B</sup>-20) e PMEN22 (Greece<sup>6B</sup>-22). As estirpes do serótipo 6A foram, por sua vez, comparadas com PMEN23 (North Carolina<sup>6A</sup>-23). Às estirpes do serótipo 9V coube a comparação com PMEN3 (Spain<sup>9V</sup>-3). As estirpes do serótipo 15A foram comparadas com PMEN25 (Sweden<sup>15A</sup>-25) e as estirpes do serótipo 19A foram comparadas com PMEN6 (Hungary<sup>19A</sup>-6), PMEN7 (South Africa<sup>19A</sup>-7), PMEN11 (CSR<sup>19A</sup>-11) e PMEN13 (South Africa<sup>19A</sup>-13). As estirpes do serótipo 19F foram comparadas com PMEN14 (Taiwan<sup>19F</sup>-14) e PMEN21 (Portugal<sup>19F</sup>-21) e as do serótipo 35B com PMEN24 (Utah<sup>35B</sup>-24). Finalmente PMEN19 (Colombia<sup>5</sup>-19) foi comparado com as estirpes do serótipo 5 (McGee *et al.*, 2001).

Os dados sobre o perfil de resistência aos antibióticos (penicilina, cefotaxima/ceftriaxona, cotrimoxazol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloranfenicol) de cada clone internacional foram obtidos na rede PMEN.

Após a preparação e restrição do ADN para PFGE as fotografias digitalizadas dos géis de PFGE foram analisadas recorrendo ao software Bionumerics (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). O software Bionumerics foi usado para a construção de dendrogramas dos perfis de PFGE com base no “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means” (UPGMA). Os perfis genómicos das estirpes foram comparados a partir do número e tamanho de bandas de modo a determinar a sua proximidade genética. O coeficiente de similaridade teve uma optimização e tolerância de 1,0 e 1,5%, respectivamente, tal como descrito por Gertz *et al.* (2003). Foi assim possível a formação de grupos de estirpes ou clones, com uma proximidade genética superior ou igual a 80% no dendrograma, baseados nos perfis de PFGE.

### “Multilocus Sequence Typing” (MLST)

Os representantes de cada grupo de PFGE, com um número igual ou superior a 4 estirpes, foram posteriormente caracterizados por “Multilocus Sequence Typing” (MLST), de modo a representarem a diversidade observada. Para além destas estirpes foram também caracterizadas as estirpes isoladas do líquido cefalorraquidiano e as que apresentavam resistência à penicilina, sempre que o seu perfil genómico era distinto dos perfis de outras estirpes que foram caracterizadas por MLST.

### Metodologia de preparação das amostras para MLST

A preparação das amostras de *S. pneumoniae* para a atribuição do tipo de sequência foi adaptada de Enright e Spratt (1998) e é dividida em 4 etapas. A primeira etapa é a extracção do ADN cromossómico. As estirpes cresceram em meio BHI e foram incubadas a 37°C até à fase estacionária. Em seguida, 4 µl da cultura foi adicionado a 196 µl de água bidestilada e fervidas durante 2 minutos e imediatamente arrefecidas em gelo. As amostras foram mantidas a -20°C até serem usadas.

Após a extracção do ADN procedeu-se à amplificação dos fragmentos internos de sete genes “housekeeping” pela reacção de polimerização em cadeia (PCR) (Enright e Spratt, 1998). Os genes usados foram o *aroE* (chiquimato desidrogenase), *gdh* (glucose-6-fosfato desidrogenase), *gki* (glucose cinase), *recP* (transcetolase), *spi* (peptidase sinal I), *xpt* (xantina fosforibosiltransferase) e *ddl* (D-alanina-D-alanina ligase). A sequência dos oligonucleótidos iniciadores destes genes estão listados em <http://www.mlst.net>. Para cada gene a ser amplificado preparou-se a reacção de PCR da seguinte maneira: para um volume total de 50 µl adicionaram-se 1,25U de Taq polimerase (New England BioLabs, Beverly, EUA), 5 µl de tampão de PCR 10× (New England BioLabs, Beverly, EUA), 10mM de deoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Fermentas, Vilnius, Lituânia), 20 pmol de cada oligonucleótido iniciador reverso e directo (Invitrogen, Paisley, Escócia), 20 µl do ADN cromossómico extraído pelo método indicado anteriormente e completou-se com água MiliQ até perfazer o volume total. Na amplificação do ADN por PCR usou-se um termociclador (Biometra) com o seguinte programa: a desnaturação ocorreu durante 4 minutos a 94°C, após a qual deu-se o primeiro ciclo de amplificação que se repetiu mais 29 vezes. O ciclo iniciou-se com a desnaturação a 94°C durante 30 segundos, de seguida deu-se a hibridação a 51°C durante 30 segundos e a extensão a 72°C durante 30 segundos. Finalmente a fase de terminação demorou 10 minutos a 72°C. Nos casos em que a reacção de PCR não resultou na amplificação do produto, diminuiu-se a temperatura de hibridação para 49°C.

A visualização dos produtos de amplificação foi feita aplicando 5 µl do produto com 1 µl de solução corante (6×) (ver “Meios de cultura”) a um gel de agarose que foi submetido a electroforese convencional. Para a visualização do gel procedeu-se da mesma maneira que na “metodologia de preparação e restrição do ADN para PFGE”.

A terceira etapa, purificação dos produtos de PCR, foi feita recorrendo a um Kit de purificação “high pure PCR product purification kit” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Na última etapa, os produtos de amplificação purificados foram sequenciados por uma empresa (Macrogen, Coreia do Sul) e os dados enviados para posterior análise e determinação do tipo de sequência (ST).

### **Determinação do tipo de sequência**

As sequências de cada um dos 7 genes “house-keeping” foram analisadas usando um software que permitiu a sua comparação com as sequências padrão de cada alelo, disponíveis em ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)), de modo a determinar diferenças. As sequências completas foram depois comparadas com outras sequências incluídas na base de dados do MLST dos pneumococos ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)) e atribuído um número. Para cada estirpe a combinação de 7 alelos (7 números) definiu o seu perfil alélico ou seja o tipo de sequência. Sempre que foram identificados novos alelos ou novos STs as sequências foram submetidas via Internet à curadora da base de dados do MLST para atribuição de um novo número do alelo.

Posteriormente foram identificadas as linhagens dos tipos de sequência pelo algoritmo eBURST (Feil *et al.*, 2004), disponível na Internet, usando os parâmetros padrão e a base de dados completa de *S. pneumoniae*.

O algoritmo eBURST foi desenvolvido de modo a mostrar as relações entre estirpes, caracterizadas por MLST, numa dada espécie bacteriana. O eBURST usa um modelo simples da evolução bacteriana que produz um grupo de genótipos proximamente relacionados que descendem todos do mesmo genótipo fundador (fundador do grupo – “group founder”). No grupo de genótipos relacionados as estirpes podem ter no máximo um em sete (“single locus variant”, SLV) ou dois em sete (“double locus variant”, DLV) alelos diferentes, consoante a definição usada for mais restrita ou mais abrangente. Geralmente usa-se a definição mais restrita. Em síntese, o eBURST produz uma hipótese sobre o modo como cada complexo clonal apareceu e se diversificou (Feil *et al.*, 2004).

### Resultados da caracterização molecular

O perfil de PFGE foi obtido para um total de 457 estirpes causadoras de infecções invasivas isoladas de 1999 a 2002 e 617 isoladas de 2004 a 2005. Não foi possível obter, por razões técnicas, o perfil de PFGE de 8 estirpes isoladas de 1999 a 2002. Um total de 115 (24,7%) estirpes isoladas de 1999 a 2002 e 57 (9,2%), de 2004 a 2005, representantes de cada grupo de PFGE, foram posteriormente caracterizados por MLST.

Na distribuição das estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas pelos grupos com uma proximidade genética superior ou igual a 80% no dendrograma, formados com base nos perfis de PFGE, optou-se por incluir as estirpes isoladas em 2003 (n=196) (Aguiar, comunicação pessoal), para além das estirpes isoladas de 1999 a 2002 e de 2004 a 2005, de modo a reproduzir fielmente a repartição das estirpes pelos seus grupos de relação genética. Também foram tidos em conta os 16 novos STs identificados no ano de 2003.

### Novos alelos e perfis alélicos de MLST

Nas estirpes estudadas de 1999 a 2002 foram identificados 7 novos alelos entre os genes “housekeeping”, um no gene *gdh* (89), um no *gki* (98), *recp* (66), *spi* (97), *xpt* (144) e dois no gene *ddl* (44 e 45). Consequentemente foram também formadas novas combinações alélicas produzindo novos STs que foram numerados de 790, 1220 a 1226, 1230 a 1233 e 1365 a 1372.

Em 2003, nas 55 estirpes sequenciadas, foram identificados 4 novos alelos, um no gene *aroE* (72), *xpt* (152), *spi* (108) e *gki* (115) e foram identificados novos STs que foram numerados de 1569, 1646 a 1655, 1706 a 1709 e 1766 (Aguiar, comunicação pessoal). Uma destas estirpes exibindo novos alelos, do serótipo 15B, tinha sido isolada em 2000 mas apenas foi analisada por MLST mais tarde em conjunto com as estirpes de 2003.

Nas estirpes estudadas de 2004 a 2005 foram identificados 7 novos alelos, um no gene *aroE* (95), um no *gdh* (146), dois no *gki* (153 e 154), *xpt* (201) e dois no *ddl* (247 e 248) e novas combinações alélicas numeradas de 2400 a 2407 e de 2633 a 2635. Os novos alelos e novos STs foram submetidos à base de dados do MLST ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)).

Consistente com estudos recentes que suportam uma associação entre o alelo *ddl* e a não susceptibilidade à penicilina (Enright e Spratt, 1999) verificou-se que, das estirpes não susceptíveis à penicilina que foram sequenciadas por MLST, 47,0% continham o alelo *ddl* 1 e 31,7% o alelo *ddl* 14. Mas enquanto que 63,6% das estirpes que continham o alelo *ddl* 1 não eram susceptíveis à penicilina, 67% das estirpes que continham o alelo *ddl* 14 eram susceptíveis à penicilina. Entre os novos alelos *ddl*, encontrados de 1999 a 2005, apenas a estirpe que continha o alelo *ddl* 248 não era susceptível à penicilina (resistência elevada).

### **Distribuição das linhagens por serótipo**

A figura apresentada no anexo 2 (Figura 22) consiste nos dendrogramas que foram construídos por serótipo das estirpes de *S. pneumoniae* isoladas entre 1999 e 2005. Os perfis gerados por PFGE e informação epidemiológica relevante, como a susceptibilidade aos antimicrobianos e o perfil alélico obtido por MLST, são outros parâmetros apresentados nos dendrogramas. Nalguns casos de estirpes que expressavam o mesmo serogrupo ou serótipos diferentes foram incluídas no mesmo dendrograma para avaliar uma eventual relação genética.

O quadro 15 representa os tipos de sequência dos grupos de estirpes com uma semelhança superior ou igual a 80% no dendrograma. Os STs das estirpes de *S. pneumoniae* isoladas entre 1999 e 2005 estão distribuídos por serótipo, isto porque as estirpes que expressam o mesmo serótipo estão geneticamente relacionadas apresentando perfis de PFGE semelhantes. Os tipos de sequência a azul foram encontrados nas estirpes estudadas de 1999 a 2002, a laranja foram encontradas nas estirpes estudadas de 2003-2005. Apresenta-se também o número de estirpes não susceptíveis à penicilina e a outros antimicrobianos e o número estimado de estirpes de cada serótipo em cada grupo, apenas para as estirpes isoladas entre 1999 e 2002 (dados a azul) e entre 2004 e 2005 (dados a laranja). Segue-se a descrição detalhada dos tipos de sequência encontrados nos serótipos mais frequentemente encontrados em crianças com idade inferior a 6 anos e em todos os grupos etários (Quadro 15). As crianças deste grupo etário incluem, como já referido, aquelas que frequentam creches, vindo acrescida a probabilidade de adquirirem e transmitirem uma infecção pneumocócica, e as crianças com idade < 2 anos que são o principal alvo do programa de vacinação anti-pneumocócica.

**Quadro 15**

**Características das 465 estirpes de *S. pneumoniae* isoladas entre 1999 e 2002, e das 617 estirpes isoladas entre 2004 e 2005, em indivíduos com infecções invasivas, em Portugal.**

Serótipo	Nº de estirpes em cada grupo etário <sup>a</sup>		STs dos grupos gerados por PFGE <sup>b</sup>	% estimada do serótipo (nº de estirpes)	% (nº) de estirpes não susceptíveis a:	
	< 6 anos	≥ 6 anos			Penicilina	Outros Antim.
1			ST30 (16F)	1 (1)	100 (1)	100 (1)
	10 (3)	40 (3)	ST304 + ST350	34 (17)	0	6 (1)
	14 (2)	67 (2)	ST306 + ST228+	17 (14)	0	7 (1)
			ST227 <sup>c</sup>	64 (32)	0	0
3			[ST232 + ST180 <sup>c</sup> + ST1230 + ST2407 + ST260 + ST1646 + ST1220]	87 (39)	0	5 (2)
	3 (6)	42 (1)		93 (70)	0	7 (5)
	2 (7)	73 (1)	ST180 <sup>c</sup>	-	-	-
			ST458	7 (3)	0	0
4			ST247	1 (1)	0	0
			ST1221	41 (11)	0	0
	0	27 (4)	ST205 <sup>c</sup>	20 (5)	0	0
	1 (11)	24 (7)	[ST1652 + ST1222 + ST801]	41 (11)	0	0
5			ST1222	36 (9)	0	0
	1	11 (11)	ST1223	12 (3)	0	0
	0	1 (36)		7 (2)	0	0
			24 (6)	0	0	
			11 (3)	0	0	
			92 (11)	0	9 (1)	
			100 (1)	0	0	

Caracterização da variação de fase na morfologia e o estudo da epidemiologia molecular, susceptibilidade a antimicrobianos e profilaxia em estirpes de *Streptococcus pneumoniae* causadoras de infecção invasiva.

Serótipo	Nº de estirpes em cada grupo etário <sup>a</sup>		STs dos grupos gerados por PFGE <sup>b</sup>	% estimada do serótipo (nº de estirpes)	% (nº) de estirpes não susceptíveis a:	
	< 6 anos	≥ 6 anos			Penicilina	Outros Antim.
6A			ST395 <sup>c</sup>	5 (1)	100 (1)	100 (1)
			ST460 <sup>c</sup>	15 (2) 14 (3)	0 0	0 0
			ST1369	8 (1)	100 (1)	100 (1)
			[ST1647 + ST1648]	15 (2) 14 (3)	0 0	0 0
			ST395 <sup>c</sup>	23 (3) 18 (4)	0 0	0 0
			ST1714	8 (1) 9 (2)	0 0	1 0
			ST386 (6B)	9 (2)	100 (2)	100 (2)
			ST273 (6A) + ST1150 (6A)	7 (1) 14 (1)	0 0	100 (1) 0
			[ST1624 + ST1224 + ST273]	57 (8) 14 (1)	12 (1) 0	100 (8) 100 (1)
			ST273	14 (1)	0	100 (1)
6B	2 (10) 1 (11)	11 (11) 21 (9)	ST315 (6A, 23F)	29 (2)	100 (2)	100 (2)
			ST887	14 (2) 14 (1)	100 (2) 100 (1)	100 (2) 100 (1)
7C	0 0	1 (33) 2 (32)	ST1201 (19A)	100 (2)	0	0
			ST1653 (5)	-	-	-
7F			ST191 <sup>c</sup>	4 (2)	0	0
	3 (6) 6 (3)	15 (8) 42 (3)	ST191 <sup>c</sup>	89 (16) 90 (43)	0 0	6 (1) 56 (2)
			ST191 <sup>c</sup>	6 (1)	0	0

Serótipo	Nº de estirpes em cada grupo etário <sup>a</sup>		STs dos grupos gerados por PFGE <sup>b</sup>	% estimada do serótipo (nº de estirpes)	% (nº) de estirpes não susceptíveis a:	
	< 6 anos	≥ 6 anos			Penicilina	Outros Antim.
8	0	27 (4)	ST404	15 (4)	0	0
	1 (11)	30 (6)		3 (1)	0	0
			ST53 <sup>d</sup>	67 (18)	0	0
			74 (23)	0	4 (1)	
9A	0	0	ST1569 (3, 9V)	33 (1)	100 (1)	100 (1)
	1 (11)	2 (32)				
9L	0	0	ST1654 + ST66 (9N, 14, 19F, 23F)	100 (3)	0	0
	0	3 (26)				
9N	1 (13)	9 (15)	ST66 (14, 19F, 23F) + ST2634	100 (10)	0	30 (3)
	0	5 (22)				
9V	3 (6)	19 (6)	ST156 <sup>c</sup> (9A, 11A, 14, 15C, 19F) ST557 (6B) + ST644 (6B, 19F) + ST838 + ST1225 + ST2403 + ST2405	91 (20)	75 (15)	95 (19)
	0	19 (11)				
10A	2 (10)	7 (18)	ST97 + ST1226 + ST1231	78 (7)	0	29 (2)
	2 (7)	11 (15)				
10F	0	3 (24)	ST1649	100 (3)	0	33 (1)
	0	1 (36)				
11A			ST408+ ST62 <sup>c</sup>	86 (6)	17 (1)	17 (1)
	0	7 (18)	ST2402	5 (1)	0	0
	0	20 (10)				
		ST30 (16F)	14 (1)	0	0	

Caracterização da variação de fase na morfologia e o estudo da epidemiologia molecular, susceptibilidade a antimicrobianos e profilaxia em estirpes de *Streptococcus pneumoniae* causadoras de infecção invasiva.

Serótipo	Nº de estirpes em cada grupo etário <sup>a</sup>		STs dos grupos gerados por PFGE <sup>b</sup>	% estimada do serótipo (nº de estirpes)	% (nº) de estirpes não susceptíveis a:	
	< 6 anos	≥ 6 anos			Penicilina	Outros Antim.
12B	0	16 (7)	[ST1365+ ST218 (12F) + ST2406]	88 (14)	0	0
	1 (11)	12 (13)		85 (11)	0	0
			ST989 (12F)	13 (2)	0	0
				15 (2)	0	100 (2)
13	0	3 (24)	ST574	33 (1)	100 (1)	100 (1)
	0	5 (22)		60 (3)	0	0
14			ST15 (19F) + ST409	15 (9)	0	78 (7)
				28 (11)	18 (2)	64 (7)
			[ST156 <sup>d</sup> (9A, 9V, 11A, 15C, 19F) + ST1370]	3 (2)	100 (2)	100 (2)
	21 (1)	41 (2)	ST557 (6B, 9V) + ST156 <sup>d</sup> (9A, 9V, 11A, 15C, 19F) + ST790	77 (48)	100 (48)	100 (48)
	6 (3)	34 (5)		58 (23)	96 (22)	100 (23)
			ST156 <sup>d</sup> (9A, 9V, 11A, 15C, 19F)	3 (2)	100 (2)	100 (2)
15A				15 (6)	100 (6)	100 (6)
			ST1707	-	-	-
			ST2108 (19A)	88 (7)	100 (7)	100 (7)
15B/C	1 (13)	1 (33)	ST1706	100 (2)	50 (1)	0
	0	1 (36)		100 (1)	0	0
16F	0	4 (23)	ST414	50 (2)	0	0
	0	1 (36)				
17F	0	2 (28)	ST1709	50(1)	0	0
	0	3 (26)	[ST2401 + ST15 (14, 19F)]	50 (1)	0	0
				33 (1)	0	100 (1)

Caracterização da variação de fase na morfologia e o estudo da epidemiologia molecular, susceptibilidade a antimicrobianos e profilaxia em estirpes de *Streptococcus pneumoniae* causadoras de infecção invasiva.

Serótipo	Nº de estirpes em cada grupo etário <sup>a</sup>		STs dos grupos gerados por PFGE <sup>b</sup>	% estimada do serótipo (nº de estirpes)	% (nº) de estirpes não susceptíveis a:	
	< 6 anos	≥ 6 anos			Penicilina	Outros Antim.
18A	0	5 (21)	ST241 (23F)	40 (2)	0	0
	0	3 (26)	ST1232	100 (3)	0	0
				60 (3)	0	33 (1)
18C			[ST697 + ST133 + ST113 <sup>c</sup> (18B)]	33 (4)	0	25 (1)
			[ST1650 + ST1367 (33F)]	36 (4)	0	50 (2)
	2 (10)	10 (14)	ST1233	8 (1)	0	0
	2 (7)	9 (17)		36 (4)	0	9 (1)
				25 (3)	0	0
			[ST1651 + ST102]	9 (1)	0	0
19A			ST193 (14, 18C, 19F, 21)	12 (2)	0	100 (2)
			ST994 (19C) + ST1151	10 (6)	0	100 (6)
			ST416 (19F)	12 (2)	0	0
				10 (6)	11 (1)	33 (3)
			[ST1201 + ST81 (3, 9V, 14, 19F, 23F)]	12 (2)	0	50 (1)
	5 (5)	12 (10)	ST876 (14) + ST199 <sup>c</sup> (6, 15B, 15C)	10 (6)	50 (3)	67 (4)
	18 (1)	41 (4)		12 (2)	67 (4)	50 (3)
				2 (1)	100 (2)	50 (1)
			ST276 + ST2635 + ST230 <sup>d</sup> (14, 19F, 20, 24F)	12 (2)	100 (2)	100 (2)
				79 (23)	96 (22)	96 (22)
19F			[ST391 + ST416 (19A)]	22 (2)	100 (2)	0
			ST347	11 (2)	0	0
	1 (13)	8 (16)		22 (2)	50 (1)	100 (2)
	6 (3)	12 (13)	ST177 <sup>c</sup>	11 (2)	0	0
				44 (4)	25 (1)	25 (1)
			56 (10)	0	40 (4)	

Caracterização da variação de fase na morfologia e o estudo da epidemiologia molecular, susceptibilidade a antimicrobianos e profilaxia em estirpes de *Streptococcus pneumoniae* causadoras de infecção invasiva.

Serótipo	Nº de estirpes em cada grupo etário <sup>a</sup>		STs dos grupos gerados por PFGE <sup>b</sup>	% estimada do serótipo (nº de estirpes)	% (nº) de estirpes não susceptíveis a:	
	< 6 anos	≥ 6 anos			Penicilina	Outros Antim.
20	0	5 (21)	ST1026	60 (3)	0	0
	0	3 (26)		33 (1)	0	0
			ST235 (7C)	40 (2)	0	0
22F	0	11 (11)	[ST1012 (11A) + ST433 <sup>c</sup> ]	73 (8)	0	13 (1)
	2 (7)	24 (7)		85 (22)	0	18 (4)
			ST1372	18 (2)	0	0
23A	0	1 (33)	ST2400 + ST2404	75 (6)	0	0
	0	8 (18)	ST81 (3, 9V, 14, 19A, 19F, 23F)	13 (1)	0	0
23B	0	2 (28)	ST439	100 (2)	0	0
	0	2 (32)		100 (2)	0	0
23F			ST353	5 (1)	0	0
	14 (2)	8 (16)		5 (1)	0	0
	3 (6)	16 (12)	ST81 <sup>c</sup> (3, 9V, 14, 19A, 19F)	14 (3)	100 (3)	100 (3)
			[ST338 (23A) + ST732 + ST1371]	21 (4)	100 (4)	100 (4)
				77 (17)	88 (15)	0
24A/F	0	2 (28)	ST72	50 (1)	0	0
	1 (11)	3 (26)		100 (4)	0	0
			ST230 (14, 19A, 19F, 20)+ ST1708	50 (1)	100 (1)	100 (1)
31	1 (13)	2 (28)	[ST1766 + ST1684 (9N)]	67 (2)	0	0
	0	4 (25)		100 (4)	0	25 (1)
33A	0	1 (33)	ST717 (33F)	100 (5)	0	100 (5)
	0	5 (22)				
33F	3 (6)	3 (24)	[ST100 <sup>c</sup> (5, 6A) + ST1655 + ST717 + ST1367 + ST2633]	83 (5)	0	40 (2)
	1 (11)	6 (20)		100 (7)	0	86 (6)
35B/C/F	1 (13)	3 (24)	[ST1366 + ST1368]	100 (4)	33 (1)	33 (1)
	0	3 (26)		33 (1)	0	0

Serótipo	Nº de estirpes em cada grupo etário <sup>a</sup>		STs dos grupos gerados por PFGE <sup>b</sup>	% estimada do serótipo (nº de estirpes)	% (nº) de estirpes não susceptíveis a:	
	< 6 anos	≥ 6 anos			Penicilina	Outros Antim.
Não Tipável	0	13 (9)	ST53 (8)	38 (5)	0	0
	1 (11)	10 (16)		9 (1)	0	0
Outros <sup>c</sup>	0	5			13 (3)	17 (4)
	0	8				
Total	82	383				
	70	547				

<sup>a</sup> O número dentro de parêntesis indica a ordem de frequência do serótipo em cada grupo etário.

<sup>b</sup> Os STs incluídos nos grupos gerados por PFGE têm um coeficiente de similaridade > 80%. Os serótipos dentro de parêntesis são os serótipos encontrados nos STs que não foram identificados neste estudo e estão listados em <http://spneumoniae.mlst.net>. Os parêntesis rectos indicam que pelo menos um ST não pertence à mesma linhagem, definida pela análise por eBURST, baseada nos parâmetros padrão e na base de dados completa de *S. pneumoniae* (<http://spneumoniae.mlst.net>).

<sup>c</sup> ST também encontrado por Gertz *et al.* (2003).

<sup>d</sup> ST pela primeira vez encontrado por Beall *et al.* (2006).

<sup>e</sup> Outros serótipos com ≤ 2 estirpes: 11B, 25A, 25F, 36, 38 (1999 a 2002) e os serótipos 10B, 12F, 15C, 21, 25A, 34 e 37 (2004 a 2005).

Segue-se a descrição dos grupos definidos por PFGE, por ordem decrescente de frequência, e das linhagens definidas por MLST dentro desses grupos. Os grupos serão, dentro de cada serótipo, designados por letras, de modo a facilitar a leitura.

### Estrutura genética dos serótipos incluídos na vacina 7-valente

#### Serótipo 4

No serótipo 4 houve dois grandes grupos, de diferentes linhagens, com um número semelhante de estirpes, representando o ST247 (n=19) e o ST1221 (n=26) (Anexo 2, figura 22a). O ST1221 (grupo a) foi encontrado em 2000 em Portugal numa estirpe responsável por infecção invasiva. Este ST pertence ao mesmo grupo do ST993, previamente identificado numa estirpe causadora de infecção invasiva isolada na Escócia, e não têm grupo fundador (eBURST).

Enquanto que o ST247 (grupo b), que é o hipotético fundador de um grupo de STs, foi anteriormente encontrado somente na Europa, nomeadamente Holanda, Espanha, Hungria, Dinamarca e Polónia em estirpes maioritariamente isoladas de casos de meningite (Enright e Spratt, 1998).

O grupo c era constituído por 11 estirpes e incluía o ST1652, ST1222 e ST801 que se repartiam por duas linhagens, definidas por eBURST. O ST1652 foi encontrado em 2003 numa estirpe causadora de infecção invasiva em Portugal e é um “singleton”, ou seja não está relacionado com nenhum outro ST. O ST1222 foi, por sua vez, encontrado em 2001 também em Portugal. O ST1222 é SLV do ST801, previamente encontrado numa estirpe responsável por infecção invasiva isolada na República Checa, e ambos pertenciam à mesma linhagem que tem múltiplos candidatos para membro fundador.

O grupo d tinha quatro representantes da linhagem ST205, previamente encontrada na Europa, Canadá e Austrália em estirpes que causam infecção invasiva. O grupo e tinha apenas três representantes que pertenciam igualmente ao ST1222.

De 1999 a 2002 as estirpes estavam dispersas por dois grandes grupos com 11 estirpes cada, ST247 e ST1221, e um terceiro com apenas 3 estirpes do ST1222. A maior diferença entre estas estirpes e a totalidade das estirpes isoladas de 1999 a 2005 foi o alargamento dos grupos já existentes e a criação duma nova linhagem com o ST1652 e ST801.

