

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



INFECÇÃO PNEUMOCÓCICA INVASIVA NO ADULTO EM PORTUGAL EM 2008 E 2009

Andreia das Neves Horácio

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



INFECÇÃO PNEUMOCÓCICA INVASIVA NO ADULTO EM PORTUGAL EM 2008 E 2009

Dissertação orientada por Prof. Doutor José Melo Cristino (FMUL)
e Prof. Doutora Lélia Chambel (FCUL-BioFIG)

Andreia das Neves Horácio

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011



INFEÇÃO PNEUMOCÓCICA INVASIVA NO ADULTO EM PORTUGAL EM 2008 E 2009

Andreia das Neves Horácio

TESE DE MESTRADO

2011

Esta tese foi realizada no Instituto de Microbiologia do Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, sob a orientação directa do Prof. Doutor José Melo Cristino.

A Prof. Doutora Lélia Chambel foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Doutor José Melo Cristino, meu orientador externo, pela sua supervisão, revisão da dissertação e pela oportunidade de integração num projecto de investigação aliciante.

Agradeço ao Prof. Doutor Mário Ramirez por toda a atenção dispensada e pelo seu empenho ao providenciar as melhores condições para a realização desta tese.

Agradeço à Prof. Doutora Lélia Chambel, minha orientadora interna, pela revisão da dissertação, pela sua disponibilidade e pelos seus conselhos.

À Sandra Aguiar, minha tutora em laboratório, agradeço a transmissão de conhecimentos e as suas sugestões ao trabalho escrito.

Agradeço à D.^a Leticia Santos, à Sandra Matos e à Vânia Silva pela sua contribuição para este trabalho, nomeadamente, a realização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Microbiologia pelo seu companheirismo.

Aos meus pais e aos meus irmãos agradeço o incentivo, o apoio e a confiança.

Dedico esta tese ao Miguel, a quem agradeço por tudo.

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é um microrganismo patogénico do Homem, responsável por elevadas taxas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo. A epidemiologia da infecção pneumocócica tem sido fundamental para avaliar a adaptação deste microrganismo à pressão imposta pela vacinação e uso de antibióticos.

Esta tese teve como objectivo caracterizar feno e genotipicamente uma colecção de 425 estirpes de pneumococos responsável por infecção invasiva em adultos (18 a 64 anos de idade), em 2008 e 2009, em Portugal. Visto que no período em análise esteve disponível a vacina anti-pneumocócica conjugada 7-valente (PCV7), pretendeu-se ainda comparar estes resultados com os referentes ao período pré-vacinal de modo a avaliar o possível impacto da vacinação das crianças, na população pneumocócica que afecta os adultos.

A caracterização fenotípica consistiu na serotipagem e determinação das taxas de susceptibilidade a diferentes classes de antimicrobianos, e a caracterização genotípica consistiu na determinação dos perfis de macrorestrição, obtidos por electroforese em gel de campo pulsado (PFGE), e perfis de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e ainda na detecção da presença e distribuição das ilhas de patogenezidade que codificam para os pili tipo 1 (PI-1) e 2 (PI-2).

Os serotipos 1, 3, 7F, 14 e 19A foram os mais frequentes, tendo provocado cerca de 50% das infecções. A não susceptibilidade à penicilina e eritromicina foi observada em 16,7% e em 14,6% das estirpes, respectivamente. Os complexos clonais CC306, CC156, CC191, CC62, CC180 e CC230 surgiram em aproximadamente metade das estirpes analisadas por MLST. As ilhas de patogenezidade PI-1 e PI-2 foram identificadas em 13,3% e em 28% das estirpes, respectivamente. Entre o período pré-vacinal e o analisado neste trabalho observou-se uma diminuição significativa da proporção de infecções provocadas pelo serotipo 4, um aumento significativo, para cerca do dobro, da não susceptibilidade à eritromicina e uma emergência de linhagens genéticas pré-existentes.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; infecção pneumocócica invasiva; adulto; serotipo; genotipo; vacina polissacarídica conjugada 7-valente.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a human pathogen responsible for high rates of morbidity and mortality worldwide. The epidemiology of pneumococcal infections has been critical to evaluate the adaptation of this microorganism to the pressure imposed by vaccination and antimicrobial use.