### **Serótipo 6B**

O serótipo 6B é um grupo muito diverso. O grupo a, com 11 estirpes todas multiresistentes, incluía o ST1624 e ST273, descendentes do mesmo grupo fundador (eBURST), e o ST1224, “singleton”, e estava relacionado com o clone internacional Greece<sup>6B</sup>-22 (ST273) e Spain<sup>6B</sup>-2 (ST90) ([sph.emory.edu/PMEN/pmen\\_clone\\_collection.html](http://sph.emory.edu/PMEN/pmen_clone_collection.html)).

O grupo b (n=4), que incluía estirpes relacionadas com o clone Poland<sup>6B</sup>-20 pertencentes ao ST887 previamente encontrado em Portugal em duas estirpes associadas a colonização, tinha uma semelhança de 75% com o grupo c, que continha somente dois representantes um deles apresentando o ST315 relacionado com o clone internacional Poland<sup>6B</sup>-20 ([sph.emory.edu/PMEN/pmen\\_clone\\_collection.html](http://sph.emory.edu/PMEN/pmen_clone_collection.html)).

O grupo d, com apenas duas estirpes, pertencia a dois ST de diferentes linhagens, o ST273, relacionada associada a colonização do serótipo 6A em Portugal.

O grupo e, com uma semelhança de 75% ao grupo a, incluía uma estirpe com o ST273 com um perfil de PFGE idêntico ao do clone internacional Greece<sup>6B</sup>-22 (Anexo 2, figura 22b). O grupo f tinha uma estirpe com o tipo de sequência não determinado que estava relacionada com o

clone internacional Finland<sup>6B</sup>-12 ([sph.emory.edu/PMEN/pmen\\_clone\\_collection.html](http://sph.emory.edu/PMEN/pmen_clone_collection.html)). No total, apenas uma estirpe estava relacionada com o clone internacional South Africa<sup>6B</sup>-8 (grupo g).

De 1999 a 2002 o serótipo 6B era mais homogêneo e tinha dois grupos principais, um maior (n=10) com o ST1224 e ST273 e outro com quatro representantes do ST887. Com a ampliação da amostra criaram-se novos grupos e os grupos anteriores mantiveram-se aproximadamente com o mesmo número de estirpes.

### **Serótipo 9V**

Todas as estirpes (n=44), à excepção de 4, foram incluídas num só grupo (grupo a) relacionado com o clone internacional Spain<sup>9V</sup>-3 (McGee *et al.*, 2001), apesar de terem STs que diferem até 4 *locus* – ST156, ST557, ST644, ST838, ST1225, ST2403 e ST2405. A análise por eBURST dos perfis de MLST confirmou que estas estirpes pertenciam a uma linhagem que tem o ST do clone Spain<sup>9V</sup>-3 como hipotético fundador. As 27 estirpes não susceptíveis à penicilina do serótipo 9V estavam incluídas neste grupo (Anexo 2, figura 22c). O ST156 está espalhado na Europa, Brasil e Canadá em estirpes associadas a colonização e causadoras de infecção que expressam os serótipos 9A, 9V, 11A, 14, 15C e 19F. O ST557 foi encontrado em estirpes causadoras de infecção apenas no Siri-Lanka, Polónia e Suíça, dos serótipos 6B e 9V. O ST644 foi previamente encontrado em estirpes dos serótipos 6B, 19F e 9V nos EUA e do serótipo 9V na Itália e Suíça, enquanto que o ST838 foi encontrado em apenas uma estirpe responsável por infecção invasiva no Reino Unido. Finalmente o ST1225, ST2403, ST2405 foram encontrados em estirpes responsáveis por infecções invasivas em Portugal no ano de 1999, 2005 e 2004, respectivamente.

De 1999 a 2002 a linhagem que actualmente inclui a maioria das estirpes do serótipo 9V estava já formada e agregava todas as estirpes isoladas nesse período. Todos os STs, excluindo o ST2403 e o ST2405, tinham já sido encontrados nessa altura.

### **Serótipo 14**

A maioria das estirpes (78%, n=95/122) isoladas de 1999 a 2005 que expressavam o serótipo 14 não eram susceptíveis à penicilina. Neste serótipo o grupo a (n=84) foi representado por estirpes não susceptíveis à penicilina, à excepção de duas estirpes. Este grupo estava relacionado com o clone Spain<sup>9V</sup>-3, quer pelos perfis de PFGE quer por MLST, e incluiu representantes do ST156, ST557 e ST790 pertencentes à mesma linhagem fundada pelo ST162 (Anexo 2, figura 22d). O ST557 foi previamente encontrado no Siri-Lanka, Polónia e Suíça em estirpes dos serótipos 6B e 9V, enquanto que o ST790 foi encontrado numa estirpe responsável por infecção invasiva em 2001 em Portugal e numa estirpe isolada do LCR na Polónia.

O grupo b (n=24) foi formado por estirpes relacionadas com o clone internacional England<sup>14</sup>-9 (McGee *et al.*, 2001), incluindo representantes do ST15 e do ST409, e eram todas susceptíveis à penicilina excepto duas (Anexo 2, figura 22d). O ST15 foi previamente encontrado em estirpes do serótipo 14 e 19F em diversos países europeus, República Popular da China e Ilha Formosa. O ST409 é hipotético fundador do grupo (eBURST) e foi anteriormente encontrado em apenas duas estirpes não causadoras de infecção invasiva isoladas em Inglaterra e na Suíça (spneumoniae.mlst.net).

O grupo c com 8 estirpes não susceptíveis à penicilina pertencentes ao ST156 fez aumentar os representantes da linhagem do clone Spain<sup>9V</sup>-3 para 95,8% (91/95) estirpes não susceptíveis à penicilina que expressavam o serótipo 14.

No grupo d com apenas duas estirpes estavam presentes os ST1370 e ST156. O ST1370 é um singleton (eBURST) e foi encontrado nessa estirpe responsável por infecção invasiva com resistência intermédia à penicilina no ano de 2002 em Portugal, enquanto que o ST156 identifica o clone internacional Spain<sup>9V</sup>-3. As restantes quatro estirpes estavam divididas em grupos distintos. Um dos grupos, grupo e, foi representado pelo ST1707, encontrado em 2003 naquela estirpe com resistência intermédia à penicilina em Portugal, que por análise por eBURST não estava relacionado com nenhum outro ST. Apenas uma estirpe, com o ST não determinado, estava relacionada com o clone internacional CSR<sup>14</sup>-10 (grupo f).

Comparando estes resultados com os obtidos com as estirpes isoladas de 1999 a 2002 houve fundamentalmente uma ampliação dos dois grupos mais prevalentes e a criação dum novo grupo com o ST1707.

### **Serótipo 18C**

O maior grupo do serótipo 18C continha 10 estirpes representantes dos ST133, ST113 e ST697 (grupo a). O ST133 partilha cinco dos sete *loci* do ST113 e o ST697 partilha apenas dois alelos com estes STs, sugerindo que o grupo tinha três linhagens diferentes (Anexo 2, figura 22e). O ST133, que é um singleton, foi previamente encontrado em estirpes isoladas do LCR em Espanha e em estirpes não invasivas na Finlândia e o ST696 foi encontrado numa estirpe isolada do LCR no Reino Unido. O ST113 foi encontrado em estirpes isoladas de casos de meningite em Espanha, Holanda e Reino Unido, dos serótipos 18B e 18C, e numa estirpe responsável por uma infecção não invasiva na Suíça do serótipo 18C (spneumoniae.mlst.net). Tanto o ST697 como o ST113 são os hipotéticos fundadores das suas linhagens.

Os dois segundos maiores grupos tinham sete representantes cada. O grupo b englobou o ST1650 e o ST1367 que pertencem a linhagens diferentes e foram ambos encontrados

exclusivamente em Portugal, numa estirpe do serótipo 18C isolada do sangue em 2003 (ST1650) e numa estirpe do serótipo 33F isolada do LCR em 2000 (ST1367). O grupo c tinha representantes do ST1233 previamente encontrado em estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas em Portugal em 1999, na Nigéria e na Suíça. Mais de metade das estirpes deste grupo foram isoladas de crianças com idade inferior a 6 anos. O grupo d tinha quatro representantes do ST1651 e do ST102 que pertencem a linhagens diferentes. O ST1651 foi encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva em Portugal no ano de 2003 e o ST102 em estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas na Suécia e Polónia (spneumoniae.mlst.net).

De 1999 a 2002 a maior parte das estirpes do serótipo 18C estavam divididas em dois grupos. O mais amplo (n=5) tinha representantes do ST133 e do ST697, enquanto que o menor grupo (n=3) tinha representantes do ST1233. Posteriormente, no serótipo 18C criaram-se dois novos agrupamentos [(ST1650 + ST1367 e ST1651 + ST102 (Quadro 15)] e ampliaram-se os já existentes. É de notar que o serótipo 18C teve em quase todos os grupos definidos por PFGE representantes de STs não incluídos na mesma linhagem.

### **Serótipo 19F**

Apesar do serótipo 19F não ser dos mais frequentes ele foi constituído por cerca de 27% de estirpes recolhidas de crianças com idade inferior a 6 anos e metade era resistente a pelo menos um antimicrobiano. Os perfis de PFGE das estirpes dividiram-se em três grupos principais (Anexo 2, figura 22f). O grupo a (n=14) tinha representantes do ST177 que está relacionado, quer pelos perfis de PFGE quer de MLST, com o clone internacional Portugal<sup>19F</sup>-21 (ST177), frequentemente encontrado em estirpes resistentes a pelo menos um antimicrobiano e isolado da nasofaringe de crianças saudáveis em Portugal (Sá-Leão *et al.*, 2001). O grupo b tinha cinco representantes e continha os ST391 e ST416 que, através da análise por eBURST, pertencem a linhagens diferentes. O ST391 foi previamente encontrado numa estirpe associada a colonização em Portugal e está relacionado com o clone internacional Portugal<sup>19F</sup>-21. O ST416 foi encontrado em estirpes de diversas origens, expressando os serótipos 19A e 19F, isoladas na Europa (spneumoniae.mlst.net). O grupo c (n=4) tinha representantes do ST347, anteriormente associado a uma estirpe recolhida da nasofaringe na Noruega, cujo hipotético fundador não está determinado (eBURST).

As restantes cinco estirpes não estavam relacionadas com o clone Portugal<sup>19F</sup>-21 nem com o clone Taiwan<sup>19F</sup>-14, estando dispersas por quatro grupos.

De 1999 a 2002 os perfis de PFGE das estirpes do serótipo 19F estavam agregados num só grupo (n=7/9) e eram representantes do ST177 e do ST391. Com o alargamento da colecção os agrupamentos tornaram-se mais incongruentes: a linhagem do clone Portugal<sup>19F</sup>-21 dividiu-se formando um grupo com duas linhagens diferentes (ST391 + ST416). Finalmente, criou-se um terceiro grupo com o ST347 que já tinha sido isolado em 2000 em Portugal numa estirpe causadora de infecção invasiva.

### **Serótipo 23F**

Os perfis de PFGE das estirpes do serótipo 23F estavam divididos em três grupos principais (Anexo 2, figura 22g). O grupo a (n=31) tinha cerca de 84% de estirpes não susceptíveis à penicilina dividindo-se em dois ramos de linhagens diferentes. As 29 estirpes do ST338 e ST732 estavam relacionadas, pelos perfis de PFGE e de MLST, com o clone disperso mundialmente Colombia<sup>23F</sup>-26 (ST338). Estes STs pertencem a uma linhagem diferente da do clone internacional Poland<sup>23F</sup>-16, apesar das estirpes terem apresentado uma semelhança superior a 80% com o perfil deste clone. No outro ramo as 2 estirpes representam o ST1371 que, através da análise por eBURST, tem como hipotético membro fundador o ST795. O ST732 foi previamente encontrado numa estirpe isolada de um doente com meningite no Brasil ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)) e o ST1371 numa estirpe responsável por infecção invasiva isolada do sangue em 2001 em Portugal.

O grupo b (n=8) tinha representantes do ST81, relacionado com o clone internacional Spain<sup>23F</sup>-1 encontrado em estirpes dos serótipos 3, 9V, 14, 19A, 19F e 23F. Os representantes do grupo tinham susceptibilidade diminuída à penicilina e eram resistentes a pelo menos um outro antimicrobiano. O grupo c (n=4) tinha representantes do ST353 que foi anteriormente encontrado na Alemanha ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)) e pertence a um grupo com múltiplos candidatos para membro fundador (eBURST).

As restantes quatro estirpes, distribuídas em dois grupos, não estavam relacionadas com os outros clones internacionais associados ao serótipo 23F, como o clone Taiwan<sup>23F</sup>-15 e o Tennessee<sup>23F</sup>-4 (Anexo 2, figura 22g).

Os dois grupos maioritários, que englobavam as estirpes isoladas de 1999 a 2002, continuaram a ser prevalentes e a estarem associados à não susceptibilidade à penicilina. O grupo do ST338 e ST1371 já estava dividido em dois ramos de 1999 a 2002. Este grupo quase que duplicou e incluiu um novo ST (ST732), fazendo aumentar o número de estirpes relacionadas com o clone internacional Colombia<sup>23F</sup>-26. O grupo do ST81 quase que triplicou e formou-se ainda um novo grupo.

## Estrutura genética dos serótipos relacionados com a vacina 7-valente

### Serótipo 6A

O serótipo 6A foi formado por vários grupos de pequena dimensão. O grupo a que continha os ST1647 e ST1648 foi um dos maiores. Este grupo tinha 9 estirpes, uma delas foi isolada do líquido cefalorraquidiano. Os ST1647 e ST1648 foram encontrados em estirpes responsáveis por infecções invasivas em 2003 em Portugal. O ST1647 tem como hipotético fundador o ST473, enquanto que o ST1648 não está relacionado com nenhum outro ST.

O grupo b (n= 9) tinha representantes do ST395, hipotético fundador da sua linhagem, previamente encontrado numa estirpe associada a colonização em Inglaterra (Brueggemann *et al.*, 2003). O grupo c incluiu a linhagem do ST460 previamente encontrado numa estirpe causadora de meningite em Inglaterra (spneumoniae.mlst.net). Esta linhagem tinha como membro fundador o ST460 e foi representada por sete estirpes. O grupo d que incluiu quatro representantes do ST1714, SLV do ST395, estava próximo no dendrograma do grupo b. O ST1714 foi anteriormente encontrado numa estirpe responsável por infecção invasiva em Inglaterra e Gales.

O grupo e tinha apenas dois representantes com resistência intermédia à penicilina da linhagem ST386, que foi anteriormente encontrada em estirpes associadas a colonização em Portugal e numa estirpe isolada do líquido cefalorraquidiano em Itália expressando, em ambos os casos, o serótipo 6B.

Inesperadamente uma estirpe não susceptível à penicilina representante do ST395 (grupo f) não foi incluída no grupo b com os outros representantes deste ST (Anexo 2, figura 22h). A linhagem do ST1369, grupo g, foi representada apenas por uma estirpe multiresistente isolada em 2001. As duas estirpes que por PFGE são agrupadas com o clone internacional North Carolina<sup>6A</sup>-23 (ST376), cujo ST não foi determinado, pertencem provavelmente à mesma linhagem. Duas estirpes, com ST não determinado, estavam relacionadas com o clone internacional North Carolina<sup>6A</sup>-23 (grupo h).

De 1999 a 2002 o serótipo 6A já era um serótipo heterogéneo formado por três grupos principais, ST395 (n=3), ST1369 (n=2) e o ST460 (n=2). Os grupos do ST395 e do ST460 passaram a ter mais representantes. Apareceu um novo grupo, com os ST1647 e ST1648, que se tornou um dos dominantes. Por outro lado a linhagem do ST1369 teve menos sucesso e passou a ser representada por apenas uma estirpe. Formaram-se ainda dois novos grupos, o ST1714 e o ST386 com poucos representantes.

### Serótipo 9A

Metade das estirpes do serótipo 9A (2/4) pertencem ao ST1569 que está incluído na mesma linhagem do clone Spain<sup>9V</sup>-3 por eBURST, sugerindo haver uma relação entre os serótipos 9A e 9V. O ST1569 foi previamente encontrado em estirpes causadoras de infecções invasivas isoladas na Alemanha e Inglaterra expressando o serótipo 9V e isoladas em França expressando o serótipo 3. Foi também encontrada em 2003 numa estirpe isolada do líquido cefalorraquidiano em Portugal expressando o tipo capsular 9A.

### Serótipo 9L

O serótipo 9L foi formado por um grupo com 6/8 estirpes pertencentes ao ST66, encontrado nas nossas estirpes do serótipo 9N, e ST1654, o que sugeriu que este serótipo e o serótipo 9N estivessem relacionados. O ST1654 foi encontrado numa estirpe do LCR isolada em 2003 em Portugal e faz parte duma linhagem cujo hipotético fundador é o ST66 (*spneumoniae.mlst.net*).

### Serótipo 9N

O maior grupo do serótipo 9N incluiu 12 representantes duma linhagem que incluiu o ST66 e o novo ST2634 encontrado em 2004. Este resultado foi similar a um estudo recente realizado no Reino Unido, em estirpes recolhidas na nasofaringe de crianças saudáveis (Brueggemann *et al.*, 2003), onde o ST66 foi prevalente. Por outro lado, foi diferente dos resultados dum estudo baseado em estirpes causadoras de infecções invasivas isoladas nos EUA, onde o ST632 foi dominante (Gertz *et al.*, 2003). O ST66, SLV do novo ST, foi previamente encontrado em estirpes causadoras de infecção e associadas a colonização na Suécia, Reino Unido, Brasil e Polónia, expressando o serótipo 9N, e na Austrália, expressando o serótipo 19F. Foi também encontrado no Brasil, numa estirpe do serótipo 14 e numa estirpe não tipável, e na Polónia numa estirpe do serótipo 23F e noutra estirpe não tipável.

A maioria (n=9/10) das estirpes do serótipo 9N, isoladas de 1999 a 2002, fazia já parte desta linhagem.

Quando se juntou no mesmo dendrograma os perfis de PFGE das estirpes do serogrupo 9 as estirpes dos serótipos 9V e 9A e as estirpes dos serótipos 9N e 9L estavam separadas em dois grupos, o que está de acordo com os resultados do eBURST.

### Serótipo 18A

O serótipo 18A foi formado por dois grupos que representavam STs não relacionados com nenhum outro ST (eBURST). O maior grupo tinha 5 representantes do ST241 que foi previamente encontrado numa estirpe isolada do LCR em Espanha e numa estirpe do serótipo

23F isolada na China. O outro grupo tinha três estirpes exclusivamente isoladas em 2002 representantes do ST1232, que foi encontrado em 2002 numa estirpe responsável por uma infecção invasiva em Portugal.

De 1999 a 2002 os perfis de PFGE das 3 estirpes do serótipo 18A estavam incluídos num único grupo do ST1232. Estes resultados indicam que, desde esse período, este grupo permaneceu imutável e surgiu um novo grupo, ST241, que se tornou mais prevalente.

### **Serótipo 19A**

O serótipo 19A tinha quatro grupos com mais de 10 representantes (Anexo 2, figura 22i). O grupo a (n=30) representou o ST276, o novo ST2635 e o ST230. À excepção duma estirpe todas as outras não eram susceptíveis à penicilina e pertenciam a duas linhagens, a que incluía o ST276 e o ST230, variantes em apenas um *locus*, e a linhagem do ST2635 que foi descrito pela primeira vez numa estirpe isolada em 2004. Por análise de eBURST o ST276 foi previamente encontrado em estirpes associadas a colonização, uma na Holanda e outra em Portugal. O ST230 foi encontrado em estirpes que expressam os serótipos 14, 19A, 19F, 20 e 24F previamente isoladas na Dinamarca, Itália, Portugal e Polónia.

O grupo b (n=15) representava o ST994 e o ST1151, não relacionados com nenhum outro ST. O ST994 foi encontrado numa estirpe isolada do LCR do serótipo 19C em Portugal e numa estirpe isolada da nasofaringe do serótipo 19A em França. O ST1151 foi encontrado em duas estirpes associadas a colonização em Portugal. O grupo c (n=13) pertencia ao ST193, hipotético membro fundador da sua linhagem (eBURST), previamente encontrado na Europa, Vietname e Brasil, sobretudo em estirpes associadas a colonização mas também responsáveis por infecções invasivas, expressando os serótipos 14, 18C, 19A, 19F e 21 (spneumoniae.mlst.net).

O grupo d, com doze estirpes, pertencia a duas linhagens, uma do ST1201 e outra do ST81 que está relacionado com o clone internacional Spain<sup>23F</sup>-1 (McGee *et al.*, 2001). Por análise de eBURST verificou-se que o ST1201 foi previamente encontrado em apenas uma estirpe associada a colonização isolada na Holanda, enquanto que o ST81 está espalhado internacionalmente (ver serótipo 23F). O grupo e com apenas oito estirpes representava o ST416 que foi previamente encontrado em estirpes dos serótipos 19A e 19F isoladas de diversas origens em Inglaterra, Portugal e Grécia (spneumoniae.mlst.net).

O grupo f, próximo do grupo d, tinha três representantes da linhagem do ST876 e ST199. O ST876 foi descrito somente numa estirpe responsável por uma infecção invasiva, expressando o serótipo 14, isolada na Ilha Formosa, enquanto que o ST199 tem representantes dos serogrupos 6, 15, e 19 isolados na Europa. No nosso estudo, mais de metade das estirpes do grupo d, que

incluiu o ST81, e todas as estirpes do grupo f não eram susceptíveis à penicilina, o que está de acordo com o facto de as duas linhagens descritas nestes grupos terem sido já associadas com a não susceptibilidade à penicilina (spneumoniae.mlst.net). O clone internacional CSR<sup>19A</sup>-11 (ST175) partilhou com o grupo f o perfil de PFGE mas não o de MLST (Anexo 2, figura 22i).

As restantes estirpes do serótipo 19A estavam incluídas em grupos não relacionados com nenhum dos clones reconhecidos pela PMEN deste serótipo Hungary<sup>19A</sup>-6, South Africa<sup>19A</sup>-7 e South Africa<sup>19A</sup>-13.

A única estirpe do serótipo 19C representava o ST1201 e tinha um perfil de PFGE relacionado com o clone internacional Spain<sup>23F</sup>-1.

O dendrograma baseado nos perfis de PFGE das estirpes do serótipo 19A foi um dos que sofreu mais alterações desde o período de 1999 a 2002. Uma das razões para isto ter acontecido foi, provavelmente, o aumento do número de estirpes isoladas de 2003 a 2005 expressando este serótipo. Este aumento fez com que se criassem dois novos grupos com 13 a 15 estirpes cada, representando o ST193 e o ST994 + ST1151. O grupo que incluía apenas o ST276 (n=2) passou a ser o mais prevalente (n=30) e a incluir dois novos STs. O maior grupo (n=8) no período de estudo de 1999 a 2002 incluía o ST1201, ST81 e ST876. Posteriormente o grupo fragmentou-se em dois, um que incluía o ST1201 + ST81 e outro o ST876 + ST199. O ST199 estava anteriormente isolado num grupo de apenas duas estirpes. Finalmente, o único grupo que permaneceu razoavelmente estável foi o que incluía o ST416 que passou de 3 representantes para oito.

### **Serótipo 23A**

O serótipo 23A foi formado por um grupo maioritário (n=7), apenas com estirpes isoladas de 2003 a 2005, que pertenciam à linhagem do grupo fundador ST439. O ST2400 e o ST2404, por análise de eBURST, partilham cinco dos sete *locus* e foram encontrados em Portugal em estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas em 2005 e em 2003, respectivamente (spneumoniae.mlst.net). O ST2404 foi também encontrado numa estirpe responsável por infecção invasiva no Reino Unido. Somente uma estirpe responsável por uma infecção isolada em 2004 representou o ST81. Este ST está relacionado com o clone internacional Spain<sup>23F</sup>-1, espalhado por estirpes de diversos serótipos, o que fez aumentar para 21 os representantes deste clone expressando vários serótipos: 19A, 23A e 23F.

Juntando as estirpes dos serótipos 23A e 23F no mesmo dendrograma verificou-se que apenas as estirpes da linhagem do ST81 tinham os perfis de PFGE relacionados.

### **Serótipo 23B**

Todas as estirpes (n=4) do serótipo 23B pertenciam à linhagem do ST439, hipotético membro fundador dessa linhagem (eBURST) e previamente isolado numa estirpe associada a colonização na Inglaterra (spneumoniae.mlst.net).

Juntando as estirpes dos serótipos 23A e 23B no mesmo dendrograma verificou-se que, apesar de algumas partilharem a mesma linhagem fundada pelo ST439, estavam em grupos de PFGE separados.

### **Estrutura genética dos serótipos não relacionados com a vacina 7-valente**

#### **Serótipo 1**

O serótipo foi dividido em quatro grupos, dois deles com apenas uma estirpe cada. Nos dois grupos principais, o grupo a incluiu 108 representantes dos ST306, ST227 e ST228, que são DLVs entre si, e o grupo b incluiu 37 representantes dos ST304 e ST350, que também são DLVs um do outro (Anexo 2, figura 22j). Estes STs, à excepção do ST350, eram membros de uma linhagem (linhagem A) associada a infecções invasivas encontrada exclusivamente na Europa e América do Norte (Brueggemann e Spratt, 2003). Actualmente o ST304 foi encontrado em estirpes responsáveis por infecções invasivas na Europa, EUA e Canadá e em estirpes que causaram infecções não invasivas e associadas a colonização na Austrália, enquanto que o ST350 foi encontrado apenas numa estirpe causadora de infecção invasiva na Noruega (spneumoniae.mlst.net). O ST306 foi anteriormente encontrado na Europa e EUA e o ST228 em estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas em três países europeus e no Canadá. O ST227 foi identificado em estirpes responsáveis por infecções invasivas no Reino Unido, Dinamarca, EUA, Canadá e em estirpes que causaram infecções não invasivas e associadas a colonização na Austrália.

O grupo c (n=1) incluiu o ST30, que foi previamente encontrado em Espanha em estirpes do serótipo 16F causadoras de meningite.

De 1999 a 2002 o serótipo 1 era igualmente formado por dois grupos principais mas numa delas o ST227 estava ausente. Este ST foi encontrado pela primeira vez na nossa colecção em 2005 (Quadro 15).

#### **Serótipo 3**

No serótipo 3 houve a formação de 2 grupos maioritários, sendo que o grupo a englobou a maioria das estirpes e foi formado por quatro linhagens não relacionadas por eBURST, o que sugeriu que as estirpes do serótipo 3 pertenciam a cinco linhagens diferentes (Anexo 2, figura 22l). No grupo a (n=124), uma linhagem continha o ST180, previamente encontrado em infecção

pneumocócica e em casos de colonização em vários países europeus, no Brasil, Canadá e ilha Formosa (Enright e Spratt, 1998; Gertz *et al.*, 2003). O ST180 é o hipotético fundador do grupo que engloba os ST1230 e ST2407, exclusivamente encontrados em estirpes responsáveis por infecções invasivas em Portugal, no ano de 1999 e de 2005, respectivamente. O ST1230 é SLV e o ST2407 é DLV do fundador e são DLVs um do outro. Dentro do mesmo grupo de PFGE, mas pertencente a uma linhagem de MLST de que é o fundador o ST378, encontrou-se o ST232 que foi descoberto numa estirpe isolada do líquido cefalorraquidiano no Reino Unido. A terceira e quarta linhagem incluiu os ST260, ST1220 e ST1646. O ST1220 foi previamente encontrado em casos de infecção invasiva em Itália e Portugal e difere apenas num *locus* do ST260 (fundador) que é um clone importante em Espanha (Enright *et al.*, 1999). O ST1646 não está relacionado com nenhum outro ST e foi encontrado em Portugal numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em 2003 (Anexo 2, figura 221).

O grupo b foi composto por cinco representantes da linhagem do ST458 anteriormente encontrado em estirpes que causaram meningite no Gana e Egipto e isoladas de bacteriémia na Inglaterra.

As restantes oito estirpes estavam dispersas por 6 grupos e em apenas uma delas foi encontrado o ST180 (grupo c)

Entre 1999 e 2002 a estrutura do serótipo 3 era somente constituída por dois grupos principais e três linhagens (Quadro 15) porque os representantes do ST232 e ST1646 apareceram somente em 2003.

### **Serótipo 5**

No serótipo 5 a maioria das estirpes (n=15/16) pertenciam ao ST1223 e estavam incluídas no mesmo grupo, definido por PFGE, do clone internacional Colombia<sup>5</sup>-19, sugerindo que pertencem à mesma linhagem. O ST1223 difere em apenas um *locus* do clone Colombia<sup>5</sup>-19 e foi encontrado em 1999 numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em Portugal. Este grupo já incluía a maioria (n=11/12) dos perfis de PFGE das estirpes do serótipo 5 isoladas de 1999 a 2002.

### **Serótipo 7C**

O serótipo 7C foi formado por dois grupos de linhagens diferentes. O ST1201, representado por 4 estirpes, foi previamente encontrado na Holanda numa estirpe isolada da nasofaringe do serótipo 19A (*spneumoniae.mlst.net*). O ST1653, representado por 2 estirpes, é um ST que não está relacionado com nenhum outro por eBURST e foi encontrado apenas em Portugal no ano 2003 numa estirpe invasiva do serótipo 5.

### **Serótipo 7F**

O serótipo 7F tinha um grupo com quase a totalidade das estirpes (n=66/73) todas elas representantes do ST191 (grupo a). As duas estirpes que não pertenciam a este grupo de PFGE e que foram caracterizadas por MLST também apresentaram o ST191 (grupo b e c), o que sugere que esta linhagem de MLST é a única associada ao serótipo 7F (Anexo 2, figura 17m). O ST191 foi previamente encontrado em várias estirpes responsáveis por infecções invasivas e uma estirpe associada a colonização em diversos países europeus, no Uruguai e Brasil ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)). Num estudo recente nos EUA foi documentada a prevalência deste clone em estirpes responsáveis por infecções invasivas expressando o serótipo 7F (Gertz *et al.*, 2003). A linhagem encontrada no serótipo 7F não estava relacionada com as encontradas no serótipo 7C.

Não houve alterações na estrutura clonal do serótipo 7F desde o período de 1999 a 2002, apenas um aumento do número de representantes do ST191.

### **Serótipo 8**

O serótipo 8 tinha dois grupos de maior dimensão, o grupo a com 51 representantes do ST53 e o grupo b com 7 representantes exibindo o ST404 (Anexo 2, figura 22n). O ST53 foi previamente encontrado em estirpes maioritariamente causadoras de meningite em vários países europeus e no Brasil ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)). Contudo, no nosso estudo nenhuma das estirpes incluídas neste grupo foram isoladas do LCR. O ST404, hipotético membro fundador da sua linhagem (eBURST), foi encontrado numa estirpe associada a colonização em Inglaterra (Brueggemann *et al.*, 2003) e em estirpes responsáveis por infecções invasivas no Brasil, Itália, Polónia e Suíça. A primeira associação entre esta linhagem e infecção invasiva ocorreu num estudo publicado por nós anteriormente. As restantes 12 estirpes estavam distribuídas por 8 pequenos grupos.

Não houve alterações na estrutura clonal do serótipo 8 desde o período de 1999 a 2002. No grupo de PFGE associado ao ST53 foi onde se observou um maior aumento de representantes.

### **Serótipo 10A**

O serótipo 10A foi formado por um grupo maioritário (n=21) juntando os tipos de sequência ST97, ST1226 e ST1231 (grupo a). Estes STs pertencem à mesma linhagem, segundo a análise por eBURST, e têm como grupo fundador o ST460 (Anexo 2, figura 22o). O ST97 foi previamente encontrado em duas estirpes isoladas do LCR isoladas em Espanha e na Polónia. O ST1226 e o ST1231 foram ambos encontrados em estirpes responsáveis por infecções invasivas

isoladas em Portugal. De 1999 a 2002 todas as estirpes à excepção de uma estavam já incluídas no grupo descrito.

### **Serótipo 10F**

As estirpes do serótipo 10F estavam todas incluídas num único grupo definido pelo ST1649. Este ST foi encontrado em 2003 numa estirpe responsável por uma infecção invasiva que tinha sido isolada em 2001 em Portugal. Verificou-se que a linhagem do serótipo 10A não estava relacionada com a do serótipo 10F e que os perfis de PFGE estavam, num dendrograma conjunto com a estirpe do serótipo 10B, separados em três grupos com menos de 80% de semelhança.

### **Serótipo 11A**

Dos quatro grupos que formam o serótipo 11A, dois tinham mais do que um representante. O grupo a (n=27) pertencia a uma só linhagem, com o ST62 e o ST408, que têm como fundador o ST62 (eBURST) (Anexo 2, figura 22p). Esta linhagem foi igualmente prevalente em estirpes associadas a colonização isoladas no Reino Unido (Brueggemann e Spratt, 2003) e em estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas nos EUA (Gertz *et al.*, 2003), sugerindo que está globalmente disseminada. O ST62 foi previamente encontrado em estirpes responsáveis por infecções invasivas em Espanha e Itália e numa estirpe associada a colonização no Brasil, enquanto que o ST408 foi encontrado numa estirpe associada a colonização em Inglaterra (spneumoniae.mlst.net).

O grupo b tinha oito representantes que pertenciam ao ST30, previamente encontrado em duas estirpes do serótipo 16F isoladas de doentes com diagnóstico de meningite em Espanha (Anexo 2, figura 22p). O grupo c tinha apenas uma estirpe isolada do LCR representante do ST2402. Este ST foi encontrado em 2005 no âmbito deste estudo e não está relacionado com nenhum outro ST (eBURST).

Entre 1999 e 2002 o grupo maioritário já incluía o ST408 e o ST62. Posteriormente foi ampliado e surgiu um outro grupo com representantes do ST30.

### **Serótipo 12B**

O serótipo 12B formou dois grupos com menos de 80% de semelhança entre si (Anexo 2, figura 22q). O grupo a tinha 29 representantes de diferentes STs – ST1365, ST218 e ST2406. O ST218 é o hipotético fundador da linhagem que inclui o ST1365 (eBURST). O ST1365 foi encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em Portugal em 2000, enquanto que o ST218 foi encontrado em estirpes exclusivamente do serótipo 12F, maioritariamente isoladas do LCR, na Dinamarca, Reino Unido, Uruguai, Canadá, Espanha e Polónia (Enright e Spratt, 1998; Gertz *et al.*, 2003). O ST2406 não está relacionado com nenhum

outro ST e foi encontrado pela primeira vez no âmbito deste estudo numa estirpe isolada em 2005.

O grupo b incluiu quatro estirpes que representavam o ST989 anteriormente encontrado em África em estirpes dos serótipos 12F e 12B isoladas do LCR e da nasofaringe.

O dendrograma das estirpes isoladas entre 1999 e 2002 continha dois grupos, cada um com 8 estirpes, ambos com representantes do ST218. Um desses grupos incluía também o ST1365 e o outro o ST989. Os dados de MLST sugeriram que estes grupos constituíam linhagens separadas. Posteriormente, os representantes do ST989 ficaram num grupo independente e o grupo do ST218 tornou-se prevalente.

### **Serótipo 13**

O serótipo 13 foi formado por um grupo maioritário com quatro representantes do ST574 que foi encontrado em 1996 numa estirpe isolada na Escócia. As restantes estirpes estavam dispersas por três grupos.

### **Serótipo 15A**

Todas as estirpes do serótipo 15A não susceptíveis à penicilina e com o fenótipo MLS<sub>B</sub> (n=9) estavam incluídas num grupo que representava o ST2108 previamente descrito numa estirpe responsável por uma infecção invasiva do serótipo 19A em Espanha. O outro grupo, com apenas 1 estirpe, representava o ST1228 que foi anteriormente encontrado em Portugal numa estirpe do serogrupo 19 isolada dum caso de colonização ([spenumoniae.mlst.net](http://spenumoniae.mlst.net)).

Por se ter encontrado nas estirpes do serótipo 15A dois STs geralmente encontrados em estirpes do serótipo 19A analisaram-se os perfis de PFGE e de MLST dos dois serótipos e concluiu-se que não estavam geneticamente relacionados (ver capítulo III).

Como exposto no quadro 15 o serótipo 15A surgiu na nossa colecção de estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas apenas em 2003, o que o torna um dos serótipos a emergir mais recentemente no nosso estudo.

### **Serótipos 15B e 15C**

Ao juntar-se os perfis de PFGE das estirpes que expressavam o serogrupo 15 verificou-se que os perfis de PFGE e MLST das estirpes do serótipo 15B (n=3) e 15C (n=1) tinham uma semelhança > 80%, estando separadas do grupo de estirpes do serótipo 15A. O ST 1706 foi encontrado numa estirpe do serótipo 15B isolada em 2000 em Portugal mas estudada apenas em 2003 (Aguiar, comunicação pessoal).

### Serótipo 16F

As 5 estirpes do serótipo 16F estavam repartidas por cinco grupos distintos. Somente um grupo incluiu dois representantes do ST414 anteriormente encontrado em uma estirpe associada a colonização em Inglaterra (Brueggemann *et al.*, 2003). Se considerássemos apenas as estirpes isoladas de 1999 a 2002 haveria a formação de apenas dois grupos, sendo o grupo maioritário (n=3/4) representante do ST414.

### Serótipo 17F

Apesar de haver apenas sete estirpes expressando o serótipo 17F elas estavam divididas em quatro grupos, de acordo com os perfis de PFGE. Os dois grupos maioritários pertenciam a três linhagens distintas. O primeiro grupo incluiu três representantes das linhagens do ST2401 e do ST15. O ST2401 foi encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em 2005 em Portugal e o ST15 foi previamente encontrado em estirpes dos serótipos 14 e 19F em diversos países europeus, República Popular da China e Ilha Formosa (*spneumoniae.mlst.net*). O outro maior grupo incluiu dois representantes do ST1709 que foi encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em 2003 em Portugal.

### Serótipo 20

O serótipo 20 foi dividido em dois grupos, o maior grupo com oito representantes definido pelo ST235 e o menor com cinco representantes definido pelo ST1026, que pertencem a linhagens diferentes por análise do eBURST. O ST235 foi encontrado em Espanha, Áustria e Polónia em estirpes expressando os serótipos 7C e 20, enquanto que o ST1026, hipotético membro fundador da sua linhagem, foi anteriormente encontrado em duas estirpes isoladas do LCR na Polónia, enquanto que (*spneumoniae.mlst.net*).

Quando se consideram apenas as estirpes do serótipo 20 que foram isoladas de 1999 a 2002 verifica-se que os seus perfis de PFGE estavam também divididos em dois grupos, mas o grupo maioritário tinha representantes do ST1026.

### Serótipo 22F

A maioria (92%) das estirpes do serótipo 22F foi isolada de adultos e dividiu-se em 2 grupos e três linhagens. O grupo a (n=31) tinha representantes do ST1012 e do ST433 que diferem em todos os *locus*. O grupo b (n=4) representou o ST1372 que não está relacionado com nenhum outro ST (Anexo 2, figura 22r). É interessante notar que o ST1012 foi previamente encontrado numa estirpe do serótipo 11A isolada do LCR na Polónia e é o hipotético fundador de uma linhagem, por análise de eBURST, que contém estirpes responsáveis por infecções invasivas recolhidas de diversos pontos da Europa e expressando diferentes serótipos (11A, 18, 33, 33A e

33F). O ST433 foi encontrado em Inglaterra em estirpes associadas a colonização e na Polónia em estirpes isoladas do LCR, enquanto que o ST1372 foi pela primeira vez encontrado em Portugal no ano de 2000 numa estirpe causadora de infecção invasiva.

Houve uma estreita relação entre os perfis de PFGE de algumas estirpes dos serótipos 22F e 11A, nomeadamente as estirpes do ST1012 + ST433 (22F) e do ST408 + ST62 (11A) estavam incluídas no mesmo grupo. Porém, o ST1012 partilha apenas 3 alelos com o ST408 e 4 alelos com o ST62, sugerindo que estas estirpes não pertencem à mesma linhagem. Houve mais dois grupos que agregavam estirpes de ambos os serótipos mas nenhuma das estirpes foi analisada por MLST.

A maioria (9/11) das estirpes isoladas de 1999 a 2002 estava incluída num grupo representado pelo ST1012. Esta foi a primeira descrição de estirpes nesta linhagem expressando o serótipo 22F. As restantes duas estirpes representavam o grupo do ST1372. Estas duas linhagens foram isoladas exclusivamente de adultos. Posteriormente o grupo do ST1012 incluiu um outro ST tendo aumentado mais de três vezes, enquanto que o grupo do ST1372 duplicou.

### **Serótipos 24A e 24F**

As 10 estirpes do serogrupo 24 estavam separadas em dois grupos pelos perfis de PFGE e pertenciam a duas linhagens por MLST. O maior grupo, definido pelo ST72 cujo fundador não está determinado (eBURST), tinha 8 representantes e incluiu duas estirpes isoladas do LCR e a única estirpe do serótipo 24A. O ST72 foi anteriormente encontrado em estirpes do serótipo 24F isoladas do LCR em Espanha, Hungria e Polónia ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)).

O menor grupo incluiu o ST230 e o ST1708 cujo membro fundador é o ST230 (eBURST). Este grupo foi representado por duas estirpes não susceptíveis à penicilina e resistentes a pelo menos um outro antimicrobiano. O ST230, que difere num *locus* do ST1708, foi isolado em estirpes dos serótipos 14, 19A, 19F, 20 e 24F encontradas na Dinamarca, Itália, Portugal e Polónia. O ST1708 foi encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em 2003 em Portugal.

### **Serótipo 31**

A maioria (7/8) das estirpes do serótipo 31 pertencia a um grupo que incluiu o ST1766, encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em 2003 em Portugal, e o ST1684, previamente encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva do serótipo 9N isolada em Inglaterra e Gales ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)). Estes STs pertencem a diferentes linhagens por eBURST.

### **Serótipo 33A**

A maioria (5/6) das estirpes do serótipo 33A representava o ST717, anteriormente encontrado numa estirpe associada a colonização do serogrupo 33 isolada em Portugal e numa estirpe responsável por infecção invasiva do serótipo 33F isolada no Reino Unido (spneumoniae.mlst.net). O ST717, por análise de eBURST, é o hipotético membro fundador de um grupo restrito.

### **Serótipo 33F**

Com base nos perfis de PFGE foi possível verificar que as estirpes do serótipo 33F dividiram-se em dois grupos, tendo um deles apenas uma estirpe. O grupo a (16/17) continha representantes de quatro linhagens independentes, ST100, ST1655 e ST717, ST1367 e o novo ST2633 (Anexo 2, figura 22s). O ST100 foi previamente encontrado em estirpes causadoras de infecções invasivas e não invasivas, dos serótipos 33F, 5, 6A e do serogrupo 33, isoladas em Espanha, na Polónia, em Itália e na Suíça (spneumoniae.mlst.net). O ST717 é o hipotético fundador de uma linhagem que inclui o ST1655 (eBURST) e já tinha sido identificado em estirpes da nossa colecção que expressavam o serótipo 33A. O ST1655, que difere somente num *locus* do ST717, foi encontrado numa estirpe responsável por uma infecção invasiva isolada em Portugal em 2003. O ST1367 e o ST2633 foram também encontrados em Portugal em estirpes isoladas do LCR em 2000 e 2004, respectivamente. Os perfis de PFGE das estirpes do serótipo 33F isoladas entre 1999 e 2002 indicam que o grupo maioritário já estava presente e era formado por 3 linhagens.

Ao juntar no mesmo dendrograma os perfis de PFGE das estirpes do serogrupo 33 formou-se um grupo maioritário representado por 22/23 estirpes que pertenciam às 4 linhagens descritas, o que significa que as estirpes dos serótipos 33A e 33F estavam geneticamente relacionadas.

### **Serótipos 35B, 35C e 35F**

As quatro estirpes do serótipo 35F estavam, em conjunto com a única estirpe do serótipo 35B, num grupo que representou o ST1366 e o ST1368, ambos encontrados em Portugal no ano de 2001 numa estirpe isolada do sangue e do LCR, respectivamente (spneumoniae.mlst.net). O ST1368 foi igualmente encontrado numa estirpe isolada do LCR na Nigéria. Através da análise de eBURST o ST1368 não está relacionado com nenhum outro ST e difere em quatro *loci* do ST1366. A estirpe do serótipo 35C estava incluída num outro grupo com menos de 70% de semelhança com o grupo anterior.

### **Estirpes não tipáveis**

As estirpes não tipáveis (n=24) tinham perfis de PFGE muito diversos formando no total 16 grupos. O maior grupo (n=6) tinha representantes do ST53 que foi previamente encontrado em estirpes do serótipo 8, maioritariamente recolhidas do LCR, isoladas na Europa e Brasil. Observou-se uma semelhança superior a 80% entre os perfis de PFGE destas estirpes e as estirpes do serótipo 8 que representavam o ST53. Contudo, as estirpes não tipáveis reagiram negativamente com todos os soros na reacção de Quellung, indicando que não expressam o serótipo 8.

### **Distribuição das linhagens nos três períodos de estudo e associação entre os serótipos e os perfis de PFGE e MLST**

Foram identificadas por eBURST 83 linhagens. A maioria dos clones mais frequentes apareceu em todos os anos de estudo (1999 a 2005), observando-se variações na prevalência das maiores linhagens em cada ano (quadro 15). Para alguns serótipos ou serogrupos não foram isoladas estirpes nos anos indicados entre parêntesis: 5 (2000, 2005), 7C (1999 a 2001, 2004), 9N (2003), 9L (1999 a 2002), 9A (1999 a 2002), 10F (1999, 2002, 2004), 10A (1999), 11A (2001), 13 (2002 a 2004), 15A (1999 a 2002), 15B/C (1999, 2002, 2005), 16F (1999, 2002, 2003, 2005), 17F (1999, 2002, 2004), 18A (1999, 2003, 2005), 19F (2002), 20 (1999), 23A (1999, 2001, 2002), 23B (1999, 2001), 24A/F (1999, 2000), 31 (1999, 2002), 33A (1999, 2001 a 2003), 33F (2001, 2002), 35B/C/F (1999, 2000, 2003, 2005), estirpes não tipáveis (2003).

## MEIOS DE CULTURA E OUTRAS SOLUÇÕES

### Meios de cultura sólidos

1) Gelose Sangue. Meio de TSA (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 5% (vol/vol) sangue desfibrinado de carneiro (Probiológica, Belas, Portugal).

2) Gelose Mueller Hinton com suplemento de 5% de sangue de carneiro (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França).

### Meios de cultura líquido

1) Para crescimento das bactérias:

BHI (Difco Laboratories, Maryland, EUA).

2) Para armazenamento das bactérias a -70°C:

Meio de TSB (Difco Laboratories, Maryland, EUA).

3) Para medição da estabilidade do fenótipo e da frequência de transição entre fenótipos:

Meio semi-sintético C+Y. Meio C suplementado com 2% de extracto de levedura a 5% (Difco Laboratories, Maryland, EUA) (Lacks e Hotchkiss, 1960).

5) Para medição da actividade da  $\beta$ -galactosidase:

THY (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 0,2% de extracto de levedura (Difco Laboratories, Sparks, EUA).

6) Para a preparação de “stocks”:

Meio de glicerol. Meio de TSB suplementado com 15% glicerol (96%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Os meios sólidos e líquidos foram esterilizados na autoclave a 120°C durante 20 min, à pressão de cerca de 2 bar no ciclo líquido.

## **Tampões e soluções**

Para a visualização de variantes transparentes e opacos a catalase foi diluída na proporção de 1/100 no seguinte tampão:

Tampão Hepes (pH 7,5): 10mM Hepes (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 2mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Para a obtenção dos discos de ADN de *S. pneumoniae* foram preparados os seguintes tampões e soluções:

- 1) Tampão PIV: 0,01M Tris (pH 7,5), 1M NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).
- 2) Tampão EC: 0,01M Tris (pH 7,5), 1M NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 0,1M EDTA (pH 7,5), 2% ácido desoxicólico (Sigma, ST. Louis, EUA), 5% n-lauroil-sarcosina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 5% Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter) (Sigma, ST. Louis, EUA).
- 3) Tampão ES: 0,5M EDTA (pH 9), 1% n-lauroil-sarcosina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).
- 4) Solução TE (10×): 0,01M Tris (pH 7,5), 0,001M EDTA (pH 8).
- 5) Tampão de restrição: 10× tampão de restrição preparado para “stock” – 500mM acetato de potássio, 200mM Tris-acetato, 100mM acetato de magnésio, 10mM DTT, pH final 7,9 a 25°C. Mantido a -20°C.
- 6) RNase: Ribonuclease A pancreática (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) preparada para solução “stock” (2 mg/ml). Fervida em água durante 15 min para a inativação das DNases e mantida a -20°C.
- 7) Agarose para discos: 1,5% (p/v) LMP “Low Melting Point” agarose (BMA, Rockland, EUA) em PIV.
- 8) 0,5M EDTA pH 7,5: a partir de EDTA.2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).
- 9) 1M Tris pH 7,5: a partir de hidrocloreto de Trizma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Para o PFGE foram preparadas as seguintes soluções:

1) Solução corante (6×): 0,25% (p/v) azul de bromofenol (Amresco, Solon, EUA), 0,25% (p/v) xileno cianol FF (Amresco, Solon, EUA), 15% (p/v) Ficoll (Amresco, Solon, EUA). Esterilizada por filtração, com filtro estéril de 0,45 µm e mantida a 4°C.

2) Gel de agarose: 1% (p/v) agarose (BioRad, Richmond, EUA) em 0,5×TBE.

3) Solução de brometo de etídio: 1,7% (p/v) brometo de etídio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e, quando necessário, autoclavadas a 120°C durante 20 min, à pressão de cerca de 2 bar no ciclo líquido.



## **CAPÍTULO III – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

No presente trabalho pretendeu-se cumprir dois objectivos principais. O primeiro era, a partir duma amostra representativa da população de *Streptococcus pneumoniae* causadora de infecção invasiva em Portugal, estabelecer qual o papel da variação de fase na infecção pneumocócica. Pretendeu-se também determinar diferenças nos fenótipos de opacidade entre as estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas. O segundo objectivo era continuar o estudo epidemiológico, iniciado com as estirpes isoladas entre 1999 e 2002, comparando os resultados previamente publicados com os dados das estirpes isoladas em 2004 e 2005. Pretendeu-se compreender a variação da frequência dos serótipos, a variação da resistência aos antimicrobianos e a evolução dos clones dentro de cada serótipo, face à introdução da vacina conjugada 7-valente em Portugal.

A caracterização fenotípica realizada na nossa colecção de estirpes responsáveis por infecções poderia ter sido influenciada por uma elevada frequência de variação de fase. Isto poderia introduzir um erro na presente análise, uma vez que a maioria das estirpes foram cultivadas no laboratório pelo menos cinco vezes antes de serem caracterizadas. Contudo, este facto não deve ter comprometido as nossas conclusões porque, mesmo considerando a frequência de variação mais elevada anteriormente medida,  $10^{-3}$  (Weiser *et al.*, 1994), espera-se ter escolhido aleatoriamente uma colónia do fenótipo minoritário em apenas 0,1% das vezes, o que representa um erro cumulativo de 0,5% após cinco passagens. É importante notar que esta estimativa assume que não existe nenhuma pressão selectiva para nenhum dos fenótipos durante o crescimento e passagens *in vitro*.

Para confirmar que as passagens laboratoriais não influenciaram o fenótipo avaliado neste trabalho testou-se a estabilidade da variação de fase e verificou-se que após 25 passagens consecutivas o fenótipo dominante foi mantido. Isto significa que as estirpes estudadas de aparência opaca, transparente e intermédia transmitem fielmente para a geração seguinte o fenótipo expressado e que aparentemente nenhum dos fenótipos é particularmente favorecido durante o crescimento e passagens *in vitro*.

Num estudo realizado recentemente mostrou-se que a maior expressão da cápsula nos variantes opacos deve-se a um mecanismo que é independente da regulação directa dos genes da cápsula. Esse mecanismo, que não está totalmente esclarecido, implica o aumento da expressão dos genes envolvidos na biosíntese da uridina monofosfato (UMP), um dos nucleótidos do ácido ribonucleico (Stroeher e Paton, 2007). Não se sabe se este mecanismo está sob a influência dos genes do *locus* da opacidade. Contudo, é de prever que sim tendo em conta que o *locus* da

opacidade encontra-se na vizinhança de inúmeros genes de virulência (Saluja e Weiser, 1995). Estes genes estão possivelmente envolvidos na expressão de diversas proteínas de superfície implicadas na variação do fenótipo, como a autolisina A (Weiser *et al.*, 1996), proteína A de ligação à colina (Rosenow *et al.*, 1997), proteína A de superfície (Kim e Weiser, 1998), neuraminidase A (King *et al.*, 2004) e de estruturas de superfície como o polissacárido capsular e o ácido teicóico (Kim e Weiser, 1998). Todos estes estudos realçam a complexidade do fenómeno da variação de fase, que envolve múltiplos genes e diferentes mecanismos de regulação que estão ainda por descobrir.

A expressão de proteínas de superfície e de estruturas implicadas na variação de fase é influenciada pelas condições do meio, como a disponibilidade em oxigénio (Weiser *et al.*, 2001). O modelo de variação de fase proposto defende que a disponibilidade em oxigénio suprime a produção de polissacárido capsular, apenas nos variantes opacos, podendo funcionar como factor selectivo dos variantes transparentes na nasofaringe (Weiser *et al.*, 2001). A menor concentração de oxigénio no sangue, em contraposição à nasofaringe, pode despoletar a virulência da estirpe aumentando a expressão do polissacárido (Weiser *et al.*, 2001). Esta pressão selectiva faz com que a aparência da colónia se altere, como resultado duma reorganização dos componentes da superfície que representam uma adaptação a um novo nicho no hospedeiro. No sangue, os variantes transparentes devem ser eliminados por expressarem uma maior quantidade de fosforilcolina, entre outros factores (Henderson *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Goldenberg *et al.*, 2004). Por outro lado, os variantes opacos devem apresentar um maior potencial de sobrevivência neste nicho por expressarem mais polissacárido capsular e PspA, conseguindo evadir o sistema imunitário do hospedeiro (Kim *et al.*, 1999; Orihuela e Tuomanen, 2006).

Perante a clara importância de um eventual *locus* de controlo da opacidade, e não estando o fenómeno de variação de fase totalmente compreendido, é de questionar se algum dos variantes é o resultado duma mutação neste *locus*. Se assim fosse a frequência de reversão entre os variantes opacos e transparentes poderia ser diferente. O variante resultante do *locus* mutado poderia reverter para o outro fenótipo com uma frequência bastante menor.

Para responder a esta pergunta determinou-se a frequência de variação de fase. As colónias opacas, transparentes e intermédias foram isoladas de estirpes em que as diferenças entre os variantes eram claramente identificáveis. Verificou-se que o crescimento *in vitro* duma colónia transparente gerou uma população de colónias maioritariamente transparentes e uma minoria de colónias opacas. A frequência de transição de fase variou de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  por geração, tal como anteriormente descrito por Weiser *et al.* (1994). A mesma frequência foi observada quando a colónia original era opaca ou intermédia. A transição para uma mistura de fenótipos foi sempre

rara qualquer que fosse o fenótipo inicial, o que sugere haver uma preferência pela reversão para um fenótipo maioritário (ver abaixo). O facto da estirpe ser maioritariamente opaca, transparente ou intermédia não influenciou a frequência de reversão.

Os resultados sugerem que nenhum dos variantes estudados (transparentes, opacos e intermédios) resultou de mutações irreversíveis do *locus* da opacidade.

Seguidamente determinou-se o fenótipo dominante das estirpes causadoras de infecções invasivas que expressavam os 10 serótipos mais prevalentes entre 1999 e 2002 em Portugal (1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 12B, 14, 19A, 23F) (Quadro 4). Os nossos dados confirmaram a previsão dos modelos animais e estudos *in vitro* de que o fenótipo opaco deveria ser predominante em estirpes responsáveis por infecções invasivas.