The aim of this thesis was to characterize pheno and genotypically a collection of 425 pneumococcal strains responsible for invasive pneumococcal disease in adults (with 18 to 64 years old), in 2008 and 2009, in Portugal. A pneumococcal 7-valent conjugate vaccine (PCV7) was available in this period and so, this thesis also aims to compare these results with the ones obtained in the pre-vaccine era, to evaluate the possible impact that vaccinating children with this vaccine might have had in the adult pneumococcal population.

Phenotypic characterization consisted in serotyping and in antimicrobial susceptibility profiling of the bacterial isolates, while the genotypic characterization consisted in the determination of the macrorestriction profiles, obtained by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and Multi Locus Sequence Typing (MLST) profiles and also in the detection of the presence and distribution of the pathogenicity islands that encode pilus like structures, PI-1 and PI-2.

Serotypes 1, 3, 7F, 14 and 19A were the most frequent, being responsible for almost 50% of all infections. Penicillin and erythromycin non-susceptibility were detected in 16,7% and 14,6% of the bacterial isolates, respectively. Clonal complexes CC306, CC156, CC191, CC62, CC180 and CC230 appeared in almost half of strains analyzed by MLST. Pathogenicity islands PI-1 and PI-2 were identified in 13,3% and 28% of all isolates. Between the pre-vaccine period and the one analyzed in this study, the proportions of serotype 4 infections have significantly decreased, erythromycin non-susceptibility has significantly doubled, and an emergence of the already existent genetic lineages occurred.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; invasive pneumococcal disease; adult; serotype; genotype; heptavalent pneumococcal conjugate vaccine.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE QUADROS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Colonização pneumocócica	1
1.2 Infecção pneumocócica	1
1.3 Epidemiologia dos serotipos de pneumococos	2
1.4 Resistência aos antimicrobianos em pneumococos	2
1.5 Genotipagem em pneumococos	3
1.5.1 PFGE	4
1.5.2 MLST	4
1.6 Vacinas anti-pneumocócicas	5
1.6.1 Vacina polissacarídica	5
1.6.2 Vacinas polissacarídicas conjugadas	5
1.7 Pilus 1 e 2 de pneumococos	6
1.7.1 Pilus 1	7
1.7.2 Pilus 2	7
1.7.3 Utilização de pili na construção de uma vacina	7
2. OBJECTIVOS	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 Colecção de estirpes	9
3.2 Confirmação do agente bacteriano	9
3.2.1 Hemólise em gelose sangue-de-carneiro.	9
3.2.2 Susceptibilidade à optoquina.	9
3.2.3. Solubilidade em sais de bÍlis	10
3.3 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos	10

3.3.1 <i>Etest</i>	10
3.3.2 Difusão em agar	10
3.3.3 Fenotipos de resistência aos macrólidos	10
3.4 Serotipagem	11
3.5 PFGE	12
3.5.1 Imobilização do DNA bacteriano em discos de agarose	12
3.5.2 Restrição do DNA bacteriano	13
3.5.3 Electroforese em gel de campo pulsado	13
3.5.4 Análise dos perfis de macrorestrição	13
3.6 MLST	14
3.6.1 Obtenção do DNA cromossómico	14
3.6.2 Amplificação por PCR dos fragmentos internos de 7 genes conservados	14
3.6.3 Purificação	14
3.6.4 Sequenciação	14
3.6.5 Identificação de alelos e perfis alélicos	14
3.7 Pesquisa das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2	15
3.7.1 Obtenção do DNA cromossómico	15
3.7.2 Pesquisa da ilha de patogenicidade PI-1	15
3.7.3 Pesquisa da ilha de patogenicidade PI-2	15
3.8 Análise estatística	18
4. RESULTADOS	19
4.1 População em estudo	19
4.1.1 Distribuição das estirpes por idade e sexo dos doentes	19
4.1.2 Sazonalidade	19
4.1.3 Amostras biológicas	20
4.2 Serotipagem	20
4.2.1 Distribuição dos serotipos em 2008 e 2009	20
4.2.2 Distribuição dos serotipos por idade e sexo dos doentes	20
4.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos	23
4.3.1 Susceptibilidade geral	23
4.3.3 Serotipos associados à não susceptibilidade aos antimicrobianos	24
4.3.4 Fenotipos de resistência aos macrólidos e serotipos associados	25