Apesar de haver uma relação de 2:1 na frequência do fenótipo opaco em relação ao transparente (Figura 3), esta relação não foi igual em todos os serótipos. Esta heterogeneidade permitiu estabelecer uma associação estatística entre alguns serótipos e a opacidade das estirpes. Essa associação foi calculada com base no “odds ratio”, calculado contra todos os outros serótipos, que é um método que permite comparar uma dada característica entre estudos diferentes. Porém o método tem a desvantagem do conjunto de todas as outras estirpes usadas para calcular o OR específico a cada serótipo variar em cada comparação.

Observou-se que, entre os serótipos estatisticamente associados à opacidade (IC de 95% que não cruzaram a unidade), os serótipos 1 (OR = 10,09), 4 (OR = 11,96) e 23F (OR = 4,64), estavam mais associados ao fenótipo opaco, enquanto que os serótipos 3 (OR = 0,15) e 14 (OR = 0,19) estavam menos associados ao fenótipo opaco do que o espectável (Figura 4).

A partir destes resultados sugeriu-se a hipótese de que talvez houvesse uma correlação entre a elevada associação ao fenótipo opaco, apresentada pelos serótipos 1, 4 e 23F, e a preferência destes serótipos para causarem infecções invasivas, e uma correlação entre a baixa associação ao fenótipo opaco, apresentada pelos serótipos 3 e 14, e a preferência destes serótipos para colonizarem a nasofaringe.

Sabe-se da literatura que os serótipos 1 e 4 são raramente isolados de portadores saudáveis (Brueggemann *et al.*, 2003; Sandgren *et al.*, 2004). Para além disso, o serótipo 1 tem sido historicamente associado a surtos de infecção pneumocócica, incluindo um aumento recente de meningite pneumocócica no Gana (Leimkugel *et al.*, 2005). Num estudo prévio sobre a opacidade de estirpes isoladas de casos de infecção estes dois serótipos eram também os mais frequentes (n=13/19) e, em concordância com os nossos dados, as estirpes isoladas do sangue apresentaram maioritariamente o fenótipo opaco (n=8/13) (Weiser *et al.*, 2001). Embora outros

fatores bacterianos possam certamente afectar o potencial invasivo, a predisposição destes serótipos para o fenótipo opaco pode ajudar a explicar a sua epidemiologia no Homem.

No estudo realizado por Brueggemann *et al.* (2003), a prevalência de cada serótipo ou clone em casos de infecção invasiva foi comparada com a sua prevalência em casos de colonização, de modo a determinar o seu potencial invasivo. Verificou-se que o serótipo 23F estava associado à colonização da nasofaringe (OR = 0,4). Contudo, nesse estudo mostrou-se também que clones, expressando o mesmo serótipo, têm diferentes capacidades para causar infecção invasiva, o que sugere que os determinantes de virulência específicos dos clones podem também ser importantes na determinação do potencial invasivo. Neste aspecto, é notável a diferença entre as linhagens genéticas identificadas no presente trabalho e por Brueggemann *et al.* (2003), o que indica que outras propriedades relacionadas com os clones podem ter influenciado os resultados de cada um dos estudos.

Por outro lado, o serótipo 3 foi mais frequentemente associado à colonização da nasofaringe embora não significativamente, enquanto que o serótipo 14 foi associado a um maior potencial invasivo embora seja frequentemente encontrado em estirpes associadas a colonização (Brueggemann *et al.*, 2003; Sandgren *et al.*, 2004). Apesar dos serótipos 3 e 14 terem sido dos mais frequentes na nossa colecção, englobando 35% das estirpes responsáveis por infecções invasivas analisadas, os dados sugerem que a capacidade destes serótipos causarem infecção deve ser atribuída a outras propriedades que não a preferência para o fenótipo opaco.

A utilidade do serótipo como marcador de características biológicas importantes dos pneumococos foi recentemente confirmada (Brueggemann *et al.*, 2003; Sandgren *et al.*, 2004; Hausdorff *et al.*, 2005; Sjostrom *et al.*, 2006). Se o serótipo é o determinante primário dessas características ou é apenas um marcador dum determinado contexto genético está ainda por esclarecer. Todavia, inúmeros estudos estabeleceram a importância de certos clones em vários aspectos da infecção pneumocócica (McGee *et al.*, 2001), o que indica que pode haver uma certa heterogeneidade do potencial invasivo dentro das diferentes linhagens de cada serótipo. Na nossa amostra, ainda que os clones com poucos representantes tenham evitado o estabelecimento de uma associação entre clones e fenótipos, não se pode excluir a possibilidade de essa associação existir. Contudo, esta deve ser improvável devido às múltiplas linhagens genéticas, representadas por vários tipos de sequência, que foram encontradas em cada serótipo.

Para o cálculo do OR, o fenótipo intermédio e mistura não foram considerados devido à sua relação ambígua com o fenótipo opaco e transparente. Contudo, o fenótipo intermédio foi expresso por uma fracção significativa das estirpes, 16,1% (n=49), o que sugere que este

fenótipo desempenha um papel relevante na infecção pneumocócica. Neste trabalho favorecemos a interpretação de que o fenótipo intermédio pode ser uma forma transitória dos variantes opacos, devido a uma menor produção do polissacárido capsular, na ausência duma pressão selectiva *in vitro*. Esta explicação é suportada pela observação de que o polissacárido capsular diminui após sub culturas sucessivas no laboratório e pelo facto da produção capsular ser fortemente afectada por alterações na disponibilidade em oxigénio apenas nos variantes opacos (Weiser *et al.*, 2001). Estudos futuros terão que clarificar a relação entre o fenótipo intermédio e os fenótipos transparente e opaco.

É mais difícil compreender o papel da mistura de fenótipos na infecção pneumocócica. É possível considerar que uma mistura de fenótipos reflecte um período de selecção de um dos fenótipos no hospedeiro durante a transição da fase de colonização para o estabelecimento da infecção. Isto poderia explicar porque é que a mistura de fenótipos foi detectada em apenas 5,9% (n=18) das estirpes responsáveis por infecções invasivas analisadas, e porque é que a frequência de transição para uma mistura de fenótipos foi sempre rara, qualquer que fosse o fenótipo inicial.

É interessante notar que os serótipos 8 e 14 foram os que apresentaram um maior número de estirpes com misturas de fenótipos (Quadro 4). A presença de estirpes com misturas de fenótipos pode ser vantajoso considerando que estes dois serótipos são frequentemente isolados da nasofaringe de crianças saudáveis (Brueggemann *et al.*, 2003) mas também são prevalentes em casos de infecção invasiva em Portugal.

Pode-se concluir que na colecção de 304 estirpes associadas a infecção invasiva, representando um vasto contexto genético e 10 serótipos, o fenótipo opaco foi duas vezes mais frequente do que o transparente, suportando um papel da variação de fase na infecção pneumocócica no homem. Demonstrou-se que a variação de fase não é uma propriedade restrita a apenas alguns serótipos ou clones, mas sim uma propriedade geral dos pneumococos. Foi também observada uma associação entre certos serótipos e a opacidade. Esta associação pode explicar, em parte, as diferenças epidemiológicas observadas entre os serótipos de *S. pneumoniae* e, em particular, a preferência de certos serótipos para colonizar assintomaticamente a nasofaringe e de outros, raramente associados com a colonização, para causarem infecção invasiva.

De modo a estabelecer qual o papel da variação de fase num modelo murino injectaram-se jovens ratinhos com culturas de variantes opacos e transparentes, isolados de estirpes dos serótipos 1 e 8, e variantes opacos, transparentes e intermédios, isolados duma estirpe do serótipo 4. A experiência decorreu durante 21 dias, nos quais 17/18 ratinhos infectados com os variantes

opacos e 2/3 infectados com o variante intermédio morreram (Figura 5). Apenas 1/18 ratinhos infectados com os variantes transparentes morreram. Os resultados mostraram que os variantes opacos e intermédios eram mais patogénicos para o ratinho do que os transparentes e confirmaram a correcta identificação dos fenótipos de opacidade tal como descritos por Weiser *et al.* (1994).

Estas observações estão de acordo com os estudos de virulência em ratinhos descritos por Kim e Weiser (1998). Quando inocularam variantes opacos e transparentes ( $10^7$  ufc), isolados da estirpe D39 e de estirpes dos serótipos 6A e 18C, em ratinhos BALB/c com 6 a 12 semanas, observaram uma maior mortalidade nos ratinhos infectados com os variantes opacos. Por outro lado, o variante intermédio do serótipo 6A mostrou ser avirulento mas um revertente opaco deste variante era virulento, o que evidenciou as diferenças entre os dois variantes.

Na experiência conduzida no presente trabalho esperava-se que os variantes opacos provocassem uma morte mais rápida dos ratinhos do que os variantes transparentes, tal como descrito por Kim e Weiser (1998). De facto verificou-se que nos serótipos 1 e 8 nenhum dos ratinhos inoculados com variantes transparentes ( $10^2$  e  $10^7$  ufc) morreu e no serótipo 4 apenas um dos ratinhos inoculados com variantes transparentes ( $10^7$  ufc) morreu.

No serótipo 4 não houve diferenças óbvias entre os tempos de sobrevivência dos ratinhos inoculados com os variantes opacos e intermédios, o que pode ter-se devido a uma maior agressividade desta estirpe ou deste serótipo neste modelo animal. Porém, relativamente ao fenótipo opaco, foi possível detectar que a maioria dos ratinhos que morriam mais tarde tinham sido inoculados com a estirpe do serótipo 1. Embora os três serótipos testados tenham sido descritos como virulentos para os ratinhos (Briles *et al.*, 1992; Saeland *et al.*, 2000), os resultados sugerem que os serótipos 4 e 8 foram mais agressivos do que o serótipo 1.

O aumento do inóculo do variante transparente do serótipo 8 para  $10^9$  ufc resultou na morte de 2/3 ratinhos testados (Figura 5), o que indica que a concentração do inóculo tem um peso importante neste modelo animal. Comparando as duas concentrações testadas em todos os variantes opacos e transparentes,  $10^2$  e  $10^7$  ufc ( $10^3$  e  $10^8$  no variante transparente do serótipo 1), observou-se que 10 dos 18 ratinhos, aos quais foi inoculada a concentração mais elevada, e apenas 8 dos 18 ratinhos, aos quais foi inoculada a concentração mais baixa, morreram. Como esperado, houve uma tendência para as culturas mais concentradas causarem mais rapidamente a morte dos ratinhos.

Os pneumococos que foram recuperados do sangue dos ratinhos que morreram, após a inoculação de colónias opacas, transparentes ou intermédias, apresentavam o fenótipo opaco, o que está em conformidade com o observado por Kim e Weiser (1998). Os autores verificaram

que os pneumococos recuperados dos ratinhos que morreram após a inoculação de colónias opacas tinham o fenótipo opaco, bem como os pneumococos recuperados dos ratinhos que morreram após a inoculação de colónias transparentes.

No presente estudo interessava estabelecer diferenças na variação de fase entre estirpes de diferentes origens. Verificou-se que nas estirpes causadoras de infecções invasivas e não invasivas o fenótipo mais frequente foi o opaco e a frequência de cada fenótipo foi semelhante, à excepção da mistura de fenótipos, que foi mais de duas vezes superior nas estirpes não invasivas. Os resultados sugerem que a opacidade deve ser um factor importante na infecção pneumocócica, quer seja quando a bactéria se multiplica nos fluidos geralmente estéreis, como o sangue ou o LCR, quer seja quando causa infecções noutros locais. É de ressaltar que nestes resultados não se está a comparar a mesma estirpe isolada de locais diferentes no mesmo hospedeiro, por exemplo, numa secreção brônquica e do sangue, mas sim estirpes diferentes isoladas de locais diferentes e de diferentes hospedeiros.

Por outro lado, os serótipos prevalentes nas estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas, nem sempre apresentaram a mesma distribuição fenotípica, indicando que a regulação da opacidade deve variar de acordo com o serótipo. Um exemplo foi o serótipo 19A, predominantemente opaco nas estirpes responsáveis por infecções invasivas (64,7%) (Quadro 4), mas predominantemente intermédio nas estirpes responsáveis por infecções não invasivas (66,7%) (Quadro 5). Os dados apontam para que a variação de fase seja um factor importante durante a infecção nas estirpes que expressam o serótipo 19A.

Poder-se-ia pensar que as estirpes do serótipo 19A, por estarem frequentemente no estado opaco tanto enquanto comensais como quando causam infecções invasivas, residissem pouco tempo na nasofaringe, transitando rapidamente para a forma invasiva, não precisando para isso de alterar o fenótipo. Porém, este serótipo tem sido frequentemente encontrado na nasofaringe de crianças saudáveis (Brueggemann *et al.*, 2003; Sandgren *et al.*, 2004), o que não favorece esta suposição.

Um aspecto intrigante foi haver cerca do dobro da frequência de misturas de fenótipos nas estirpes responsáveis por infecções não invasivas (12,8%), em relação às causadoras de infecções invasivas (5,9%). Uma possível explicação é a que, nas estirpes responsáveis por infecções não invasivas, potencialmente a transitarem do estado comensal para o invasivo, os fenótipos estão ainda a sofrer uma selecção adaptativa ao novo meio, o que pode legitimar a ausência de um fenótipo dominante.

Uma das propriedades recentemente associadas aos variantes transparentes de *S. pneumoniae* foi a maior actividade da enzima de superfície  $\beta$ -galactosidase numa estirpe do serótipo 6A (King *et al.*, 2006). Este estudo foi realizado na estirpe D39 e numa estirpe do serótipo 6A e do 6B, tendo-se verificado que apenas o variante transparente da estirpe do serótipo 6A tinha maior actividade da enzima e que o mutante no gene *bgaA* da estirpe D39 quase não tinha esta actividade. O variante transparente da estirpe do serótipo 6A apresentou uma actividade de 35 unidades de Miller e o opaco cerca de 9, enquanto que a estirpe D39 apresentou cerca de 5 unidades de Miller e o mutante *bgaA* cerca de 1. Foi confirmado que os produtos dos genes testados eram os únicos que contribuíam significativamente para a actividade enzimática nas condições do ensaio.

Na nossa colecção isolaram-se variantes transparentes e opacos de 13 estirpes e neles se mediu a actividade desta enzima. Na maioria das estirpes (n=8), os variantes transparentes tinham uma maior actividade da enzima (Figura 6). A actividade da enzima nos variantes transparentes variou de 1,5 a 42,5 unidades de Miller, enquanto que nos variantes opacos variou de 1,5 a 36,3 unidades de Miller. Embora o número de estirpes analisadas tenha sido reduzido foi possível observar uma relação directa entre a transparência e a maior actividade da enzima. O facto de, nem todos os variantes transparentes produzirem mais  $\beta$ -galactosidase, observado em cinco estirpes do serótipo 1, 9V (2 estirpes), 7F e 19A, está em concordância com o previamente descrito por King *et al.* (2006) numa estirpe do serótipo 6B. Foi ainda possível verificar que no mesmo tipo capsular o grau desta actividade enzimática variou, que a actividade da enzima também variou entre diferentes serótipos e que a amplitude de distribuição dos valores da actividade da  $\beta$ -galactosidase foi semelhante nos dois variantes. Os resultados destas experiências não permitem estabelecer uma relação universal entre o fenótipo de uma dada estirpe e a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase.

Nas estirpes D39 e R6 houve uma maior actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase nos variantes transparentes e na TIGR4 nos variantes opacos. A diferença na actividade da enzima entre estes variantes foi o mais baixo de entre todas as estirpes analisadas, até 3 unidades de Miller, enquanto que nas restantes estirpes variou entre 3,3 e 26,2 unidades de Miller. O facto destas estirpes terem já inúmeras passagens em laboratório pode ter influenciado a produção de  $\beta$ -galactosidase levando à sua diminuição. Talvez esta observação possa explicar porque é que as colónias opacas e transparentes isoladas destas estirpes não eram fenotipicamente muito distintas.

Quanto à actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase testaram-se ainda 63 estirpes, das quais 36 eram responsáveis por infecções invasivas e 27 por infecções não invasivas, expressando os dez serótipos que foram mais prevalentes nas infecções invasivas. Verificou-se que a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase nunca foi maior nos variantes transparentes. Nestes variantes observou-se uma actividade de  $25,9 \pm 8,3$  unidades de Miller, na totalidade das estirpes (Figura 7c). No entanto, as diferenças de actividade da enzima em estirpes com diferentes fenótipos de opacidade e responsáveis por diferentes tipos de infecção não foram muito significativas (Figura 7 a e b). Estes resultados podem ter sido comprometidos pelo facto de não se estar a avaliar a actividade enzimática de variantes provenientes de colónias isoladas. Apesar das estirpes terem sido classificadas em cada fenótipo, podem ter até 30% de colónias com um fenótipo diferente, e este poderá ter influenciado o valor da actividade da enzima. O facto de, nas estirpes responsáveis por infecções invasivas e não invasivas, nem todos os fenótipos terem tido representantes em cada serótipo, pode também ter influenciado os resultados, por exemplo, o serótipo 1 não foi expresso por nenhuma estirpe responsável por uma infecção não invasiva.

É de notar que nas estirpes responsáveis por infecções não invasivas a actividade da enzima foi inferior em todos os fenótipos, particularmente no transparente ( $22,2 \pm 8,1$  unidades de Miller), intermédio ( $23,0 \pm 7,9$ ) e mistura ( $24,5 \pm 10,4$ ) (Figura 7b), e apresentou os valores medidos mais baixos em estirpes dos serótipos 19A (11,7 unidades de Miller) e 7F (11,6). A menor actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase pode ser uma característica das estirpes responsáveis por infecções não invasivas nas quais, por razões desconhecidas, a actividade desta enzima não parece ser tão importante como nas estirpes causadoras de infecções invasivas.

Apesar das tendências descritas nenhuma das diferenças foi inteiramente consistente nem as diferenças entre os grupos foram estatisticamente significativas, o que sugere que a relação entre a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase e o fenótipo de opacidade é mais complexo do que o sugerido pelo elegante trabalho de King *et al.* (2006).

Algumas experiências adicionais sobre a variação de fase em *S. pneumoniae*, não incluídas na secção dos materiais, métodos e resultados, poderão contribuir para a compreensão do fenómeno e serão aqui descritas.

Numa das experiências pretendia-se confirmar o papel já estabelecido da autolisina na variação de fase (Weiser *et al.*, 1996). As estirpes R6, R6 *LytA*<sup>-</sup>, Svmc28, Svmc28 *LytA*<sup>-</sup> e *LytP*<sup>-</sup> (a enzima lítica de um fago que lisogeniza a estirpe Svmc28) foram caracterizadas quanto ao fenótipo dominante. Verificou-se que a estirpe R6, bem como o mutante deficiente na produção de autolisina A, eram transparentes, e que a estirpe Svmc28 e os mutantes deficientes tanto na

autolisina A como na lisina fágica P eram opacos. Ou seja, a presença ou ausência de autolisina pneumocócica ou lisina fágica aparentemente não condicionou o fenótipo da estirpe. Estes resultados estão em concordância com as observações de Weiser *et al.* (1996), em como as diferenças na expressão de LytA não são totalmente responsáveis pelas diferenças do fenótipo de opacidade, havendo outros factores responsáveis pela variação de fase.

Noutra experiência, para verificar se a proporção de ácidos gordos insaturados nos fosfolípidos membranares variava com o fenótipo (Aricha *et al.*, 2004), os variantes transparentes e opacos, de 14 estirpes expressando os serótipos 1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 13, 14, 19A e 23F e a estirpe D39, foram analisados por cromatografia gás líquido no INFARMED. A metodologia aplicada na cromatografia foi realizada pela Dr.<sup>a</sup> Mónica Miranda que gentilmente cedeu os resultados. Os resultados mostraram que, em apenas 8 das 15 estirpes estudadas, houve uma maior proporção de ácidos gordos insaturados do que saturados nos variantes transparentes, tal como previamente observado por Aricha *et al.* (2004). Uma destas estirpes era a D39 e as restantes expressavam o serótipo 3 (2 estirpes), 7F, 8, 9V, 14 e 23F. A maior diferença na razão de ácidos gordos insaturados pelos saturados deu-se na estirpe do serótipo 7F, no qual a proporção foi de 0,49, no variante transparente, e 0,29, no opaco. Na totalidade das estirpes, esta razão variou de 0,23 (serótipo 9V) a 0,62 (3), nos variantes transparentes, e de 0,28 (7F) a 0,62 (13), nos variantes opacos. Apenas numa das duas estirpes dos serótipos 7F e 9V, a proporção de ácidos gordos insaturados foi maior nos variantes transparentes.

Os ácidos gordos mais comuns foram: 10:0, 12:0, 14:0, 13:0, 2OH, 15:0, 16:1; 16:1 w9c; 16:1 w7c/16:1 w6c; 16:1 w5c; 16:00; 17:1 iso w5c; 17:0; 18:1 w9c; 18:1 w7c; 18:1 w5c; 18:00; 19:1 iso I; 16:1 w6c/16:1 w7c. Houve 9 ácidos gordos que apareceram apenas uma vez, maioritariamente em variantes transparentes de diferentes serótipos, o que demonstra uma tendência para a formação de ácidos menos comuns durante a adaptação homeoviscosa, tal como definida por Sinensky *et al.* (1974), nos variantes transparentes.

Mais uma vez a composição de ácidos gordos membranares não se correlacionou completamente com os fenótipos das estirpes, o que sugere uma relação mais complexa entre estas propriedades do que a anteriormente sugerida por Aricha *et al.* (2004). É curioso que 5/8 variantes transparentes, que apresentaram maior proporção de ácidos gordos insaturados, também exibiram uma maior actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase do que os variantes opacos. Isto sugere a existência duma relação entre a insaturação dos ácidos gordos na membrana fosfolipídica e a actividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Uma destas estirpes era a D39, duas expressavam o serótipo 3, e as outras os serótipos 8 e 14.

De modo a reunir mais características relacionadas com os variantes de opacidade estudou-se o potencial zeta. O potencial zeta é o potencial eléctrico da região de interface entre a superfície da bactéria e o meio aquoso, e pode ser medido pela mobilidade electroforética da célula num campo eléctrico (Saito *et al.*, 1997). As bactérias são organismos unicelulares sem membranas intracelulares. Por isso, a interface formada entre o envelope externo da célula e o meio extracelular tem um papel importante na sua fisiologia. Os componentes da ultra-estrutura da superfície são constituídos por macro moléculas com grupos livres de carboxilato, fosfato e amino e que são ionizados em função do pH do meio, conferindo carga electrostática à periferia da célula. O peptidoglicano da parede celular de bactérias Gram positivas influencia a electronegatividade da superfície devido aos grupos fosforil localizados no ácido teicóico, bem como nos grupos carboxilato não substituídos (Wilson *et al.*, 2001).

Estudos desenvolvidos em estirpes capsuladas e não capsuladas de *Pasteurella multocida* (Wilson *et al.*, 2001) concluíram que a cápsula confere duas vezes mais electronegatividade às estirpes, evitando a associação com as células fagocitárias. Em estirpes patogénicas e comensais de *Enterococcus faecalis* (van Merode *et al.*, 2006) verificou-se haver uma maior heterogeneidade na distribuição do potencial zeta nas estirpes patogénicas do que nas comensais. Com base nestas informações esperava-se, no presente estudo, que os variantes transparentes se distinguíssem dos opacos pela sua carga superficial, e isso foi, até agora, verificado.

O protocolo adoptado foi o de van Merode *et al.* (2006). As estirpes cresceram até à concentração final de  $10^7$  ufc/ml. A cultura foi lavada duas vezes com 10mM de tampão fosfato pH 7. A distribuição do potencial zeta foi medida no mesmo tampão a pH 2, 4, 6 e 8 usando o aparelho Zetasizer nano MRK751-01 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Foram realizadas 25 leituras com 30 corridas cada, de modo a reduzir a variabilidade das medidas.

Das 11 estirpes até agora analisadas, expressando os serótipos 1 (2 estirpes), 3, 7F (2), 9V (2), 12B, 13, 14 e 23F, verificou-se que o potencial zeta aumentou com a acidez do tampão. Todos os variantes transparentes tiveram a pH 2 valores do potencial zeta significativamente mais elevados do que os opacos. Os valores do potencial zeta variaram entre 18,7 mV e 28,4 mV, nos variantes transparentes e, entre -3,81 mV e 19,4 mV, nos variantes opacos. Isto significa que a carga superficial existente nos variantes transparentes é mais positiva do que nos variantes opacos, o que poderá ser consequência de uma maior quantidade de ácido teicóico. O ácido teicóico do pneumococo está ligado à fosforilcolina que tem uma amina quartenária carregada positivamente orientada à superfície (Fischer *et al.*, 2000; Gould e Weiser, 2002), esta carga

positiva pode favorecer a adesão à superfície das células do hospedeiro carregadas negativamente.

Porém, o valor do potencial zeta nos variantes transparentes decresceu consecutivamente até se tornar, a pH 8, inferior ao observado nos variantes opacos, traduzindo uma maior constância dos valores do potencial zeta nos variantes opacos. Isto aconteceu em todas as estirpes excepto nas do serótipo 1 e numa estirpe do serótipo 19A.

O facto dos variantes opacos dos serótipos 1 e 19A terem, independentemente do pH, um valor do potencial zeta inferior ao dos variantes transparentes, pode ser uma propriedade destes serótipos que lhes pode conferir maior potencial invasivo. A maior carga negativa é provavelmente conferida pela presença do polissacárido capsular, facilitando uma possível evasão à fagocitose. Serão necessárias mais experiências para esclarecer a capacidade de medições do potencial zeta para discriminar entre os variantes opacos e transparentes e qual a sua sensibilidade aos diferentes polissacáridos capsulares.

Para cumprir o segundo objectivo, a epidemiologia da população invasiva de *S. pneumoniae* foi estudada através da aplicação das técnicas de electroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e “Multilocus Sequence Typing” (MLST), após a caracterização do serótipo e da resistência aos antimicrobianos nas estirpes isoladas em 2004 e 2005.

#### 1. Distribuição dos serótipos.

Do grupo de 10 serótipos mais frequentemente isolados de 1999 a 2002, os serótipos 1, 3, 14 e 19A tinham, nas estirpes isoladas de 2004 a 2005, uma ordem de frequência diferente (Quadro 7). Para além disto apareceram os serótipos 6A, 11A e 22F, substituindo os serótipos 9V, 12B e 23F. Na totalidade das estirpes surgiram, pela primeira vez, os serótipos 9L, 10B, 12F, 15A, 15C, 21, 24A, 34, 35C e 37, o que aponta para uma crescente heterogeneidade de polissacáridos capsulares não contemplados na vacina.

Vários estudos previram que a implementação da vacina conjugada levaria à substituição dos serótipos da vacina por outros tipos capsulares de *S. pneumoniae* (Sleeman *et al.*, 2001), devido à pressão selectiva exercida sobre os serótipos incluídos na vacina. Em estudos realizados recentemente nos EUA verificou-se já esta substituição (Pai *et al.*, 2005; 2005a; Beall *et al.*, 2006; Steenhoff *et al.*, 2006), que no entanto foi também acompanhada de um decréscimo dos casos de bacteriémia em 57% (Steenhoff *et al.*, 2006).

Para testar uma possível associação entre os serótipos e os anos de estudo (1999 a 2002) aplicou-se o teste do Qui-quadrado aos dez serótipos que foram mais frequentemente isolados nesse período (n=306). Os resultados indicaram que não houve diferenças substanciais na prevalência dos serótipos de 1999 a 2002 (P = 0,1). Quando se consideraram também as estirpes isoladas em 2003 (n=421) o teste mostrou haver um desvio associado a certos serótipos a partir desse ano (P = 0,04). Quando se consideraram também as estirpes isoladas de 2004 e 2005 (n=831) o desvio foi gradualmente maior (P = 0,03 e P =  $1,3 \times 10^{-5}$ , respectivamente). Estas observações são consistentes com uma população invasiva de *S. pneumoniae* em mudança em Portugal sobretudo a partir de 2003, provavelmente devido ao efeito da introdução da vacina 7-valente em Portugal em 2001. De 1999 a 2003 e a 2004 o serótipo com maior desvio foi o 9V e de 1999 a 2005 foram os serótipos 7F, 9V, 14 e 19A.

Observou-se, nos 7 anos de estudo, uma tendência para os serótipos 4, 14 e 23F, incluídos na vacina, diminuírem de frequência, compensada pela tendência para os serótipos 3, 7F e 19A aumentarem de frequência (Figura 12). Esta variação foi observada em todos os grupos etários, apesar de ter sido mais evidente em certos serótipos de acordo com a faixa etária, demonstrando que a vacina teve efeito nos serótipos responsáveis pela infecção na população vacinada e não vacinada.

Estes resultados estão em concordância com o observado em Espanha (Oteo *et al.*, 2004) e nos EUA (Beal *et al.*, 2006; Kiaw *et al.*, 2006; Poehling *et al.*, 2006), onde se verificou uma diminuição das infecções invasivas, causadas pelos serótipos incluídos na vacina 7-valente, após a introdução da vacina. Os autores Hammit *et al.* (2006) concluíram que a vacinação pediátrica resultou indirectamente na redução dos casos de infecção invasiva, causados por serótipos da vacina 7-valente, nos adultos não vacinados, nos EUA.

Uma das conclusões possíveis do presente trabalho é que a vacina 7-valente parece ter conferido protecção contra os serótipos 4, 14 e 23F, oferecendo uma protecção reduzida contra os serótipos 6B, 9V, 18C, 19F e contra o 19A (para o qual se poderia esperar alguma protecção cruzada). Estes resultados são preocupantes, uma vez que os serótipos 6B, 9V, 19F e 19A estão associados a resistência aos antimicrobianos. Por outro lado, é difícil perceber qual o efeito da vacina na protecção cruzada contra o serótipo 6A, porque este serótipo teve uma frequência variável, não apresentando uma tendência clara para crescer ou decrescer. Estes dados sugerem que os polissacáridos capsulares podem conferir diferentes níveis de protecção que se podem ou não estender a tipos capsulares serologicamente relacionados (Szu *et al.*, 1982).

Na opinião de Hanage *et al.* (2007), num futuro próximo, os serótipos incluídos na vacina deverão ser substituídos por clones de outros serótipos, cada vez mais resistentes, pondo em causa os potenciais benefícios da vacina 7-valente.

A potencial cobertura da vacina conjugada 7-valente em Portugal, de 1999 a 2002, em crianças com menos de 2 anos seria de 63,2%. Os valores efectivos serão menores, uma vez que não se espera que a vacina seja 100% eficaz (CDC, 2000). É interessante notar que a percentagem da cobertura da vacina não seria alterada se se considerassem as crianças com idade inferior a 6 anos. Isto é importante uma vez que é recomendada a vacinação a crianças com idade  $\leq 5$  anos que frequentem creches (CDC, 2000), e a maioria das crianças em Portugal nesta idade está nesta categoria. Neste período, a vacina 7-valente poderia prevenir 88,5% (23/26) e 85,7% (18/21) das infecções invasivas por *S. pneumoniae* resistentes à penicilina e multiresistentes, respectivamente, em crianças com menos de 2 anos.

A cobertura da vacina 7-valente era já nessa altura inferior à observada noutros países europeus, nos quais se registavam valores entre 70-80% (Sleeman *et al.*, 2001; Flamaing *et al.*, 2002; Konradsen e Kalsoft, 2002).

De 2004 a 2005, a potencial cobertura da vacina 7-valente seria de 28,6%, em crianças com menos de 2 anos (Figura 14), devido à diminuição da frequência dos serótipos incluídos na vacina 7-valente, sobretudo o 6B, 14 e 23F (Figura 8).

Neste período, a vacina 7-valente poderia prevenir apenas 45,5% (5/11) (Figura 16) e 33,3% (4/12) das infecções invasivas por *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, e resistentes a pelo menos um antimicrobiano (considerando a protecção cruzada ao serótipo 6A), respectivamente, em crianças com menos de 2 anos. Neste grupo etário, das 12 estirpes resistentes a pelo menos 1 antimicrobiano, 8 pertenciam ao serótipo 19A. De 1999 a 2002, no mesmo grupo, das 26 estirpes resistentes a pelo menos 1 antimicrobiano, apenas 3 expressavam este serótipo. Isto demonstra ter havido um aumento da resistência associada ao serótipo 19A, que se sobrepôs à dominância anterior de estirpes do serótipo 14.

A prevenção da infecção pneumocócica em crianças em Portugal pode beneficiar da introdução de vacinas conjugadas com maior número de valências. De 1999 a 2002, a cobertura da vacina 9-valente, em crianças com idade  $< 6$  anos, seria de 75,6%, e da vacina 11-valente, de 82,9%. Estes valores estavam em contraste com os observados noutros países europeus, onde os ganhos da cobertura das vacinas com maior valência não foram tão acentuados (Flamaing *et al.*, 2002; Konradsen e Kalsoft, 2002).

De 2004 a 2005, a potencial cobertura da vacina 9-valente, em crianças com idade  $< 6$  anos, seria de 48,6%, e da vacina 11-valente, de 60,0%, valores inferiores aos observados nos anos

anteriores. Isto significa que, o aumento da frequência do serótipo 1 e 7F neste grupo etário (Quadro 7) não compensou a diminuição da frequência dos serótipos da vacina 7-valente. Nos restantes grupos etários, e na totalidade das estirpes, também se observou uma diminuição da cobertura das vacinas 9 e 11-valente, entre 2004 e 2005. No grupo de indivíduos com idade compreendida entre 6 e 60 anos e no grupo etário  $\geq 60$  anos, a diminuição dos serótipos da vacina 7-valente também não foi suficientemente compensada pelo aumento da frequência dos serótipos 3 e 7F (Figura 10 e 11).

Resumindo, uma das consequências da introdução da vacina conjugada 7-valente foi a diminuição da sua potencial cobertura, para valores abaixo dos 30%, em todos os grupos etários, e a diminuição, em toda a população, da potencial cobertura de outras vacinas conjugadas. As diferenças mais marcantes ocorreram em crianças até aos 6 anos de idade, devido à diminuição da frequência dos serótipos 6B, 9V, 14 e 23F (Figura 8 e 9, Quadro 7) incluídos na vacina heptavalente.

No presente estudo, a vacina 7-valente parece ter tido um efeito de imunidade de grupo em toda a população contra as estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas dos serótipos incluídos na sua formulação. Contudo, há estudos que indicam que a imunização não diminui os casos de otite média (infecção não invasiva), embora cerca de 70% das estirpes causadoras desta infecção, fossem potencialmente cobertas pela vacina. De acordo com Bogaert *et al.* (2005), a imunização não diminuiu a frequência de colonização da nasofaringe e infecção pelos serótipos incluídos na vacina, em crianças Holandesas, com idade compreendida entre 1 e 7 anos de idade, com otite média recorrente. Resultados similares foram observados nos EUA, em crianças com otite média aguda causada por estirpes resistentes à penicilina (McEllistrem *et al.*, 2005). Em ambos os estudos, não houve alterações significativas na composição clonal desde a introdução da vacina, tendo havido no entanto um aumento dos serogrupos 11, 15 e 23B nas estirpes causadoras de otite média (Bogaert *et al.*, 2005).

Recentemente foi efectuado em Portugal um estudo para avaliar o impacto da vacina 7-valente, no período entre 2001 e 2003, na colonização da nasofaringe, em crianças saudáveis que frequentam creches (6 meses a 6 anos de idade), por estirpes resistentes a antimicrobianos (Frazão *et al.*, 2005). Verificou-se, comparando a população vacinada com a não vacinada, que a introdução da vacina não criou diferenças na frequência de colonização por *S. pneumoniae* (68%), nem na frequência de colonização por estirpes resistentes aos antimicrobianos (38%), ou não susceptíveis à penicilina (24%), entre os dois grupos. Por outro lado, houve uma diminuição da frequência de colonização por estirpes resistentes aos antimicrobianos que expressavam os

serótipos incluídos na vacina, e um aumento da frequência por estirpes que expressavam serótipos pouco comuns, 6A, 10A, 15A, 15C, 19A, 23A, 33F, em crianças vacinadas (Frazão *et al.*, 2005). Estes resultados estão em conformidade com os observados nos EUA, onde se verificou um decréscimo da frequência de colonização da nasofaringe e de casos de infecção invasiva, em crianças dos 0 aos 60 dias, por serótipos incluídos na vacina (Poehling *et al.*, 2006), e um aumento dum serótipo pouco comum, 35B, em estirpes de colonização (Hanage *et al.*, 2007).

No estudo português, no grupo de crianças não vacinadas, os serótipos incluídos na vacina e os não incluídos na vacina não mostraram uma tendência para decrescerem ou para aumentarem de frequência, durante o período de estudo. O serótipo 19A foi o serótipo relacionado com a vacina mais frequentemente isolado (Frazão *et al.*, 2005).

Em relação à potencial cobertura da vacina 23-valente, esta foi elevada nos dois períodos de estudo, 80,7% (1999 a 2002) e 85,7% (2004 a 2005), na totalidade das estirpes (Figura 14). Frequências elevadas foram também observadas entre os indivíduos  $\geq 60$  anos e em todos os grupos etários considerados, provavelmente, devido ao elevado número de serótipos incluídos nesta vacina. Estes resultados estão em concordância com o que se passa no resto da Europa, como em Espanha, onde a vacina 23-valente fez diminuir a incidência de infecção invasiva em adultos com idade superior ou igual a 65 anos (Domínguez *et al.*, 2005; Vila-Córcoles *et al.*, 2006).

A eficácia desta vacina na prevenção da infecção pneumocócica parece estar restrita, segundo alguns autores, às manifestações bacteriémicas (Jackson *et al.*, 2003). Contudo, outros estudos comprovaram que a vacina polissacarídica faz diminuir a incidência de pneumonia (com ou sem bacteriemia) em idosos (Vila-Córcoles *et al.*, 2006). À parte destas opiniões contraditórias, são notórios os benefícios da vacina na população alvo e, por isso, os critérios de vacinação foram reavaliados. Segundo Greene *et al.* (2006), todos os indivíduos a partir dos 50 anos de idade devem ser vacinados. Os grupos de risco devem incluir os que fumam ou que fumaram, os de raça negra e os asmáticos.

## 2. Resistência aos antimicrobianos.

Uma das questões levantadas durante a monitorização da epidemiologia de *S. pneumoniae* em Portugal foi se, o uso da vacina conjugada levaria a uma redução da resistência global, devido à pressão selectiva sobre os clones que expressam os serótipos da vacina, ou se, a transformação capsular permitiria a persistência desses clones.

Em relação ao primeiro ponto, verificou-se que a alteração na prevalência dos serótipos não fez reduzir a resistência global aos antimicrobianos (Figura 15). De facto, o somatório das estirpes resistentes a qualquer um dos 7 antimicrobianos foi de 72% (338/465), entre 1999 e 2002, e de 78% (485/617), entre 2004 e 2005. Houve sim uma tendência de aumento em alguns antimicrobianos e de redução noutros.

Verificou-se que o único antimicrobiano cuja resistência apresentou uma tendência para diminuir, de 1999 a 2005, foi a penicilina e os que apresentaram uma tendência para aumentar foram a eritromicina, clindamicina e a tetraciclina (Figura 15). É difícil determinar o ano em que se começaram a evidenciar estas tendências, mas foram claras certas mudanças no ano de 2003, em todos os grupos etários. A resistência ao cloranfenicol também diminuiu desde 2003, embora esta observação não seja tão evidente, sobretudo no grupo de crianças com idade < 6 anos.

Relativamente à resistência à penicilina o valor observado, de 1999 a 2002, foi de 23,0%, na totalidade das estirpes, e de 43,9%, em crianças com idade < 6 anos, valores superiores aos encontrados entre 2004 e 2005, 17,5% e 30%, respectivamente (Quadro 8). No grupo etário < 6 anos verificou-se uma ligeira redução da resistência intermédia acompanhada de um aumento da resistência elevada, de 11,1% para 19,0%. No grupo  $\geq 6$  anos e na totalidade das estirpes houve sobretudo um decréscimo da resistência elevada à penicilina, de 4,7% (1999 a 2002) para valores de 1,5% e 1,9% (2004 a 2005), respectivamente (Quadro 11).

A nível da Europa mediterrânica, Portugal foi e continua a ser um dos países com menor resistência à penicilina, quer na totalidade das estirpes, quer nas crianças. A resistência à penicilina foi inferior à encontrada na Grécia, em estirpes causadoras de infecções invasivas isoladas de crianças com idade  $\leq 14$  anos, de 2001 a 2004 (44,6%) (Paraskakis *et al.*, 2006), e em França, em estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas de crianças com idade inferior a 16 anos, entre 2000 a 2002 (45,8%) (Decousser *et al.*, 2004). Mas foi superior à frequência moderada registada em Itália (10 a 12%), em estirpes isoladas entre 2000 a 2002 (Gherardi *et al.*, 2007). Em Espanha houve, tal como em Portugal, uma diminuição da resistência à penicilina devido, possivelmente, à introdução da vacina 7-valente nesse país em 2001 e à diminuição do consumo de antimicrobianos (Oteo *et al.*, 2004). Em crianças do grupo pré-escolar, a resistência à penicilina diminuiu de 49% (1999-2001) para 42% (2002-2004) (Calbo *et al.*, 2006) e também decresceu na população em geral (Oteo *et al.*, 2004). Em Itália, possivelmente devido ao uso limitado da vacina heptavalente, entre 2001 a 2003, a epidemiologia pneumocócica reflecte uma situação pré-vacina (Gherardi *et al.*, 2007).

Nos EUA houve uma diminuição na frequência de estirpes causadoras de infecções invasivas resistentes à penicilina (de 6,3 para 2,7 casos por 100.000 pessoas) e na frequência de estirpes

multiresistentes (de 4,1 para 1,7 casos por 100.000 pessoas), entre 1999 e 2004 (Kiaw *et al.*, 2006). Esta diminuição foi muito acentuada nas crianças vacinadas e também foi observada na população não vacinada. Segundo os autores, o decréscimo na resistência aos antimicrobianos deveu-se ao efeito da vacina heptavalente introduzida nos EUA em 2000. De acordo com Kiaw *et al.* (2006), a redução da resistência aos antimicrobianos nos adultos não estava relacionada com o uso da vacina 23-valente, o que sugere que a vacinação limitou a transmissão de estirpes resistentes, das crianças vacinadas para os adultos.

Nas estirpes de colonização, isoladas de crianças saudáveis vacinadas, que frequentam creches em Portugal, houve igualmente uma diminuição da não susceptibilidade à penicilina de 24% (2001) para 17%-19% (2002-2003), não observado no grupo de crianças não vacinadas, embora este decréscimo não tenha sido estatisticamente significativo (Frazão *et al.*, 2005). Os autores verificaram também que a resistência total aos antimicrobianos foi similar entre as crianças vacinadas e não vacinadas. Mas enquanto que nas crianças vacinadas a frequência de estirpes, resistentes aos antimicrobianos, que expressavam os serótipos da vacina, diminuiu de 81% para 5%, a frequência de estirpes, resistentes aos antimicrobianos, que expressavam os serótipos não incluídos na vacina, aumentou de 19% para 95%. No grupo de controlo não se observaram estas tendências.

Nos dois períodos de estudo do presente trabalho o número de estirpes isoladas do grupo < 6 meses de idade foi muito reduzida fazendo com que pequenas alterações no número de estirpes isoladas possam afectar desproporcionadamente a proporção de estirpes. Se não considerarmos este grupo etário, o grupo de crianças em idade pré-escolar foi o que registou os valores mais elevados de resistência aos antimicrobianos (Quadro 10 e 11), nos dois períodos. Verificou-se igualmente que os serótipos associados à não susceptibilidade à penicilina, sobretudo o 14, 19A e 23F (Figura 16), estão associados a clones disseminados internacionalmente e que têm sido associados com a resistência a outros antimicrobianos, quer em estirpes responsáveis por infecções invasivas quer em estirpes associadas a colonização, do mesmo grupo etário, em Portugal (de Lencastre *et al.*, 1999).

Uma das possíveis razões para estes serótipos terem uma maior probabilidade de acumular determinantes de resistência é o de estarem mais tempo na nasofaringe das crianças (Sá-Leão *et al.*, 2000; Porat *et al.*, 2001), estando expostos a uma crescente pressão selectiva dos antibióticos (Schrag *et al.*, 2000). Outra possível razão é o facto dos diferentes tipos de cápsula poderem estar associados a diferentes mecanismos de controlo da competência para a transformação celular. Assim, se o mecanismo de transformação estiver activo, a célula pode adquirir genes de

resistência mas se, pelo contrário, a presença de uma determinada cápsula ou mecanismo regulador reduzir ou inibir a transformação, a célula não tem condições para adquirir estes mesmos genes (Schrag *et al.*, 2000). A permanência na nasofaringe também pode propiciar a troca de ADN com outras bactérias comensais e conseqüentemente a aquisição de genes exógenos que confirmam resistência a antimicrobianos.

Nas estirpes isoladas de 1999 a 2002 testaram-se novos antibióticos (novas fluoroquinolonas, linezolide, quinupristina-dalfopristina), as cefalosporinas de segunda e terceira geração, a ofloxacina e a vancomicina. Verificou-se que os novos antibióticos e a vancomicina eram os mais eficazes *in vitro* contra o *S. pneumoniae*, que as cefalosporinas mantinham uma actividade muito elevada em Portugal e que a resistência observada à ofloxacina era baixa. Estes antimicrobianos não foram testados nas estirpes isoladas de 2004 a 2005 porque não é expectável que eles deixem de exibir baixos valores de resistência, < 2% (valores observados na totalidade das estirpes, isoladas entre 1999 e 2002). Pretendeu-se comparar a evolução dos antimicrobianos mais usados na terapêutica anti-pneumocócica, bem como os que são importantes como marcadores de resistência, que exibiram resistências superiores a 2%.

Assim, de 2004 a 2005, a resistência aos antimicrobianos, na totalidade das estirpes, foi de 15,1% à eritromicina, 12,8% à clindamicina, 12,8% à tetraciclina, 17,0% ao cotrimoxazol e 3,2% ao cloranfenicol (Quadro 10). Os valores da resistência para alguns antimicrobianos foram superiores aos observados entre 1999 e 2002, nomeadamente para a eritromicina (9,4%), clindamicina (8,2%) e tetraciclina (7,1%). A resistência neste período foi ainda inferior ao determinado anteriormente no caso do cotrimoxazol (21,7%) e idêntica no caso do cloranfenicol (3,0%).

Verificou-se que a multiresistência em estirpes não susceptíveis à penicilina, recolhidas de crianças com idade inferior a 6 anos, aumentou de 25,0% (1999 a 2002) para 52,4%, e nas estirpes isoladas de crianças com idade superior a 6 anos, de 23,9% para 50,6% (Quadro 12 a 14) (nestes cálculos considerou-se apenas os antimicrobianos estudados nos dois períodos). Isto significa que, apesar da resistência à penicilina ter diminuído, está agora mais associada à resistência a outros antimicrobianos, nomeadamente à tetraciclina e macrólidos (associado a resistência à lincosamida). Estes resultados não são surpreendentes tendo em conta que, quer a resistência à tetraciclina quer a eritromicina, tornou-se mais frequente, em crianças e na totalidade das estirpes. Em crianças com idade inferior a 6 anos, a resistência à tetraciclina cresceu ligeiramente de 17,1% para 18,6%, e à eritromicina de 20,7% para 25,7%, entre os dois períodos (Quadro 10).

De 1999 a 2002, o serótipo mais frequentemente isolado nas estirpes com resistência à tetraciclina era o 6B e, em seguida, o 14 e 19A. Nas estirpes resistentes aos macrólidos era o 14, 6B e 19A, por ordem decrescente de prevalência. A partir de 2003, o serótipo mais frequentemente isolado nas estirpes com resistência à tetraciclina e aos macrólidos passou a ser o serótipo 19A e em seguida o 14 e 6B. Os dados indicam que a resistência à tetraciclina e aos macrólidos aumentou devido ao elevado incremento da frequência do serótipo 19A, e que nos macrólidos esse aumento também se deveu ao incremento da frequência do serótipo 15A, apenas nos indivíduos com mais de 6 anos de idade.

O aumento da frequência do serótipo 19A pode também explicar, em primeiro lugar, o facto do número de estirpes com o fenótipo MLS<sub>B</sub> e M, entre os dois períodos de estudo, não se ter alterado significativamente, mas a maior parte das estirpes ter passado a ser resistente à penicilina. Em segundo, a presença de estirpes resistentes à tetraciclina com o fenótipo M, que foram exclusivamente isoladas entre 2004 e 2005.

Num estudo efectuado em Portugal por Melo-Cristino *et al.* (2003), os autores sugerem que o aumento de estirpes resistentes aos macrólidos pode dever-se à pressão selectiva do uso excessivo deste antimicrobiano. Contudo, apesar de não se poder estimar o uso dos antimicrobianos no tratamento empírico das infecções invasivas, é pouco provável que a resistência à tetraciclina e aos macrólidos tenha aumentado devido ao seu maior uso. Porém, a não diminuição da prescrição dos antimicrobianos pode ter ajudado. O aumento da frequência dos serótipos 15A e 19A, já anteriormente associados à resistência à tetraciclina e aos macrólidos, deve ser o factor que mais contribuiu para o aumento da resistência a estes antimicrobianos, e pode ter sido um efeito pernicioso da introdução da vacina heptavalente em Portugal.

É de notar que Portugal continua a apresentar um dos valores de resistência aos macrólidos mais baixos na Europa mediterrânica, 15,1% na totalidade das estirpes, e de 25,7% em crianças com idade < 6 anos (Quadro 10). Na Grécia, a resistência à eritromicina foi de 44,6%, em estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas de crianças com idade ≤ 14, de 2001 a 2004 (Paraskakis *et al.*, 2006). Em Espanha, tal como em Portugal, houve uma diminuição da resistência aos macrólidos, em crianças do grupo pré-escolar, de 52,6% (1999-2001) para 35,9% (2002-2004) (Calbo *et al.*, 2006), e na população em geral, de 28,7% (2001) para 25,7% (2003) (Oteo *et al.*, 2004). Porém, em Itália a resistência à eritromicina aumentou de 28,8% (estirpes isoladas entre 1997 a 2000) para 34,9% (2001 a 2003) em estirpes causadoras de infecções invasivas (Pantosti *et al.*, 2003; Mónaco *et al.*, 2005).

As razões da situação mais favorável da resistência à penicilina e aos macrólidos em *S. pneumoniae* em Portugal, em relação a alguns países vizinhos, não são facilmente compreendidas. Os clones resistentes são continuamente importados para Portugal a partir dos países vizinhos (Vaz Pato *et al.*, 1995; de Lencastre *et al.*, 1999 e o presente trabalho). No entanto, o aparecimento de pneumococos com determinados padrões de resistência e a sua rápida disseminação podem estar relacionados com a utilização dos antibióticos (Melo-Cristino, 1999). Podemos assim admitir que diferenças na terapêutica empírica e no uso dos antibióticos, em relação a outros países, poderá estar relacionada com estes valores comparativamente mais baixos da resistência aos antimicrobianos que foram observados nos dois períodos de estudo.

### 3. Distribuição das linhagens genéticas.

A caracterização inicial dos clones de uma população de *S. pneumoniae* pode ser convenientemente efectuada por PFGE, que identifica grupos de estirpes geneticamente relacionadas dentro de uma população (McGee *et al.*, 2001), e por MLST, que permite estabelecer relações entre os clones identificados e comparar os resultados com os de outros estudos realizados em diferentes localizações geográficas (Feil *et al.*, 2000).

O presente trabalho teve como objectivo caracterizar a estrutura genética da população de pneumococos responsáveis por infecções invasivas, isolados em Portugal, antes do uso generalizado da vacina conjugada 7-valente e depois da sua introdução.

Os clones encontrados em infecção invasiva em Portugal foram comparados com os encontrados nos EUA antes da introdução da vacina (Gertz *et al.*, 2003) e com os encontrados pela primeira vez após a vacinação nesse país (Beall *et al.*, 2006).

Os resultados mostraram que apenas 14 STs eram comuns entre os dois estudos (Gertz *et al.*, 2003). Os STs de 14 serótipos distintos, incluíram os clones reconhecidos pela PMEN, como o Spain<sup>9V</sup>-3 (ST156), que contabilizou a maioria das estirpes do serótipo 9V, nos EUA, e dos serótipos 9V e 14, no presente estudo. Também em comum com as estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas nos EUA encontramos os ST191 e ST62, que englobaram a maioria das estirpes dos serótipos 7F e 11A, respectivamente, ST227 (serótipo 1), ST180 (serótipo 3), ST205 (4), ST460 e ST395 (6A), ST113 (18C), ST199 (19A), ST177 (19F), ST433 (22F), ST81 (23F) e ST100 (33F) (Quadro 15). Apenas 3 destes STs foram determinados por MLST após 1999-2002.

Somente 2 STs (ST53 e ST156) determinados em Portugal, de 1999 a 2002, e somente 1 (ST230), de 2003 a 2005, foram encontrados por Beall *et al.* (2006) após a introdução da vacina

nos EUA (Quadro 15), em representantes dos serótipos 8, 14 e 19A, respectivamente. É curioso que os representantes do clone Spain<sup>9V</sup>-3 foram encontrados nos serótipos 9V e 14 em Portugal, antes da vacinação, enquanto que nos EUA foram encontrados apenas no serótipo 9V, antes da vacinação (Gertz *et al.*, 2003), e também no serótipo 14, depois da vacinação (Beall *et al.*, 2006).

É também interessante notar que outros tipos de sequência encontrados na nossa coleção foram previamente reconhecidos como linhagens importantes na Europa, como o ST260 no serótipo 3 e o ST247 e ST1221 no serótipo 4. Estes STs não foram encontrados nos EUA (Gertz *et al.*, 2003, Beall *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que, apesar de haver linhagens comuns, o continente europeu e a América do Norte retêm populações pneumocócicas com propriedades específicas.

A maioria dos tipos de sequência foi encontrada em todos os anos entre 1999 e 2002, o que indica que não houve alterações importantes na diversidade global durante esse período. Estes dados são consistentes com a estimativa que mostrou que não houve diferenças substanciais na prevalência dos serótipos de 1999 a 2002, mas houve um desvio associado a certos serótipos, nomeadamente o 7F, 9V, 14 e 19A, mais acentuado a partir de 2003 (Figura 12). Houve uma tendência marcada de aumento da frequência dos serótipos 7F e 19A e de decréscimo do serótipo 14, entre 1999 e 2005 (Figura 12). Por outro lado, o desvio associado ao serótipo 9V deveu-se, essencialmente, a este serótipo ter oscilado entre muito frequente (próximo de 10%) e pouco frequente (próximo de 1%), de 1999 a 2002.

O uso alargado da vacina heptavalente tem o potencial para alterar a prevalência dos serótipos na população pneumocócica que causa infecção invasiva, como foi recentemente demonstrado nos EUA (Whitney *et al.*, 2003) e no presente estudo. Esta alteração na composição dos serótipos foi acompanhada por uma alteração na composição clonal em Portugal. Isto foi comprovado pela presença de novos grupos, definidos por PFGE, que apareceram exclusivamente entre 2003 e 2005 não incluindo nenhuma estirpe isolada de 1999 a 2002. Os grupos dos ST1653 (7C) e ST1707 (14) foram encontrados em 2003. Os grupos dos ST30 (1), ST205 (4), ST386 (6A), ST315 (6B), ST1201 (7C), ST1569 (9A), ST1654 (9L), ST2402 (11A), ST2108 (15A), ST1228 (15A), ST2400 (23A), ST2404 (23A) e ST717 (33A) foram encontrados entre 2004 e 2005. Apenas os grupos dos ST1369 (6A) e 414 (16F) foram encontrados exclusivamente entre 1999 e 2002, não incluindo nenhuma estirpe isolada de 2003 a 2005 (Quadro 15). Houve também um aumento na prevalência de clones já estabelecidos de serótipos não incluídos na vacina, como o 1, 3, 4, 9N, 12B, 17F, 19A, 24A/F e 33F, e de serótipos incluídos na vacina, 6B, 9V, 18C, 19F, 23F.

Segundo Beall *et al.* (2006), nos EUA não houve grandes alterações na composição clonal desde a introdução da vacina. Houve apenas um aumento na frequência de clones já estabelecidos de serótipos não incluídos na vacina, 33F e 38 (Beall *et al.*, 2006) e 23A (Pai *et al.*, 2005a).

É interessante notar que a diversidade global dentro dos serótipos variou significativamente, apesar de se observarem grandes grupos de estirpes relacionados. O serótipo que incluía quase exclusivamente uma linhagem (7F) (Anexo 2, figura 22m) contrastou com outros em que se formaram pequenos grupos não relacionados (ex: 6A e 6B Anexo 2, figura 22 h e b). Outros serótipos muito frequentes e notoriamente mais homogêneos foram o 9V, no qual mais de 90% das estirpes estavam incluídas num só grupo com uma semelhança superior a 80% (Anexo 2, figura 22c), e os serótipos 1 (Anexo 2, figura 22j) e 3 (Anexo 2, figura 22l), com mais de 100 estirpes cada, que estavam divididos em apenas 3 e 2 grupos, respectivamente.

Foi possível observar que a diversidade formada dentro de cada serótipo, com base nos perfis de PFGE, foi semelhante entre as nossas estirpes e as isoladas nos EUA (Beall *et al.*, 2006). A maior ou menor homogeneidade de certos serótipos, observada em diferentes países, apoia a seguinte hipótese: os serótipos mais homogêneos devem ter uma história evolutiva global mais recente do que os serótipos mais diversos que, dado ter originado há mais tempo, já divergiram significativamente. Na primeira categoria está o serótipo 7F, em oposição aos serótipos 6A e 6B.

Embora tenha sido previamente estabelecido que as estirpes susceptíveis aos antimicrobianos são mais diversas do que as resistentes à penicilina (Tomasz *et al.*, 1998), as propriedades intrínsecas de cada serótipo claramente têm um papel importante e independente da resistência, uma vez que os serótipos 6A e 7F incluíram maioritariamente estirpes susceptíveis a todos os antimicrobianos testados (Quadro 15). Para além disto, a diversidade encontrada nas estirpes do serótipo 1 foi menor do que a encontrada nas estirpes do serótipo 14, apesar do serótipo 14 ter incluído maioritariamente estirpes resistentes a pelo menos um antimicrobiano que incluía frequentemente a penicilina, e o 1 ser constituído maioritariamente por estirpes susceptíveis a todos os antimicrobianos.

Estas observações podem ser uma consequência directa da história evolutiva recente de certos serótipos, ou da selecção de um limitado número de clones em infecções invasivas em Portugal. Para se esclarecerem estas suposições torna-se necessário o conhecimento da população de pneumococos que coloniza a nasofaringe humana assintomaticamente. Embora tenham sido publicados vários estudos sobre os pneumococos que colonizam a nasofaringe de crianças que frequentam creches em Portugal, estes têm sido fundamentalmente restritos a estirpes resistentes aos antimicrobianos (Sá-Leão *et al.*, 2001; de Lencastre e Tomasz, 2002,

Frazão *et al.*, 2005), o que dificulta uma comparação directa entre as estirpes causadoras de infecções invasivas e as de colonização. Apesar destas limitações, é já claro que certos clones são partilhados pelas duas populações. De acordo com Frazão *et al.* (2005), a maioria das estirpes resistentes aos antimicrobianos, que expressavam os serótipos da vacina, isoladas de crianças saudáveis que frequentam creches em Portugal, pertenciam a clones internacionais, entre os quais o Spain<sup>23F</sup>-1, Spain<sup>9V</sup>-3, Englan<sup>14</sup>-9 e Colombia<sup>23F</sup>-26. As estirpes resistentes aos antimicrobianos, de serótipos não incluídos na vacina, pertenciam ao clone Sweden<sup>15A</sup>-25 e a outros clones não reconhecidos pela PMEN. É de apontar que não foram detectados representantes deste último clone no nosso estudo.

Alguns clones disseminados internacionalmente como o Colombia<sup>5</sup>-19, North Carolina<sup>6A</sup>-23, Poland<sup>6B</sup>-20, Greece<sup>6B</sup>-22, South Africa<sup>6B</sup>-8, Spain<sup>6B</sup>-2, Finland<sup>6B</sup>-12, Spain<sup>9V</sup>-3, England<sup>14</sup>-9, CSR<sup>19A</sup>-11, Portugal<sup>19F</sup>-21, Spain<sup>23F</sup>-1 e Colombia<sup>23F</sup>-26. ([www.sph.emory.edu/PMEN/pmen\\_clone\\_collection.html](http://www.sph.emory.edu/PMEN/pmen_clone_collection.html)) foram encontrados na nossa colecção de estirpes responsáveis por infecções invasivas isoladas entre 1999 e 2005. Os clones mais frequentes entre estas estirpes foram, por ordem de frequência, o Spain<sup>9V</sup>-3 (n=126), Colombia<sup>23F</sup>-26 (n=31) e o Spain<sup>23F</sup>-1 (n=21).

A maioria das estirpes não susceptíveis à penicilina estava relacionada com clones reconhecidos pela PMEN (McGee *et al.*, 2001). Das estirpes relacionadas com o clone Spain<sup>9V</sup>-3 (expressando os serótipos 9A, 9V e 14) e Colombia<sup>23F</sup>-26, cerca de 87% (137/157) eram não susceptíveis à penicilina. O clone Spain<sup>9V</sup>-3 e Colombia<sup>23F</sup>-26 incluíram 55,2% (137/248) do total das estirpes não susceptíveis à penicilina.

A dominância dos clones disseminados internacionalmente, incluindo os dois clones susceptíveis à penicilina, Greece<sup>6B</sup>-22 e England<sup>14</sup>-9, foi também observada em estirpes resistentes à eritromicina. Das estirpes pertencentes a estes clones 56% (14/25) eram resistentes à eritromicina (Anexo 2, figura 17 b e c).

Foram identificados outros grupos de grande dimensão que englobavam uma ampla proporção de estirpes expressando diferentes serótipos e que não estavam relacionados com os clones aceites pela PMEN (ex: a linhagem que incluiu o ST306 do serótipo 1 ou a linhagem do ST191 do serótipo 7F, Quadro 15). Contudo, a maior parte destas estirpes eram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, não cumprindo os critérios de selecção da PMEN (McGee *et al.*, 2001).

Em Itália e nos EUA houve também uma predominância dos clones Spain<sup>9V</sup>-3 e Spain<sup>23F</sup>-1. Segundo Marchese *et al.* (1998) em Itália, a maior parte das estirpes de *S. pneumoniae*

multiresistentes pertenciam a estes clones internacionais. Nos EUA, num estudo realizado por Roberts *et al.* (2001), de entre as 103 estirpes resistentes à penicilina, isoladas em 1999 de crianças e adultos com infecções invasivas e não invasivas, cerca de 50% pertenciam aos clones Spain<sup>23F</sup>-1 e Spain<sup>9V</sup>-3. Em oposição às observações de Gertz *et al.* (2003) e Beall *et al.* (2006), os clones Taiwan<sup>19F</sup>-14 e Taiwan<sup>23F</sup>-15, que agregaram porções significativas da população total daqueles serótipos nos EUA, estiveram ausentes no nosso estudo.

Comparando os dois períodos de estudo na nossa colecção, verificou-se que diminuiu significativamente a frequência de certos clones dominantes, como o Spain<sup>6B</sup>-2, Spain<sup>9V</sup>-3 (9V e 14), Colombia<sup>23F</sup>-26, Spain<sup>23F</sup>-1 (19A), e aumentar a frequência do clone England<sup>14</sup>-9, Portugal<sup>19F</sup>-21 e Spain<sup>23F</sup>-1. Nos serótipos 14 e 23F a diminuição da frequência dos clones Spain<sup>9V</sup>-3 e Colombia<sup>23F</sup>-26 foi mais acentuada do que o aumento da frequência dos clones England<sup>14</sup>-9 e Spain<sup>23F</sup>-1. Isto é compreensível face ao decréscimo do número de estirpes isoladas expressando estes serótipos. O facto de haver uma menor percentagem de estirpes associadas ao clone Spain<sup>23F</sup>-1 no serótipo 19A (Quadro 15), serótipo que claramente se tornou mais frequente, significa que este evoluiu no sentido da criação de novos grupos e o alargamento de outros grupos não associados a este clone.

Nos EUA observou-se igualmente um decréscimo da percentagem de estirpes relacionadas com os clones reconhecidos pela PMEN. Nos EUA, em 1999, 31% das estirpes estavam relacionadas com estes clones (Gertz *et al.*, 2003), em 2001 esse valor passou a ser de 28,2% e em 2002 de 26,5% (Beall *et al.*, 2006).

Nas estirpes de colonização isoladas no nosso país observou-se também um decréscimo dos representantes de clones reconhecidos pela PMEN. Nas estirpes resistentes aos antimicrobianos, isoladas de crianças saudáveis que frequentam creches em Portugal, a frequência dos representantes de clones da PMEN, diminuiu de 89% para 10%, entre o período pré-vacinação e pós-vacinação, em crianças imunizadas. Em crianças não imunizadas a frequência de estirpes que pertenciam a clones da PMEN, diminuiu menos acentuadamente, de 89% para 49% (Frazão *et al.*, 2005).

Uma das razões que pode ter levado ao aumento da prevalência do serótipo 19A na nossa colecção (Figura 12b), para além de terem surgido e expandido novas linhagens, foi a troca capsular com o serótipo da vacina 19F. O facto de pertencerem ao mesmo serogrupo, partilhando parte da estrutura química do polissacárido capsular, pode ter facilitado a transformação capsular. Contudo, o único exemplo foi o ST416 (Anexo 2, figura 22 f e i) encontrado em ambos os serótipos. A troca capsular pode também ter ocorrido entre o serótipo 19A e os serótipos 23A

e 23F, pois tinham os três representantes do clone Spain<sup>23F</sup>-1 (ST81). O serótipo 19A partilhou com o serogrupo 24A/F apenas a linhagem do ST230 (Quadro 15). Porém, o serogrupo 24A/F não foi muito frequente na nossa colecção.

Estes resultados indicam que, face ao uso da vacina conjugada, a transformação capsular não foi muito importante nas estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas, porque os clones que expressavam os serótipos da vacina e que eram maioritários não subsistiram.

Nas estirpes resistentes aos antimicrobianos, isoladas da nasofaringe de crianças saudáveis em Portugal, a troca capsular, entre os serótipos incluídos e não incluídos na vacina, não parece ter sido um mecanismo importante (Frazão *et al.*, 2005). Os autores explicam a manutenção da resistência global aos antimicrobianos por não se ter diminuído o uso de antibióticos, e a substituição dos serótipos ter-se-á devido ao efeito da pressão da vacina. Há indícios de que as estirpes resistentes aos antimicrobianos, expressando serótipos não incluídos na vacina, coexistem na nasofaringe com os outros pneumococos mais frequentes, o que pode explicar o aumento da sua prevalência (Frazão *et al.*, 2005).

Nos EUA, o serótipo 19A foi o serótipo que mais aumentou de frequência, possivelmente devido a troca capsular com os serótipos da vacina 6B e 19F, que estavam associados ao ST 199, pertencente a um dos complexos clonais mais importantes nos EUA (Beall *et al.*, 2006). Neste país, o aumento das estirpes dos serótipos 19A e 15B/C foi associado ao acréscimo do ST 199, o mais frequente entre as estirpes destes serótipos (Pai *et al.*, 2005; Beall *et al.*, 2006), mesmo antes da introdução da vacina (Gertz *et al.*, 2003).

Na nossa colecção, em contraste com o que foi encontrado nos EUA, as estirpes do serótipo 15A não estavam relacionadas com as dos serótipos 15B e 15C. Estes dois serótipos, segundo Pai *et al.* (2005), têm a capacidade de se converterem um no outro. Apesar do serótipo 15A, um dos mais recentes no nosso estudo, e o 19A não estarem relacionados nos perfis de PFGE e de MLST, todas as estirpes do serótipo 15A foram incluídas em duas linhagens unicamente encontradas no serogrupo 19. Estes dados podem indicar a existência dum ancestral comum aos dois serótipos, tal como sugerido por Beall *et al.* (2006).

Gertz *et al.* (2003) mostraram, usando os mesmos parâmetros de análise e métodos, que a maioria das estirpes que pertenciam a grupos com um coeficiente de similaridade superior a 80% partilhavam  $\geq 5$  alelos no perfil de MLST (Gertz *et al.*, 2003). Porém, estes autores também descreveram algumas excepções, por exemplo, as estirpes diferindo em mais de dois *loci* tinham perfis de PFGE com uma relação superior a 80%.

Uma análise da nossa colecção confirma a correlação observada por Gertz *et al.* (2003), sendo também observadas em alguns serótipos excepções. No serótipo 9V, os ST156, ST557,

ST644, ST838, ST1225, ST2403 e ST2405 diferiam até quatro *loci*, apesar dos seus perfis de PFGE estarem relacionados (Anexo 2, figura 22c). Situações similares ocorreram no ST156, ST557 e ST790, do serótipo 14 (Anexo 2, figura 22d) ou no ST100, ST1655, ST717, ST1367 e ST2633, do serótipo 33F (Anexo 2, figura 22s). No serótipo 19A um grupo de PFGE com uma relação superior a 80% continha STs que não partilharam nenhum alelo – ST1201 e ST81 (Anexo 2, figura 22i). No serótipo 3, o ST260 e ST180 não partilharam nenhum dos 7 alelos, mas pertenciam ao mesmo grupo (Anexo 2, figura 22l).

Apesar das diferenças entre os perfis de PFGE e MLST, em vários casos os STs pertenciam à mesma linhagem, tal como definido por eBURST, o que sugere que os dados de PFGE reflectiram uma verdadeira relação. Combinando os dados de PFGE e MLST, foi possível inferir com segurança os STs da maioria das estirpes analisadas (Quadro 15), reduzindo o número de estirpes que foi necessário caracterizar por MLST para se poder comparar a população deste estudo com a de outros estudos.

Apesar de haver uma consistência entre os STs encontrados na nossa colecção com a base de dados pública de MLST ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)), algumas estirpes expressaram serótipos diferentes dos indicados para esses STs na base de dados (Quadro 15). Os seguintes STs foram pela primeira vez encontrados nos serótipos entre parêntesis: ST30 (1, 11A), ST386 (6A), ST1150 (6B), ST1201 (7C), ST1653 (7C), ST66 (9L), ST218 (12B), ST557 (14), ST2108 (15A), ST1228 (15A), ST15 (17F), ST1367 (18C), ST876 (19A), ST1012 (22F), ST81 (23A), ST1684 (31), ST717 (33A) ([spneumoniae.mlst.net](http://spneumoniae.mlst.net)). Nestas circunstâncias os serótipos das estirpes foram confirmados pela reacção de Quellung.

Na maior parte dos casos, essas estirpes não foram incluídas em grupos de PFGE com estirpes dos serótipos anteriormente associados a esses STs. Por exemplo, as estirpes do ST2108, que expressavam o serótipo 15A, e as estirpes do serótipo 19A, geralmente associado a este ST dividiram-se em grupos distintos. Outros exemplos incluíram o ST1228 (15A, 19A), ST15 (17F + 14, 19A), ST876 (19A, 14), e o ST1684 (31, 9N).

As excepções incluíram o ST30 (11A, 16F) e o ST717 (33A e 33F), cujas estirpes dos serótipos dentro de parêntesis partilharam não só os perfis alélicos como os de PFGE. Encontraram-se também estirpes representantes do ST66 e do ST81 que expressavam os serótipos 9L e 23A, nunca antes encontrados nestes STs. Contudo, quer o ST66 quer o ST81 tinham sido previamente encontrados em estirpes do serogrupo 9 e 23, respectivamente. As estirpes que pertenciam ao ST557 foram encontradas pela primeira vez no serótipo 14. Neste caso, o serótipo 14 já tinha sido encontrado noutros STs da mesma linhagem, definida pela análise de eBURST (grupo fundador ST156). Estes dados sugerem fortemente haver uma relação

genética próxima entre estas estirpes e os STs que representam. Na nossa colecção todas as estirpes com o ST218 expressaram o serótipo 12B e não o serótipo 12F, o mesmo foi recentemente descrito num estudo realizado nos EUA (Gertz *et al.*, 2003). A análise dos perfis de PFGE do serótipo 12B e da única estirpe do serótipo 12F, num dendrograma conjunto, mostrou que estas estirpes estão proximamente relacionadas.

No presente trabalho, nem sempre os perfis de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas estirpes caracterizadas eram iguais ao da estirpe depositada na base de dados de MLST (*spneumoniae.mlst.net*). Segundo Sá-Leão *et al.* (2000), a identificação de estirpes que partilham o mesmo perfil de PFGE mas que exibem diferentes determinantes de resistência sugerem a transferência horizontal de genes de resistência. O elevado número de estirpes nestas condições comprova que este fenómeno é bastante comum na população de *S. pneumoniae* e que este poderá ser um importante mecanismo de evolução da espécie. Os clones bacterianos estão geralmente adaptados a nichos específicos. Ao dar-se a transferência horizontal da informação genética esta poderá ser seguida pela selecção do recombinante com o novo fenótipo se este constituir uma vantagem adaptativa, o que possibilita a fixação do novo genótipo e a sua eventual expansão para um novo nicho. A extensão da diversidade genética das espécies bacterianas parece estar relacionada com a variedade dos nichos ocupados (Lan e Reeves, 2000). De acordo com estes autores os genes que se tornam, por alguma razão, deletérios ou que deixam de ser benéficos para um clone são perdidos através da acumulação de mutações e deleções, provavelmente compensando os ganhos genéticos da transferência horizontal de genes.

Quatro anos após a introdução da vacina (2002-2005) é já clara a perda dos seus potenciais benefícios, nomeadamente a diminuição da cobertura dos serótipos que causam infecção invasiva. Não há informação disponível sobre o número de casos anuais de infecção invasiva, por habitante, em Portugal, e por isso não se pode afirmar que a introdução da vacina tenha diminuído o número de infecções. Mas tendo em conta o estudo de Frazão *et al.* (2005), se a frequência de colonização da nasofaringe de crianças saudáveis não diminuiu é possível que o número de casos de infecção invasiva também não tenha diminuído drasticamente devido ao acréscimo dos serótipos não incluídos na vacina.

Contudo, o potencial patogénico dos serótipos não incluídos na vacina, que estão a aumentar de frequência, não é conhecido, embora a capacidade destas estirpes para colonizar a nasofaringe, como para causar infecção invasiva, deva implicar algum potencial patogénico. É ainda possível que, por transferência de genes de outros pneumococos, esses serótipos adquiram

genes da resistência aos antimicrobianos e outros genes de virulência, aumentando o seu potencial invasivo.

Sabendo que o hospedeiro humano se encontra numa co-evolução contínua com os microrganismos, é pertinente perguntar se a implementação de novas vacinas anti-pneumocócicas não poderão, a longo prazo, aumentar o número de serótipos de *S. pneumoniae* com potencial invasivo.

Em resumo, este estudo caracterizou a população pneumocócica causadora de infecção invasiva em Portugal, antes e depois da introdução da vacina 7-valente. O impacto da vacinação na estrutura genética da população invasiva de *S. pneumoniae* envolveu uma alteração progressiva da composição clonal, devido à substituição dos clones dominantes por outros expressando serótipos não incluídos na vacina, e uma redução ainda que ligeira dos casos de infecção invasiva por estirpes resistentes à penicilina.

O presente trabalho permitiu retirar algumas conclusões relativamente à variação de fase em *S. pneumoniae* e à distribuição dos serótipos, resistência aos antimicrobianos e perfis genómicos, na população responsável por infecções invasivas, após a introdução da vacina conjugada 7-valente em Portugal.

As perspectivas futuras relativamente à variação de fase passam por um estudo mais aprofundado de todas as propriedades associadas aos variantes de opacidade que, neste trabalho, se apresentaram mais complexas do que à partida se pensava. Será talvez importante estudar este fenómeno nas estirpes comensais, de modo a compreender como o pneumococo usa este mecanismo na transição entre colonização e a infecção.

É importante continuar a monitorizar a epidemiologia da população de *S. pneumoniae* causadora de infecções invasivas. Por um lado, a potencial cobertura da vacina 7-valente, que foi reduzida devido à substituição dos serótipos incluídos na vacina, pode continuar a mudar fazendo com que a vacina confira menos protecção às crianças vacinadas. Por outro lado, não é ainda claro qual o efeito da vacinação na resistência aos antimicrobianos, um efeito colateral desejável verificado nos EUA.

#### **Estudo da variação de fase em *S. pneumoniae*:**

1. Das 304 estirpes responsáveis por infecções invasivas que expressavam os 10 serótipos mais prevalentes entre 1999 e 2002 em Portugal (1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 12B, 14, 19A, 23F), representando uma grande diversidade genética, 52,0% eram opacas, 26,0% transparentes, 16,1% intermédios e 5,0% misturas de fenótipos. Estimou-se, com base no “odds ratio” e num intervalo de confiança de 95%, uma associação entre alguns serótipos e a opacidade, o que pode explicar, em parte, a preferência de certos serótipos para colonizar a nasofaringe assintomaticamente e outros para causar infecção. A variação de fase foi estabelecida num modelo murino, onde os variantes opacos e intermédios foram mais patogénicos do que os transparentes. Os resultados implicam a variação de fase na infecção pneumocócica.

#### **Estudo epidemiológico na população invasiva de *S. pneumoniae*:**

2. Após a implementação da vacina 7-valente em Portugal houve mudanças substanciais na população de estirpes responsáveis por infecções invasivas.

- Os serótipos da vacina 4, 14 e 23F diminuíram de frequência, enquanto que os serótipos não incluídos na vacina 3, 7F e sobretudo o 19A aumentaram de frequência, na totalidade das

estirpes. A potencial cobertura da vacina diminuiu para valores abaixo dos 30% em todos os grupos etários, passando a ser de apenas 28,6% (2004 a 2005) em crianças com menos de 2 anos.

- A resistência à penicilina diminuiu para 17,5% e a resistência aos macrólidos e à tetraciclina aumentaram na população. O aumento da frequência do serótipo 19A pode explicar, em parte, o aumento da resistência à tetraciclina e aos macrólidos, a nova associação entre a maioria das estirpes apresentando o fenótipo MLS<sub>B</sub> e M e a resistência à penicilina, e o aparecimento de estirpes resistentes à tetraciclina com o fenótipo M. A resistência a três ou mais antimicrobianos de classes farmacológicas distintas (multiresistência), em estirpes não susceptíveis à penicilina, aumentou para cerca do dobro e estava associada à resistência à tetraciclina e aos macrólidos.

- Apareceram 15 novas linhagens desde 2003 e houve um aumento na prevalência de clones já existentes, de serótipos incluídos e não incluídos na vacina. Os resultados indicam que a troca capsular teve pouca importância na alteração da composição clonal em Portugal não permitindo a persistência da maioria dos clones reconhecidos pela PMEN expressando serótipos vacinais, que eram importantes entre as estirpes responsáveis por infecções invasivas no nosso país.

## **BIBLIOGRAFIA**

Ada G. e D. Isaacs. 2003. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect.* 9: 79-85.

Adam H., K. Schurek, K. Nichol, C. Hoban, T. Baudry, N. Laing, D. Hoban e G. Zhanel. 2007. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada, 1997 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(1):198-207.

Ahn S., C. Nelson, T. Garrison, W. Miller e R. Lefkowitz. 2003. Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(4):1740-4.

Alcântara R., L. Preheim e M. Gentry. 1999. Role of Pneumolysin's complement-activating activity during pneumococcal bacteremia in cirrhotic rats. *Infect Immun.* 67(6):2862-6.

Alou L., M. Ramirez, C. Garci-Rey, J. Prieto e H. de Lencastre. 2001. *Streptococcus pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Spain: clonal diversity and appearance of ciprofloxacin-resistant epidemic clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 2955-57.

Ambrose K., R. Nisbet e D. Stephens. 2005. Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (*mel* and *mef*) and is erythromycin inducible. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(10):4203-9.

Ament A., R. Baltussen, G. Duru, C. Rigaud-Bully, D. de Graeve, A. Ortvist, B. Jonsson, J. Verhaegen, J. Gaillat, P. Christie, A. Cifre, D. Vivas, C. Loiseau e D. Fedson. 2000. Cost-effectiveness of pneumococcal vaccination of older people: a study in 5 western European countries. *Clin Infect Dis.* 31(2):444-50.

Andriole V. 2005. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 2:S113-9.

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

Anttila M., J. Eskola, H. Ahman e H. Kayhty. 1998. Avidity of IgG for *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 23F polysaccharides in infants primed with pneumococcal conjugates and boosted with polysaccharide or conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 177(6):1614-21.

Appelbaum P. 2002. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. *Clin Infect Dis.* 15;34(12):1613-20.

Arai S., T. Konda, A. Wad, Y. Matsunaga, N. Okabe, H. Watanabe e S. Inouye. 2001. Use of antiserum-coated latex particles for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Immunol.* 45(2):159-62.

Arbique J., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Quesne, Mda Carvalho, A. Steigerwalt, R. Morey, D. Jackson, R. Davidson e R. Facklam. 2004. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 42(10):4686-96.

Aricha B., I. Fishov, Z. Cohen, N. Sikron, S. Pesakhov, I. Khozin-Goldberg, R. Dagan e N. Porat. 2004. Differences in membrane fluidity and fatty acid composition between phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 186(14):4638-44.

Austrian R. 1953. Morphologic variation in pneumococcus. *J. Exp. Med.* 98:21-40

Austrian R. 1999. Pneumococcus and the Brooklyn connection. *Am J Med.* 26. 107(1A):2S-6S.

Austrian R. 1999a. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. *J Infect Dis.* 179 Suppl 2:S338-41.

Ayoubi P., A. Kilic e M. Vijayakumar. 1991. Tn5253, the pneumococcal omega (cat tet) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252. *J Bacteriol.* 173(5):1617-22.

Balachandran P., S. Hollingshead, J. Paton e D. Briles. 2001. The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol.* 183(10):3108-16.

Barocchi M., J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, S. Dahlberg, J. Fernebro, M. Moschioni, V. Massignani, K. Hultenby, A. Taddei, K. Beiter, F. Wartha, A. von Euler, A. Covacci, D. Holden, S. Normark, R. Rappuoli e B. Henriques-Normark. 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(8):2857-62.

Batt S., B. Charalambous, T. McHugh, S. Martin e S. Gillespie. 2005. Novel PCR-restriction fragment length polymorphism method for determining serotypes or serogroups of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol.* 43(6):2656-61.

Beall B., M. McEllistrem, R. Gertz Jr, S. Wedel, D. Boxrud, A. Gonzalez, M. Medina, R. Pai, T. Thompson, L. Harrison, L. McGee, C. Whitney; Active Bacterial Core Surveillance Team. 2006. Pre- and postvaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002. *J Clin Microbiol.* 44(3):999-1017.

Benton K., J. Paton e D. Briles. 1997. Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. *Infect Immun.* 65(4):1237-44.

Berron S., A. Fenoll, M. Ortega, N. Arellano e J. Casal. 2005. Analysis of the genetic structure of nontypeable pneumococcal strains isolated from conjunctiva. *J Clin Microbiol.* 43(4):1694-8.

Berry A., R. Lock, D. Hansman e J. Paton. 1989. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 57(8):2324-30.

Bogaert D., R. de Groot e P. Hermans. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 4(3):144-54.

Bogaert D., R. Veenhoven, M. Sluijter, W. Wannet, G. Rijkers, T. Mitchell, S. Clarke, W. Goessens, A. Schilder, E. Sanders, R. de Groot e P. Hermans. 2005. Molecular epidemiology of pneumococcal colonization in response to pneumococcal conjugate vaccination in children with recurrent acute otitis media. *J Clin Microbiol.* 43(1):74-83.

Braun J., J. Sublett, D. Freyer, T. Mitchell, J. Cleveland, E. Tuomanen e J. Weber. 2002. Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest.* 109(1):19-27.

Brenwald N., P. Appelbaum, T. Davies e M. Gill. 2003. Evidence for efflux pumps, other than PmrA, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 9: 140-143.

Brenwald N., M. Gill e R. Wise. 1998. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(8):2032-5.

Briles D., M. Crain, B. Gray, C. Forman e J. Yother. 1992. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 60(1):111-6.

Briles D., M. Nahm, K. Schroer, J. Davie, P. Baker, J. Kearney e R. Barletta. 1981. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med.* 153(3):694-705.

Briles D., L. Novak, M. Hotomi, F. van Ginkel e J. King. 2005. Nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. *Infect Immun.* 73(10):6945-51.

Brito D., M. Ramirez e H. de Lencastre. 2003. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 41(6):2378-84.

Brueggemann A., S. Coffman, P. Rhomberg, H. Huynh, L. Almer, A. Nilius, R. Flamm e G. Doern. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in United States since 1994-1995. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 680-688.

Brueggemann A., D. Griffiths, E. Meats, T. Peto, D. Crook e B. Spratt. 2003. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis.* 187(9):1424-32.

Brueggemann A., T. Peto, D. Crook, J. Butler, K. Kristinsson e B. Spratt. 2004. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis.* 190(7):1203-11.

Brueggemann A. e B. Spratt. 2003. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol.* 41(11):4966-70.

Brundish D. e J. Baddiley. 1968. Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J.* 110(3):573-82.

Brunham R., F. Plummer e R. Stephens. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infect Immun.* 61(6):2273-6.

Bryan C. 1999. Treatment of pneumococcal pneumoniae: the case for penicillin G. *Am J Med.* 107: 63S-68S.

Buie K., K. Klugman, A. von Gottberg, O. Perovic, A. Karstaedt, H. Crewe-Brown, S. Madhi e C. Feldman. 2004. Gender as a risk factor for both antibiotic resistance and infection with pediatric serogroups/serotypes, in HIV-infected and -uninfected adults with pneumococcal bacteremia. *J Infect Dis.* 189(11):1996-2000.

Butler J. 1997. Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. *Microb Drug Resist.* 3: 125-9.

Butler J., E. Shapiro e G. Carlone. 1999. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am J Med.* 26. 107(1A):69S-76S.

Calbo E., A. Diaz, E. Canadell, J. Fabrega, S. Uriz, M. Xercavins, M. Morera, E. Cuchi, M. Rodriguez-Carballeira, J. Garau; Spanish Pneumococcal Infection Study Network. 2006. Invasive pneumococcal disease among children in a health district of Barcelona: early impact of pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect.* 12(9):867-72.

Canton R., M. Morosini, M. Enright e I. Morrissey. 2003. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 52(6):944-52.

Carsenti-Dellamonica H., M. Galimand, F. Vandebos, C. Pradier, P. Roger, B. Dunais, M. Sabah, G. Mancini e P. Dellamonica. 2005. In vitro selection of mutants of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolides and linezolid: relationship with susceptibility to penicillin G or macrolides. *J Antimicrob Chemother.* 56(4):633-42.

Carvalho M., A. Steigerwalt, T. Thompson, D. Jackson e R. Facklam. 2003. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 41(9):4415-7.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR.* 46(RR-8):1-24.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR.* 49(RR-9): 1-38.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease-United States, 1998-2003. *MMWR* 54(36):893-7.

Chambers H. 2000. Penicillins, p. 261-74. In G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5ª edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.

Chen Z., D. Dupre, C. Le Gouill, M. Rola-Pleszczynski e J. Stankova. 2002. Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif. *J Biol Chem.* 277(9):7356-62.

Chesnel L., R. Carapito, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet e A. Zapun. 2005. Identical penicillin-binding domains in penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different levels of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(7):2895-902.

Chopra I. e M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65: 232-60.

Chu G. 1989. Pulsed-field electrophoresis in contour-clamped homogeneous electric fields for the resolution of DNA by size or topology. *Electrophoresis.* 10: 290-5.

Clarke V., N. Platt e T. Butters. 1995. Cloning and expression of the beta-N-acetylglucosaminidase gene from *Streptococcus pneumoniae*. Generation of truncated enzymes with modified aglycon specificity. *J Biol Chem.* 270(15):8805-14.

Clewell D., S. Flanagan e D. Jaworski. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* 3(6):229-36.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. M100-S16. Pennsylvania, EUA.

Cochetti I., M. Vecchi, M. Mingoia, E. Tili, M. Catania, A. Manzin, P. Varaldo e M. Montanari. 2005. Molecular characterization of pneumococci with efflux-mediated erythromycin resistance and identification of a novel *mef* gene subclass, *mef(I)*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(12):4999-5006.

Coffey T., C. Dowson, M. Daniels e B. Spratt. 1995. Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. *Microb Drug Resist.* 1(1):29-34.

Coffey T., C. Dowson, M. Daniels, J. Zhou, C. Martin, B. Spratt e J. Musser. 1991. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 5(9):2255-60.

Coyle E., G. Kaatz e M. Rybak. 2001. Activities of newer fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 1654-9.

Crook D., A. Brueggemann, K. Sleeman e T. Peto. 2004. Pneumococcal carriage, p. 136-47. In: E. Tuomanen, T. Mitchell, D. Morrison e B. Spratt (eds). *The Pneumococcus*. American Society for Microbiology Press, EUA.

Cundell D., N. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila e E. Tuomanen. 1995a. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* 5. 377(6548):435-8.

Cundell D., J. Weiser, J. Shen, A. Young e E. Tuomanen. 1995. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 63(3):757-61.

Dagan R., N. Givon-Lavi, O. Zamir, M. Sikuler-Cohen, L. Guy, P. Yagupsky e D. Fraser. 2002. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. *J Infect Dis.* 185: 927-36.

Davidson M., A. Parkinson, L. Bulkow, M. Fitzgerald, H. Peters e D. Parks. 1994. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in Alaska, 1986-1990-ethnic differences and opportunities for prevention. *J Infect Dis.* 170(2):368-76.

Davidson R., R. Cavalcanti, J. Brunton, D. Bast, J. de Azavedo, P. Kirsey, C. Fleming e D. Low. 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumoniae. *N Engl J Med.* 346: 747-50.

Dawid S., A. Roche e J. Weiser. 2007. The blp bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 75(1):443-51.

de Lencastre H., K. Kristinsson, A. Brito-Avô, I. Sanches, R. Sá-Leão, J. Saldanha, E. Sigvaldadottir, S. Karlsson, D. Oliveira, R. Mato, M. de Sousa e A. Tomasz. 1999. Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *Microb Drug Resist.* 5: 19-29.

de Lencastre H. e A. Tomasz. 2002. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 50 Suppl S2:75-81.

de Saizieu A., C. Gardes, N. Flint, C. Wagner, M. Kamber, T. Mitchell, W. Keck, K. Amrein e R. Lange. 2000. Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol.* 182(17):4696-703.

de Velasco E., A. Verheul, J. Verhoef e H. Snippe. 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev.* 59: 591-603.

del Grosso M., F. Iannelli, C. Messina, M. Santagati, N. Petrosillo, S. Stefani, G. Pozzi e A. Pantosti. 2002. Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 40(3):774-8.

Decousser J., P. Pina, F. Viguier, F. Picot, P. Courvalin, P. Allouch; ColBVH Study Group. 2004. Invasive *Streptococcus pneumoniae* in France: antimicrobial resistance, serotype, and molecular epidemiology findings from a monthly national study in 2000 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(9):3636-9.

Dijkshoorn L., B. Ursing e J. Ursing. 2000. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol.* 49: 397-401.

Doern G., S. Richter, A. Miller, N. Miller, C. Rice, K. Heilmann e S. Beekmann. 2005. Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? *Clin Infect Dis.* 41(2):139-48.

Doherty N., K. Trzcinski, P. Pickerill, P. Zawadzki e C. Dowson. 2000. Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 2979-84.

Doit C., C. Loukil, P. Geslin e E. Bingen. 2002. Phenotypic and genetic diversity of invasive pneumococcal isolates recovered from French children. *J Clin Microbiol.* 40: 2994-8.

Domínguez A., L. Salleras, D. Fedson, C. Izquierdo, L. Ruiz, P. Ciruela, A. Fenoll e J. Casal. 2005. Effectiveness of pneumococcal vaccination for elderly people in Catalonia, Spain: a case-control study. *Clin Infect Dis.* 40(9):1250-7.

Donowitz G. 2000. Oxazolidinones, p. 392-94. In G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5ª edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.

Douglas R., J. Paton, S. Duncan e D. Hansman. 1983. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis.* 148(1):131-7.

Duane P., J. Rubins, H. Weisel e E. Janoff. 1993. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 61(10):4392-7.

Dunais B., C. Pradier, H. Carsenti, M. Sabah, G. Mancini, E. Fontas e P. Dellamonica. 2003. Influence of child care on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Pediatr Infect Dis J.* 22(7):589-92

Dupre D., Z. Chen, C. Le Gouill, C. Theriault, J. Parent, M. Rola-Pleszczynski e J. Stankova. 2003. Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem.* 278(48):48228-35.

Enright M., A. Fenoll, D. Griffiths e B. Spratt. 1999. The three major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* are the most common clones recovered in recent cases of meningitis in Spain. *J Clin Microbiol.* 37(10):3210-6.

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

Enright M. e B. Spratt. 1999. Extensive variation in the *ddl* gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* results from a hitchhiking effect driven by the penicillin-binding protein 2b gene. *Mol Biol Evol.* 16(12):1687-95.

Eskola J., T. Kilpi, A. Palmu, J. Jokinen, J. Haapakoski, E. Herva, A. Takala, H. Kayhty, P. Karma, R. Kohberger, G. Siber, P. Makela; Finnish Otitis Media Study Group. 2001. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med.* 344(6):403-9.

Farrell D., T. File e S. Jenkins. 2007. Prevalence and antibacterial susceptibility of *mef(A)*-positive macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* over 4 years (2000 to 2004) of the PROTEKT US Study. *J Clin Microbiol.* 45(2):290-3.

Feikin D., K. Klugman, R. Facklam, E. Zell, A. Schuchat, C. Whitney; Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program Network. 2005. Increased prevalence of pediatric pneumococcal serotypes in elderly adults. *Clin Infect Dis.* 41(4):481-7.

Feil E., E. Holmes, D. Bessen, M. Chan, N. Day, M. Enright, R. Goldstein, D. Hood, A. Kalia, C. Moore, J. Zhou e B. Spratt. 2001. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(1):182-7.

Feil E., B. Li, D. Aanensen, W. Hanage e B. Spratt. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 186(5):1518-30.

Feil E., J. Smith, M. Enright e B. Spratt. 2000. Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics.* 154(4):1439-50.

Fekety R. 2000. Vancomycin, teicoplanin, and the streptogramins: quinupristin and dalbapristin, p. 382-92. In G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin (eds.). Principles and practice of infectious diseases, 5ª edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.

Felmingham D., R. Grüenberg; the Alexander Project Group. 2000. The Alexander project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother.* 45: 191-203.

Fenoll A., I. Jado, D. Vicioso e J. Casal. 1997. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol.* 35(3):764-6.

Figueroa J. e P. Densen. 1991. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev.* 4(3):359-95.

File T. 2002. Appropriate use of antimicrobials for drug-resistant pneumoniae: focus on the significance of  $\beta$ -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 34(suppl 1): S17-S26.

Finch R. 2002. Bacterial resistance- the clinical challenge. *Clin Microbiol Infect.* 8(suppl. 3): 21-32.

Fiore A., O. Levine, J. Elliott, R. Facklam e J. Butler. 1999. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine for preschool-age children with chronic disease. *Emerg Infect Dis.* 5(6):828-31.

Fischer W. 1997. Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microb Drug Resist.* 3(4):309-25.

Fischer W. 2000. Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol.* 151(6):421-7.

Flamaing J., J. Verhaegen e W. Peetermans. 2002. *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia in Belgium: differential characteristics in children and the elderly population and implications for vaccine use. *J Antimicrob Chemother.* 50: 43-50.

Frazão N., A. Brito-Avo, C. Simas, J. Saldanha, R. Mato, S. Nunes, N. Sousa, J. Carrico, J. Almeida, I. Santos-Sanches, H. de Lencastre. 2005. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. *Pediatr Infect Dis J.* 24(3):243-52.

Fuller J. e D. Low. 2005. A review of *Streptococcus pneumoniae* infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance. *Clin Infect Dis.* 41(1):118-21.

Garcia J., A. Sanchez-Beato, F. Medrano e R. Lopez. 1998. Versatility of choline-binding domain. *Microb Drug Resist.* 4(1):25-36.

Garcia-Rodriguez J. e M. Fresnadillo. 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 50 Suppl S2:59-73.

Garcia P., J. Garcia, E. Garcia e R. Lopez. 1986. Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene.* 43(3):265-72.

Garcia P., M. Gonzalez, E. Garcia, R. Lopez e J. Garcia. 1999. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol.* 31(4):1275-81.

Garcia P., A. Martin e R. Lopez. 1997. Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. *Microb Drug Resist.* 3(2):165-76.

Garcia P., M. Paz Gonzalez, E. Garcia, J. Garcia e R. Lopez. 1999a. The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol.* 33(1):128-38.

Gay K. e D. Stephens. 2001. Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 184(1):56-65.

Gertz R. Jr., M. McEllistrem, D. Boxrud, Z. Li, V. Sakota, T. Thompson, R. Facklam, J. Besser, L. Harrison, C. Whitney e B. Beall. 2003. Clonal distribution of invasive pneumococcal isolates from children and selected adults in the United States prior to 7-valent conjugate vaccine introduction. *J Clin Microbiol.* 41(9):4194-216.

Gherardi G., L. Fallico, M. del Grosso, F. Bonanni, F. D'Ambrosio, R. Manganeli, G. Palu, G. Dicuonzo e A. Pantosti. 2007. Antibiotic-resistant invasive pneumococcal clones in Italy. *J Clin Microbiol.* 45(2):306-12.

Gill M., N. Brenwald e R. Wise. 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 187-9.

Gill V., D. Fedorko e F. Witebsky. 2000. The clinician and the microbiology laboratory, p. 184-221. In G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5ª edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.

Goldenberg H., T. McCool e J. Weiser. 2004. Cross-reactivity of human immunoglobulin G2 recognizing phosphorylcholine and evidence for protection against major bacterial pathogens of the human respiratory tract. *J Infect Dis.* 190(7):1254-63.

Gosink K., E. Mann, C. Guglielmo, E. Tuomanen e H. Masure. 2000. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 68(10):5690-5.

Gould J. e J. Weiser. 2001. Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect Immun.* 69(3):1747-54.

Gould J. e J. Weiser. 2002. The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J Infect Dis.* 186(3):361-71.

Gray B., G. Converse 3rd, H. Dillon Jr. 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis.* 142(6):923-33.

Greenberg D., N. Givon-Lavi, A. Broides, I. Blancovich, N. Peled e R. Dagan. 2006. The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* carriage in children and their mothers. *Clin Infect Dis.* 42(7):897-903.

Greene C., M. Kyaw, S. Ray, W. Schaffner, R. Lynfield, N. Barrett, C. Long, K. Gershman, T. Pilishvili, A. Roberson, E. Zell, C. Whitney, N. Bennett; Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network. 2006. Preventability of invasive pneumococcal disease and assessment of current polysaccharide vaccine recommendations for adults: United States, 2001-2003. *Clin Infect Dis.* 43(2):141-50.

Guidolin A., J. Morona, R. Morona, D. Hansman e J. Paton. 1994. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infect Immun.* 62(12):5384-96.

Guiral S., T. Mitchell, B. Martin e J. Claverys. 2005. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(24):8710-5.

Hakenbeck R. 2000. Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. *Res Microbiol.* 151(6):453-6.

Hakenbeck R., T. Grebe, D. Zahner e J. Stock. 1999. Beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol.* 33(4):673-8.

Hakenbeck R., M. Tarpay e A. Tomasz. 1980. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 17(3):364-71.

Hammerschmidt S., G. Bethe, P. Remane e G. Chhatwal. 1999. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 67(4):1683-7.

Hammerschmidt S., S. Talay, P. Brandtzaeg e G. Chhatwal. 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol.* 25(6):1113-24.

Hammit L., D. Bruden, J. Butler, H. Baggett, D. Hurlburt, A. Reasonover e T. Hennessy. 2006. Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*: an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis.* 193(11):1487-94.

Hanage W., S. Huang, M. Lipsitch, C. Bishop, D. Godoy, S. Pelton, R. Goldstein, H. Huot e J. Finkelstein. 2007. Diversity and antibiotic resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates in the post-heptavalent conjugate vaccine era. *J Infect Dis.* 195(3):347-52.

Hanage W., T. Kaijalainen, A. Saukkoriipi, J. Rickcord e B. Spratt. 2006. A successful, diverse disease-associated lineage of nontypeable pneumococci that has lost the capsular biosynthesis locus. *J Clin Microbiol.* 44(3):743-9.

Hausdorff W., J. Bryant, P. Paradiso e G. Siber. 2000. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* 30: 100-21.

Hausdorff W., D. Feikin e K. Klugman. 2005. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis.* 5(2):83-93.

Hava D. e A. Camilli. 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol.* 45(5):1389-406.

Hava D., C. Hemsley e A. Camilli. 2003. Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae* *rlrA* pathogenicity islet by RlrA. *J Bacteriol.* 185(2):413-21.

Havarstein L., G. Coomaraswamy e D. Morrison. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(24):11140-4.

Havarstein L., R. Hakenbeck e P. Gaustad. 1997. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol.* 179(21):6589-94.

Hemsley C., E. Joyce, D. Hava, A. Kawale e A. Camilli. 2003. MgrA, an orthologue of Mga, Acts as a transcriptional repressor of the genes within the *rlrA* pathogenicity islet in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 185(22):6640-7.

Henderson I., P. Owen e J. Nataro. 1999. Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol.* 33(5):919-32.

Henrichsen J. 1999. Typing of *Streptococcus pneumoniae*: past, present, and future. *Am J Med.* 107(1A):50S-54S.

Hirst R., K. Sikand, A. Rutman, T. Mitchell, P. Andrew e C. O'Callaghan. 2000. Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect Immun.* 68(3):1557-62.

Hoskins J., W. Alborn, J. Arnold, L. Blaszczak, S. Burgett, B. DeHoff, S. Estrem, L. Fritz, D-J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J. Glass, H. Khoja, A. Kraft, R. Lagace, D. LeBlanc, L. Lee, E. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C. Mundy, T. Nicas, F. Norris, M. O'Gara, R. Peery, G. Robertson, P. Rockey, P-M. Sun, M. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C. Zook, R. Baltz, S. Jaskunas, P. Rosteck, P. Skatrud e J. Glass. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* 183: 5709-17.

Howard L. e H. Gooder. 1974. Specificity of the autolysin of *Streptococcus* (*Diplococcus*) *pneumoniae*. *J Bacteriol.* 117(2):796-804.

Hsueh P-R. e K-T. Luh. 2002. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 8: 1487-91.

Huang S., J. Finkelstein e M. Lipsitch. 2005a. Modeling community- and individual-level effects of child-care center attendance on pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis.* 40(9):1215-22.

Huang S., R. Platt, S. Rifas-Shiman, S. Pelton, D. Goldmann e J. Finkelstein. 2005. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. *Pediatrics.* 116(3): 408-13.

Jackson L., K. Neuzil, O. Yu, P. Benson, W. Barlow, A. Adams, C. Hanson, L. Mahoney, D. Shay, W. Thompson; Vaccine Safety Datalink. 2003. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 348(18):1747-55.

Jacobs M. e P. Appelbaum. 1995. Antibiotic-resistant pneumococci. *Rev. Med. Microbiol.* 6:77-93.

Jacobs M., D. Felmingham, P. Appelbaum, R. Gruneberg; The Alexander Project Group. 2003. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 52(2):229-46.

Janoir C., V. Zeller, M. Kitzis, N. Moreau e L. Gutmann. 1996. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(12):2760-4.

Jefferies J., A. Smith, S. Clarke, C. Dowson e T. Mitchell. 2004. Genetic analysis of diverse disease-causing pneumococci indicates high levels of diversity within serotypes and capsule switching. *J Clin Microbiol.* 42(12):5681-8.

Johnston J., D. Briles, L. Myers e S. Hollingshead. 2006. Mn<sup>2+</sup>-dependent regulation of multiple genes in *Streptococcus pneumoniae* through PsaR and the resultant impact on virulence. *Infect Immun.* 74(2):1171-80.

Jones R., C. Rubino, S. Bhavnani e P. Ambrose. 2003. Worldwide antimicrobial susceptibility patterns and pharmacodynamic comparisons of gatifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*: report from the antimicrobial resistance rate epidemiology study team. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 292-6.

Kaplan S. e E. Mason. 1998. Management of infections due to antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 628-44.

Karchmer A. 2000. Cephalosporins, p. 274-91. In G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5ª edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.

Kasahara K., K. Maeda, K. Mikasa, K. Uno, K. Takahashi, M. Konishi, E. Yoshimoto, K. Murakawa, E. Kita e H. Kimura. 2005. Clonal dissemination of macrolide-resistant and penicillin-susceptible serotype 3 and penicillin-resistant Taiwan<sup>19F</sup>-14 and <sup>23F</sup>-15 *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan: a pilot surveillance study. *J Clin Microbiol.* 43(4):1640-5.

Kellog J., D. Bankert, C. Elder, J. Gibbs e M. Smith. 2001. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol.* 39(9):3373-5.

Kelly D., A. Pollard e E. Moxon. 2005. Immunological memory: the role of B cells in long-term protection against invasive bacterial pathogens. *JAMA.* 294(23):3019-23.

Kerr A., G. Paterson, A. Riboldi-Tunnicliffe e T. Mitchell. 2005. Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3. *Infect Immun.* 73(7):4245-52.

Kilian M., J. Mestecky e M. Russell. 1988. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev.* 52(2):296-303.

Kim J., S. Romero-Steiner, U. Sørensen, J. Blom, M. Carvalho, S. Barnard, G. Carlone e J. Weiser. 1999. Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation on opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 67(5):2327-33.

Kim J. e J. Weiser. 1998. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 177(2):368-77.

King S., K. Hippe, J. Gould, D. Bae, S. Peterson, R. Cline, C. Fasching, E. Janoff e J. Weiser. 2004. Phase variable desialylation of host proteins that bind to *Streptococcus pneumoniae* in vivo and protect the airway. *Mol Microbiol.* 54(1):159-71.

King S., K. Hippe e J. Weiser. 2006. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 59(3):961-74.

King S., A. Whatmore e C. Dowson. 2005. NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J Bacteriol.* 187(15):5376-86.

Kirkeby L., T. Rasmussen, J. Reinholdt e M. Kilian. 2000. Immunoglobulins in nasal secretions of healthy humans: structural integrity of secretory immunoglobulin A1 (IgA1) and occurrence of neutralizing antibodies to IgA1 proteases of nasal bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(1):31-9.

Kirkham L., J. Jefferies, A. Kerr, Y. Jing, S. Clarke, A. Smith e T. Mitchell. 2006. Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *J Clin Microbiol.* 44(1):151-9.

Klugman K. 1990. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev.* 3: 171-96.

Knutsen E., O. Johnsborg, Y. Quentin, J. Claverys e L. Havarstein. 2006. BOX elements modulate gene expression in *Streptococcus pneumoniae*: impact on the fine-tuning of competence development. *J Bacteriol.* 188(23):8307-12.

Kolibab K., S. Smithson, B. Rabquer, S. Khuder e M. Westerink. 2005. Immune response to pneumococcal polysaccharides 4 and 14 in elderly and young adults: analysis of the variable heavy chain repertoire. *Infect Immun.* 73(11):7465-76.

Kolkman M., D. Morrison, B. Van Der Zeijst, P. Nuijten. 1996. The capsule polysaccharide synthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: Identification of the glycosyl transferase gene *cps14*. *E. J Bacteriol.* 178(13):3736-41.

Konradsen H. e M. Kaltoft. 2002. Invasive pneumococcal infections in Denmark from 1995 to 1999: epidemiology, serotypes, and resistance. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 358-65.

Kovacs M., A. Halfmann, I. Fedtke, M. Heintz, A. Peschel, W. Vollmer, R. Hakenbeck e R. Bruckner. 2006. A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 188(16):5797-805.

Kupsch E., B. Knepper, T. Kuroki, I. Heuer e T. Meyer. 1993. Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells. *EMBO J.* 12(2):641-50.

Kyaw M., R. Lynfield, W. Schaffner, A. Craig, J. Hadler, A. Reingold, A. Thomas, L. Harrison, N. Bennett, M. Farley, R. Facklam, J. Jorgensen, J. Besser, E. Zell, A. Schuchat, C. Whitney; Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. 2006. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* 354(14):1455-63.

Lacks S. e R. Hotchkiss. 1960. A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus. *Biochim Biophys Acta.* 39:508-18.

Lai E., B. Birren, S. Clark, M. Simon e L. Hood. 1989. Pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechniques.* 7: 34-42.

Lan R. e P. Reeves. 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol.* 8: 396-401.

Leeming J., K. Cartwright, R. Morris, S. Martin, M. Smith e South-West Pneumococcus Study Group. 2005. Diagnosis of invasive pneumococcal infection by serotype-specific urinary antigen detection. *J Clin Microbiol.* 43(10):4972-6.

Leimkugel J., A. Forgor, S. Gagneux, V. Pfluger, C. Flierl, E. Awine, M. Naegeli, J. Dangy, T. Smith, A. Hodgson e G. Pluschke. 2005. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. *J Infect Dis.* 192(2):192-9.

Levine D. 2006. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis.* 42 Suppl 1:S5-12.

Levy S. 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am.* 278: 46-53.

Llull D., R. Lopez e E. Garcia. 2006. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol.* 44(4):1250-6.

Lodish H., A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore e J. Darnell. 2000. Molecular Cell Biology, 4ª edição. WH Freeman, Nova Yorque, EUA.

Loeffler J. e V. Fischetti. 2006. Lysogeny of *Streptococcus pneumoniae* with MM1 phage: improved adherence and other phenotypic changes. *Infect Immun.* 74(8):4486-95.

Low D. 2002. The era of antimicrobial resistance- implications for the clinical laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 8(suppl. 3): 9-20.

Low D. 2004. Quinolone resistance among pneumococci: therapeutic and diagnostic implications. *Clin Infect Dis.* 38 Suppl 4:S357-62.

Lund E. e J. Henrichsen. 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*, p. 241-62. In: T. Bergan e J. Norris (eds.). Methods in Microbiology. Academic Press, Reino Unido.

Magee A. e J. Yother. 2001. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 69(6):3755-61.

Maiden M. 1998. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis.* 27 Suppl 1:S12-20.

Maiden M., J. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. Russel, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. Caugant, I. Feavers, M. Achtman e B. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 3140-45.

Mann B., C. Orihuela, J. Antikainen, G. Gao, J. Sublett, T. Korhonen e E. Tuomanen. 2006. Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. *Infect Immun.* 74(2):821-9.

Marchese A., M. Ramirez, G. Schito e A. Tomasz. 1998. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered in Italy from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol.* 36: 2944-9.

Martin B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hakenbeck, et al. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20(13):3479-83.

Mascher T., M. Heintz, D. Zahner, M. Merai e R. Hakenbeck. 2006. The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and by mutations in *pbp2x* involved in beta-lactam resistance. *J Bacteriol.* 188(5):1959-68.

Mattu T., R. Pleass, A. Willis, M. Kilian, M. Wormald, A. Lellouch, P. Rudd, J. Woof e R. Dwek. 1998. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *J Biol Chem.* 273(4):2260-72.

McCaig L., R. Besser e J. Hughes. 2003. Antimicrobial drug prescriptions in ambulatory care settings, United States, 1992-2000. *Emerg Infect Dis.* 9: 432-7.

McEllistrem M., J. Adams, K. Patel, A. Mendelsohn, S. Kaplan, J. Bradley, G. Schutze, K. Kim, E. Mason e E. Wald. 2005. Acute otitis media due to penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 40(12):1738-44.

McGee L., L. McDougal, J. Zhou, B. Spratt, F. Tenover, R. George, R. Hakenbeck, W. Hryniewicz, J. Lefèvre, A. Tomasz e K. Klugman. 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol.* 39: 2565-71.

Melo-Cristino J. 1999. Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 12: 199-202.

Melo-Cristino J., M. Fernandes, N. Serrano; Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. 2001. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* de infecções respiratórias adquiridas na comunidade em 2000. *Acta Med Port.* 14: 459-68.

Melo-Cristino J., M. Ramirez, N. Serrano, T. Hänscheid; The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. 2003. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in Portugal: results of a 3-year (1999-2001) multicenter surveillance study. *Microb Drug Resist.* 9: 73-80.

Melo-Cristino J., L. Santos, M. Ramirez; Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. 2006. The Viriato Study: update of antimicrobial susceptibility data of bacterial pathogens from community-acquired respiratory tract infections in Portugal in 2003 and 2004. *Rev Port Pneumol.* 12(1):9-30.

Moellering R. 2002. The continuing challenge of lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis.* 34(suppl. 1):S1-S3.

Moellering R. 2005. The Fluoroquinolones: the last samurai? *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 2:S111-2.

Mónaco M., R. Camilli, F. D'Ambrosio, M. del Grosso e A. Pantosti. 2005. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 55(2):256-9.

Morlot C., A. Zapun, O. Dideberg e T.Vernet. 2003. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol.* 50(3):845-55.

Morona J., J. Paton, D. Miller e R. Morona. 2000. Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 35(6):1431-42.

Mosser J. e A. Tomasz. 1970. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem.* 245(2):287-98.

Mrazek J., L. Gaynon e S. Karlin. 2002. Frequent oligonucleotide motifs in genomes of three streptococci. *Nucleic Acids Res.* 30(19):4216-21.

Muñoz R., J. Musser, M. Crain, D. Briles, A. Marton, A. Parkinson, U. Sørensen e A. Tomasz. 1992. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis.* 15(1):112-8.

Muñoz R., T. Coffey, M. Daniels, C. Dowson, G. Laible, J. Casal, R. Hakenbeck, M. Jacobs, J. Musser, B. Spratt, et al. 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 164(2):302-6.

Murray P., K. Rosenthal, G. Kobayashi e U. Pfaller. 2002. Medical Microbiology, 4ª edição. Mosby, EUA.

Musher D. 2000. *Streptococcus pneumoniae*, p. 2128-47. In G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5ª edição, Vol 2. Churchill Livingstone, EUA.

Musher D., J. Groover, M. Reichler, F. Riedo, B. Schwartz, D. Watson, R. Baughn e R. Breiman. 1997. Emergence of antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* during outbreaks of pneumonia: association with nasopharyngeal colonization. *Clin Infect Dis.* 24(3):441-6.

Musher D., J. Groover, J. Rowland, D. Watson, J. Struewing, R. Baughn, M. Mufson. 1993. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, persistence, and response to revaccination. *Clin Infect Dis.* 17(1):66-73.

Nesin M., M. Ramirez e A. Tomasz. 1998. Capsular transformation of a multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in vivo. *J Infect Dis.* 177: 707-13.

Nunes S., R. Sa-Leao, J. Carrico, C. Alves, R. Mato, A. Avo, J. Saldanha, J. Almeida, I. Sanches e H. de Lencastre. 2005. Trends in drug resistance, serotypes, and molecular types of *Streptococcus pneumoniae* colonizing preschool-age children attending day care centers in Lisbon, Portugal: a summary of 4 years of annual surveillance. *J Clin Microbiol.* 43(3):1285-93.

Obaro S. 2002. The new pneumococcal vaccine. *Clin Microbiol Infect.* 8: 623-33.

Ogunniyi A., R. Folland, D. Briles, S. Hollingshead e J. Paton. 2000. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 68(5):3028-33.

Orihuela C., J. Radin, J. Sublett, G. Gao, D. Kaushal, E. Tuomanen. 2004a. Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun.* 72(10):5582-96.

Orihuela C., G. Gao, K. Francis, J. Yu e E. Tuomanen. 2004b. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis.* 190(9):1661-9.

Orihuela C. e E. Tuomanen. 2006. *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation, p. 253-67. In: V. Fischetti, R. Novick, J. Ferreti, D. Portnoy e J. Rood (eds). Gram-Positive Pathogens, 2ª edição, American Society for Microbiology Press, EUA.

Oteo J., E. Lazaro, F. de Abajo, F. Baquero, J. Campos; Spanish Members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2004. Trends in antimicrobial resistance in 1,968 invasive *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Spanish hospitals (2001 to 2003): decreasing penicillin resistance in children's isolates. *J Clin Microbiol.* 42(12):5571-7.

Overweg K., A. Kerr, M. Sluijter, M. Jackson, T. Mitchell, A. de Jong, R. de Groot, P. Hermans. 2000a. The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses. *Infect Immun.* 68(7):4180-8.

Overweg K., C. Pericone, G. Verhoef, J. Weiser, H. Meiring, A. de Jong, R. de Groot e P. Hermans. 2000. Differential protein expression in phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 68(8):4604-10.

Pai R., R. Gertz, C. Whitney e B. Beall. 2005a. Clonal association between *Streptococcus pneumoniae* serotype 23A, circulating within the United States, and an internationally dispersed clone of serotype 23F. *J Clin Microbiol.* 43(11):5440-4.

Pai R., J. Limor e B. Beall. 2005b. Use of pyrosequencing to differentiate *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Clin Microbiol.* 43(9):4820-2.

Pai R., M. Moore, T. Pilishvili, R. Gertz, C. Whitney, B. Beall; Active Bacterial Core Surveillance Team. 2005. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis.* 192(11):1988-95.

Pan X-S., J. Ambler, S. Mehtar e M. Fisher. 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 2321-6.

Pantosti A., D. Boccia, F. D'Ambrosio, S. Recchia, G. Orefici, M. Moro; National Surveillance of Bacterial Meningitis; Earss-Italia Study. 2003. Inferring the potential success of pneumococcal vaccination in Italy: serotypes and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive diseases. *Microb Drug Resist.* 9 Suppl 1:S61-8.

Paraskakis I., D. Kafetzis, A. Chrisakis, H. Papavasiliou, H. Kirikou, A. Pangalis, L. Tzouveleakis, T. Athanasiou, N. Legakis; National Surveillance Network for Pneumococcal Resistance. 2006. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001-2004. *Clin Microbiol Infect.* 12(5):490-3.

Park I., D. Pritchard, R. Cartee, A. Brandao, M. Brandileone e M. Nahm. 2007. Discovery of a New Capsular Serotype (6C) within Serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 45(4):1225-33.

Paul J. 1934. Pneumococcus variants. I. Intermediate forms and the influence of environment in their production during *in-vitro* S to R and R to S transitions. *J. Bacteriol.* 28: 45-68.

Pérez-Trallero E., C. Fernández-Mazarrasa, C. García-Rey, E. Bouza, L. Aguilar, J. García-De-Lomas, F. Baquero; The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. 2001. Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 3334-40.

Pericone C., K. Overweg, P. Hermans e J. Weiser. 2000. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun.* 68(7):3990-7.

Pettigrew M., K. Fennie, M. York, J. Daniels e F. Ghaffar. 2006. Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. *Infect Immun.* 74(6):3360-5.

Pihlajamaki M., P. Kotilainen, T. Kaurila, T. Klaukka, E. Palva, P. Huovinen; Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe-Network). 2001. Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and use of antimicrobial agents. *Clin Infect Dis.* 33(4):483-8.

Pincus S., R. Cole, M. Wessels, M. Corwin, E. Kamanga-Sollo, S. Hayes, W. Cieplak Jr e J. Swanson. 1992. Group B streptococcal opacity variants. *J Bacteriol.* 174(11):3739-49.

Poehling K., T. Talbot, M. Griffin, A. Craig, C. Whitney, E. Zell, C. Lexau, A. Thomas, L. Harrison, A. Reingold, J. Hadler, M. Farley, B. Anderson e W. Schaffner. 2006. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA.* 295(14):1668-74.

Porat N., G. Barkai, M. Jacobs, R. Trefler e R. Dagan. 2004. Four antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones unrelated to the pneumococcal conjugate vaccine serotypes, including 2 new serotypes, causing acute otitis media in southern Israel. *J Infect Dis.* 189(3):385-92.

Porat N., D. Greenberg, N. Givon-Lavi, D. Shuval, R. Trefler, O. Segev, W. Hanage e R. Dagan. 2006. The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis.* 194(5):689-96.

Porat N., R. Trefler e R. Dagan. 2001. Persistence of two invasive *Streptococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in southern Israel. *J Clin Microbiol.* 39(5):1827-32.

Poulsen K., J. Reinholdt e M. Kilian. 1996. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) and its translation product. *Infect Immun.* 64(10):3957-66.

Pracht D., C. Elm, J. Gerber, S. Bergmann, M. Rohde, M. Seiler, K. Kim, H. Jenkinson, R. Nau e S. Hammerschmidt. 2005. PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun.* 73(5):2680-9.

Prescott L., J. Harley e D. Kein. 1996. Microbiology, 3ª edição. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, EUA.

Radin J., C. Orihuela, G. Murti, C. Guglielmo, P. Murray e E. Tuomanen. 2005. Beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 73(12):7827-35.

Ramirez M., E. Severina e A. Tomasz. 1999. A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 181(12):3618-25.

Read R., I. Morrissey e J. Ambler. 2002. Clinician's Manual on Respiratory Tract Infections and Fluoroquinolones, 2ª edição. Science Press, Reino Unido.

Regev-Yochay G., M. Raz, R. Dagan, N. Porat, B. Shainberg, E. Pinco, N. Keller e E. Rubinstein. 2004. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis.* 38(5):632-9.

Reichmann P., A. Konig, A. Marton e R. Hakenbeck. 1996. Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2(2):177-81.

Reinert R., S. Haupts, M. van der Linden, C. Heeg, M. Cil, A. Al-Lahham e D. Fedson. 2005a. Invasive pneumococcal disease in adults in North-Rhine Westphalia, Germany, 2001-2003. *Clin Microbiol Infect.* 11(12):985-91.

Reinert R., M. Jacobs, P. Appelbaum, S. Bajaksouzian, S. Cordeiro, M. van der Linden e A. Al-Lahham. 2005b. Relationship between the original multiply resistant South African isolates of *Streptococcus pneumoniae* from 1977 to 1978 and contemporary international resistant clones. *J Clin Microbiol.* 43(12):6035-41.

Reinert R., A. Ringelstein, M. van der Linden, M. Cil, A. Al-Lahham e F. Schmitz. 2005c. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol.* 43(3):1294-300.

Reinert R., A. Wild, P. Appelbaum, R. Luttkick, M. Cil e A. Al-Lahham. 2003. Ribosomal mutations conferring resistance to macrolides in *Streptococcus pneumoniae* clinical strains isolated in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(7):2319-22.

Ren B., M. McCrory, C. Pass, D. Bullard, C. Ballantyne, Y. Xu, D. Briles e A. Szalai. 2004. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol.* 173(12):7506-12.

Ren B., A. Szalai, O. Thomas, S. Hollingshead e D. Briles. 2003. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 71(1):75-85.

Ring A., J. Weiser e E. Tuomanen. 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest.* 102(2):347-60.

Roberts M., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. Jensen, J. Rood e H. Seppala. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 2823-30.

Roberts R., A. Tomasz, A. Corso, J. Hargrave, E. Severina; The PRP Collaborative Study Group. 2001. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in metropolitan New York hospitals: case control study and molecular typing of resistant isolates. *Microb Drug Resist.* 7: 137-52.

Robinson D., D. Briles, M. Crain e S. Hollingshead. 2002. Evolution and virulence of serogroup 6 pneumococci on a global scale. *J Bacteriol.* 184(22):6367-75.

Rosenow C., P. Ryan, J. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist e H. Masure. 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 25(5):819-29.

Saeland E., H. Jakobsen, G. Ingolfsdottir, S. Sigurdardottir e I. Jonsdottir. 2000. Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies. *Microb Pathog.* 29(2):81-91.

Sahu R., S. Mordechai, S. Pesakhov, R. Dagan e N. Porat. 2006. Use of FTIR spectroscopy to distinguish between capsular types and capsular quantities in *Streptococcus pneumoniae*. *Biopolymers.* 83(4):434-42.

Saito T., T. Takatsuka, T. Kato, K. Ishihara e K. Okuda. 1997. Adherence of oral streptococci to an immobilized antimicrobial agent. *Arch Oral Biol.* 42(8):539-45.

Salamon H., M. Segal, A. de Leon e P. Small. 1998. Accommodating error analysis in comparison and clustering of molecular fingerprints. *Emerg Infect Dis.* 4: 159-68.

Sá-Leão R., A. Simões, S. Nunes, N. Sousa, N. Frazão e H. de Lencastre. 2006. Identification, prevalence and population structure of non-typable *Streptococcus pneumoniae* in carriage samples isolated from preschoolers attending day-care centres. *Microbiology*. 152(Pt 2):367-76.

Sá-Leão R., A. Tomasz, I. Sanches e H. de Lencastre. 2002. Pilot study of the genetic diversity of the pneumococcal nasopharyngeal flora among children attending day care centers. *J Clin Microbiol*. 40: 3577-85.

Sá-Leão R., A. Tomasz, I. Sanches, S. Nunes, C. Alves, A. Brito-Avô, J. Saldanha, K. Kristinsson e H. de Lencastre. 2000. Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptibility and -resistant *Streptococcus pneumoniae* colonising children: day care centers as autonomous epidemiological units. *J Clin Microbiol*. 38: 4137-44.

Sá-Leão R., A. Tomasz e H. de Lencastre. 2001. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* clones with unusual drug resistance patterns: genetic backgrounds and relatedness to other epidemic clones. *J Infect Dis*. 184(9):1206-10.

Saluja S. e J. Weiser. 1995. The genetic basis of colony opacity in *Streptococcus pneumoniae*: evidence for the effect of box elements on the frequency of phenotypic variation. *Mol Microbiol*. 16(2):215-27.

Salyers A. e D. Whitt. 2001. Bacterial Pathogenesis: a molecular approach, 2ª edição. Amer Society for Microbiology, EUA.

Sandgren A., K. Sjostrom, B. Olsson-Liljequist, B. Christensson, A. Samuelsson, G. Kronvall e B. Normark. 2004. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 189(5):785-96.

Santagati M., F. Iannelli, M. Oggioni, S. Stefani e G. Pozzi. 2000. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44(9):2585-7.

Schito G. 2002. Is antimicrobial resistance also subject to globalization? *Clin Microbiol Infect*. 8(suppl. 3): 1-8.

Schrag S., B. Beall e S. Dowell. 2000. Limiting the spread of resistant pneumococci: biological and epidemiological evidence for the effectiveness of alternative interventions. *Clin Microbiol Rev*. 13: 588-601.

Schurek K., H. Adam, D. Hoban e G. Zhanel. 2006. Call for the international adoption of microbiological breakpoints for fluoroquinolones and *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 28(3):266-9.

Sebert M., L. Palmer, M. Rosenberg e J. Weiser. 2002. Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun*. 70(8):4059-67.

Shah P. e E. Swiatlo. 2006. Immunization with polyamine transport protein PotD protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 74(10):5888-92.

Shakhnovich E., S. King e J. Weiser. 2002. Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect Immun*. 70(12):7161-4.

Shaper M., S. Hollingshead, W. Benjamin Jr e D. Briles. 2004. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun.* 72(9):5031-40.

Shapiro E., A. Berg, R. Austrian, D. Schroeder, V. Parcells, A. Margolis, R. Adair e J. Clemens. 1991. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med.* 325(21):1453-60.

Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation-a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(2):522-5.

Sjostrom K., C. Spindler, A. Ortqvist, M. Kalin, A. Sandgren, S. Kuhlmann-Berenzon, B. Henriques-Normark. 2006. Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis.* 42(4):451-9.

Sleeman K., K. Knox, R. George, E. Miller, P. Waight, D. Griffiths, A. Efstratiou, K. Broughton, R. Mayon-White, E. Moxon, D. Crook; Public Health Laboratory Service; Oxford Pneumococcal Surveillance Group. 2001. Invasive pneumococcal disease in England and Wales: vaccination implications. *J Infect Dis.* 183(2):239-46.

Smith A. e K. Klugman. 2001. Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(8):2393-6.

Smith A. e K. Klugman. 2005. Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level beta-lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(11):4622-7.

Smith B. e M. Hostetter. 2000. C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 182(2):497-508.

Smithson S., K. Kolibab, A. Shriner, N. Srivastava, S. Khuder, M. Westerink. 2005. Immune response to pneumococcal polysaccharides 4 and 14 in elderly and young adults: analysis of the variable light chain repertoire. *Infect Immun.* 73(11):7477-84.

Smith-Vaughan H., R. Byun, M. Nadkarni, N. Jacques, N. Hunter, S. Halpin, P. Morris e A. Leach. 2006. Measuring nasal bacterial load and its association with otitis media. *BMC Ear Nose Throat Disord.* 10;6:10.

Soares S., K. Kristinsson, J. Musser e A. Tomasz. 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis.* 168: 158-63.

Song J., H. Chang, J. Suh, K. Ko, S. Jung, W. Oh, K. Peck, N. Lee, Y. Yang, A. Chongthaleong, N. Aswapokee, C. Chiu, M. Lalitha, J. Perera, T. Yee, G. Kumarasinghe, F. Jamal, A. Kamarulazaman, N. Parasakthi, P. Van, T. So, T. Ng; ANSORP Study Group. 2004. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). *J Antimicrob Chemother.* 53(3):457-63.

Song J., S. Jung, K. Ko, N. Kim, J. Son, H. Chang, H. Ki, W. Oh, J. Suh, K. Peck, N. Lee, Y. Yang, Q. Lu, A. Chongthaleong, C. Chiu, M. Lalitha, J. Perera, T. Yee, G. Kumarasinghe, F. Jamal, A. Kamarulzaman, N. Parasakthi, P. Van, C. Carlos, T. So, T. Ng, A. Shibl. 2004a. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrob Agents Chemother.* 48(6):2101-7.

Sørensen U. 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol.* 31: 2097-100.

Spellerberg B., D. Cundell, J. Sandros, B. Pearce, I. Idanpaan-Heikkila, C. Rosenow e H. Masure. 1996. Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 19(4):803-13.

Spratt B. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol.* 2(3):312-6.

Spreer A., A. Lis, J. Gerber, R. Reinert, H. Eiffert, R. Nau. 2004. Differences in clinical manifestation of *Streptococcus pneumoniae* infection are not correlated with in vitro production and release of the virulence factors pneumolysin and lipoteichoic and teichoic acids. *J Clin Microbiol.* 42(7):3342-5.

St Sauver J., C. Marrs, B. Foxman, P. Somsel, R. Madera e J. Gilsdorf. 2000. Risk factors for otitis media and carriage of multiple strains of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 6(6):622-30.

Standiford H. 2000. Tetracyclines and chloramphenicol, p. 336-48. In G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5ª edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.

Steenhoff A., S. Shah, A. Ratner, S. Patil e K. McGowan. 2006. Emergence of vaccine-related pneumococcal serotypes as a cause of bacteremia. *Clin Infect Dis.* 42(7):907-14.

Steinmoen H., E. Knutsen e L. Havarstein. 2002. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(11):7681-6.

Steinmoen H., A. Teigen e L. Havarstein. 2003. Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J Bacteriol.* 185(24):7176-83.

Stroehler U. e J. Paton. 2007. Genetic analysis of pneumococcal colony opacity phase variation. *Europneumo*, Oeiras, Portugal, 14-17 de Abril. Póster.

Suresh M., S. Singh, D. Ferguson Jr e A. Agrawal. 2006. Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from pneumococcal infection. *J Immunol.* 176(7):4369-74.

Swanson J. 1982. Colony opacity and protein II compositions of gonococci. *Infect Immun.* 37(1):359-68.

Swanson J. e M. McCarty. 1969. Electron microscopic studies on opaque colony variants of group A Streptococci. *J Bacteriol.* 100(1):505-11.

Syrogianopoulos G., G. Katopodis, I. Grivea e N. Beratis. 2002. Antimicrobial use and serotype distribution of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered from Greek children younger than 2 years old. *Clin Infect Dis.* 35(10):1174-82.

Szalai A., D. Briles e J. Volanakis. 1996. Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 64(11):4850-3.

Szu S., C. Lee, J. Parke Jr, G. Schiffman, J. Henrichsen, R. Austrian, S. Rastogi e J. Robbins. 1982. Cross-immunogenicity of pneumococcal group 9 capsular polysaccharides in adult volunteers. *Infect Immun.* 35(3):777-82.

Tankovic J., B. Perichon, J. Duval e P. Courvalin. 1996. Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained *in vivo* and *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 2505-10.

Telford J., M. Barocchi., I. Margarit, R. Rappuoli e G. Grandi. 2006. Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 4(7):509-19.

Tettelin H., K. Nelson, I. Paulsen, J. Eisen, T. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. DeBoy, D. Haft, R. Dodson, A. Durkin, M. Gwinn, J. Kolonay, W. Nelson, J. Peterson, L. Umayam, O. White, S. Salzberg, M. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. Wolf, T. Utterback, C. Hansen, L. McDonald, T. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. Hickey, I. Holt, B. Loftus, F. Yang, H. Smith, J. Venter, B. Dougherty, D. Morrison, S. Hollingshead e C. Fraser. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* 293(5529):498-506.

Tettelin H. e S. Hollingshead. 2004. Comparative genomics of *Streptococcus pneumoniae*: intrastrain diversity and genome plasticity, p 15-29. *In:* E. Tuomanen, T. Mitchell, D. Morrison e B. Spratt (eds). The Pneumococcus. American Society for Microbiology Press, EUA.

Thornsberry C., D. Sahm, L. Kelly, I. Critchley, M. Jones, A. Evangelista e J. Karlowky. 2002. Regional trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the United States: results from the TRUST surveillance program, 1999-2000. *Clin Infect Dis.* 34(suppl. 1): S4-S16.

Tomasz A. 1967. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus. *Science.* 157(789):694-7.

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

Tomasz A. e W. Fischer. 2006. The cell Wall of *Streptococcus pneumoniae*, p. 230-40. *In:* V. Fischetti, R. Novick, J. Ferreti, D. Portnoy e J. Rood (eds). Gram-Positive Pathogens, 2ª edição, American Society for Microbiology Press, EUA.

Tong H., I. Grants, X. Liu e T. DeMaria. 2002. Comparison of alteration of cell surface carbohydrates of the chinchilla tubotympanum and colonial opacity phenotype of *Streptococcus pneumoniae* during experimental pneumococcal otitis media with or without an antecedent influenza A virus infection. *Infect Immun.* 70(8):4292-301.

Tuomanen E. 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr Opin Microbiol.* 2(1):35-9.

Tuomanen E. 2000. Pathogenesis of pneumococcal inflammation: otitis media. *Vaccine.* 19 Suppl 1:S38-40.

Tuomanen E. e H. Masure. 1997. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Microb Drug Resist.* 3(4):297-308.

van Berkel P., M. Geerts, H. van Veen, P. Kooiman, F. Pieper, H. de Boer e J. Nuijens. 1995. Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem J.* 312 ( Pt 1):107-14.

van der Woude M. 2006. Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett.* 254(2):190-7.

van Merode A., H. van der Mei, H. Busscher, K. Waar e B. Krom. 2006. Enterococcus faecalis strains show culture heterogeneity in cell surface charge. *Microbiology.* 152(Pt 3):807-14.

Vaz Pato M., C. Carvalho, A. Tomasz; The Multicenter Study Group. 1995. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Portugal. A multicenter study between 1989 and 1993. *Microb Drug Resist.* 1: 59-69.

Vila-Córcoles A., O. Ochoa-Gondar, I. Hospital, X. Ansa, A. Vilanova, T. Rodriguez, C. Llor; EVAN Study Group. 2006. Protective effects of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in the elderly population: the EVAN-65 study. *Clin Infect Dis.* 43(7):860-8.

Vollmer W. e A. Tomasz. 2001. Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 39(6):1610-22.

Waite R., J. Struthers e C. Dowson. 2001. Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type 3 capsule locus causes high-frequency phase variation. *Mol Microbiol.* 42(5):1223-32.

Waite R., D. Penfold, J. Struthers e C. Dowson. 2003. Spontaneous sequence duplications within capsule genes *cap8E* and *tts* control phase variation in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. *Microbiology.* 149(Pt 2):497-504.

Walport M. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 344(14):1058-66.

Wang H., R. Huebner, M. Chen e K. Klugman. 1998. Antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* in China and comparison of MICs by agar dilution and E-test methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 2633-6.

Wani J., J. Gilbert, A. Plaut e J. Weiser. 1996. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 64(10):3967-74.

Ware D., Y. Jiang, W. Lin e E. Swiatlo. 2006. Involvement of *potD* in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis. *Infect Immun.* 74(1):352-61.

Weiser J. 1993. Relationship between colony morphology and the life cycle of *Haemophilus influenzae*: the contribution of lipopolysaccharide phase variation to pathogenesis. *J Infect Dis.* 168(3):672-80.

Weiser J., R. Austrian, P. Sreenivasan e H. Masure. 1994. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun.* 62(6):2582-9.

Weiser J., D. Bae, H. Epino, S. Gordon, M. Kapoor, L. Zenewicz e M. Shchepetov. 2001. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 69(9):5430-9.

Weiser J., D. Bae, C. Fasching, R. Scamurra, A. Ratner e E. Janoff. 2003. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7):4215-20.

Weiser J., J. Goldberg, N. Pan, L. Wilson e M. Virji. 1998. The phosphorylcholine epitope undergoes phase variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* 66(9):4263-7.

Weiser J., Z. Markiewicz, E. Tuomanen e J. Wani. 1996. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 64(6):2240-5.

Weiser J., N. Pan, K. McGowan, D. Musher, A. Martin e J. Richards. 1998a. Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med.* 187(4):631-40.

Weiser J., M. Shchepetov e S. Chong. 1997. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 65(3):943-50.

Whalen R. 1996. DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if? *Emerg Infect Dis.* 2(3):168-75.

Whitney C., M. Farley, J. Hadler, L. Harrison, N. Bennett, R. Lynfield, A. Reingold, P. Cieslak, T. Pilishvili, D. Jackson, R. Facklam, J. Jorgensen, A. Schuchat; The Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. 2003. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 348: 1737-46.

Whitney C., W. Schaffner e J. Butler. 2001. Rethinking recommendations for use of pneumococcal vaccines in adults. *Clin Infect Dis.* 33: 662-75.

WHO, World Health Organisation, Geneva. 1999. Weekly epidemiological record. 74: 177-184.

Wilcox M. 1997. Chloramphenicol and thiamphenicol, p. 328-32. In F. O'Grady, H. Lambert, R. Finch e D. Greenwood. Antibiotic and Chemotherapy, 7ª edição. Churchill Livingstone, EUA.

Wilson W., M. Wade, S. Holman e F. Champlin. 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J Microbiol Methods.* 43(3):153-64.

Woodford N., A. Johnson, D. Morrison e D. Speller. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin Microbiol Rev.* 8: 585-615.

Yaro S., M. Lourd, Y. Traore, B. Njanpop-Lafourcade, A. Sawadogo, L. Sangare, A. Hien, M. Ouedraogo, O. Sanou, I. du Chatelet, J. Koeck e B. Gessner. 2006. Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. *Clin Infect Dis.* 43(6):693-700.

Yother J. e S. Hollingshead. 2006. Genetics of *Streptococcus pneumoniae*, p. 275-88. In: V. Fischetti, R. Novick, J. Ferreti, D. Portnoy e J. Rood (eds). Gram-Positive Pathogens, 2ª edição, American Society for Microbiology Press, EUA.

Yother J., K. Leopold, J. White e W. Fischer. 1998. Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J Bacteriol.* 180(8):2093-101.

Zahner D. e R. Hakenbeck. 2000. The *Streptococcus pneumoniae* beta-galactosidase is a surface protein. *J Bacteriol.* 182(20):5919-21.

Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415(6870):389-95.

Zinner S. e K. Mayer. 2000. Sulfonamides and trimethoprim, p. 394-404. *In* G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5ª edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.

Zubay G., W. Parson e D. Vance. 1995. Principles of Biochemistry. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, EUA.