4.4 Perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, e perfis de MLST	26
4.4.1 Serotipo 1	28
4.4.2 Serotipo 3	29
4.4.3 Serotipo 7F	29
4.4.4 Serotipo 14	30
4.4.5 Serotipo 19A	30
4.4.6 Serotipo 8	31
4.4.7 Serotipo 4	32
4.4.8 Serotipo 9V	33
4.4.9 Serotipo 19F	33
4.5 Distribuição das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2	34
5. DISCUSSÃO	36
5.1 População em estudo	36
5.2 Serotipagem	37
5.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos	38
5.4 Caracterização genética das estirpes por PFGE e MLST	40
5.5 Distribuição das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2	42
5.6 Limitações do estudo	42
6. CONCLUSÃO	44
7. ANEXOS	45
7.1 Anexo 1	45
7.2 Anexo 2	46
7.3 Anexo 3	47
8. REFERÊNCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Taxa de mortalidade, por 100 000 habitantes, em crianças menores de 5 anos de idade.....	2
Figura 2: Distribuição das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009, em função da idade e sexo dos doentes	19
Figura 3: Distribuição sazonal das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	19
Figura 4: Frequência dos serotipos de pneumococos isolados de infecção invasiva em adultos nos anos de 2008 e 2009.....	21
Figura 5: Distribuição dos serotipos de pneumococos pelas faixas etárias [18-49] e [50-64] anos e pelo sexo dos doentes, nos anos de 2008 e 2009.....	22
Figura 6: Susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009	23
Figura 7: Fenotipos de resistência aos macrolídeos das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009	26
Figura 8: Fotografia de um gel de PFGE	28
Figura 9: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 1, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.	28
Figura 10: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 3, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	29
Figura 11: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 7F, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	29
Figura 12: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 14, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	30
Figura 13: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 19A, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	31
Figura 14: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 8, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	32

Figura 15: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 4, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	32
Figura 16: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 9V, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.....	33
Figura 17: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 19F, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009..	33
Figura 18: Distribuição das ilhas PI-1 e PI-2 de acordo com os serotipos em que foram detectadas.....	34

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Descrição e concentração dos antimicrobianos utilizados.....	11
Quadro 2: Sistema em xadrez de serotipagem de <i>S. pneumoniae</i>	12
Quadro 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reacções de PCR.	16
Quadro 4: Componentes e respectivos volumes utilizados nas reacções de PCR.	17
Quadro 5: Programas de PCR.....	17
Quadro 6: Programa de PCR utilizado para amplificar os fragmentos dos genes <i>aroE</i> , <i>gki</i> , <i>gdh</i> , <i>ddl</i> , <i>xpt</i> e <i>spi</i> , na técnica de MLST.	18
Quadro 7: Programa de PCR utilizado para amplificar a ilha de patogenicidade PI-1.....	18
Quadro 8: Componentes e volumes utilizados para amplificar a ilha de patogenicidade PI-1..	18
Quadro 9: Serotipos de pneumococos isolados de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009, que apresentaram as maiores taxas de não susceptibilidade aos antimicrobianos... 24	24
Quadro 10: Serotipos isolados de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009, que apresentaram fenótipos MLS _B e M de resistência aos macrólidos.....	26
Quadro 11: Coeficientes de Wallace dos três métodos de tipagem em relação: aos métodos de tipagem, perfis de resistência aos antibióticos e ilhas de patogenicidade.	45
Quadro 12: Valores de <i>odds ratio</i> (OR) e intervalos de confiança a 95%.....	46
Quadro 13: Linhagens de PFGE, perfis alélicos e complexos clonais dos serotipos não representados em dendrogramas.	47

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é uma bactéria Gram-positiva, alfa-hemolítica, solúvel em sais biliares e, geralmente, sensível à optoquina [2]. Esta espécie bacteriana foi identificada pela primeira vez em 1881, em simultâneo e de forma independente, por Louis Pasteur e George M. Stemberg. A sua importância como agente causador de pneumonia e meningite foi estabelecida pouco tempo depois, ainda na mesma década [66]. Actualmente, os pneumococos são responsáveis por elevadas taxas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo. A epidemiologia da infecção pneumocócica revela-se de extrema importância para adaptar a terapêutica antimicrobiana prescrita empiricamente e para avaliar a eficácia das vacinas anti-pneumocócicas disponíveis.

1.1 Colonização pneumocócica

A nasofaringe humana constitui o habitat natural dos pneumococos. Pensa-se que todos os indivíduos se encontrem colonizados por este microrganismo, pelo menos uma vez na sua vida [22]. A taxa de colonização varia consideravelmente com a faixa etária, sendo muito mais frequente em crianças que em adultos. Nas crianças, as taxas de colonização diminuem com o aumento da idade, mas nos adultos esta tendência é inversa, ocorrendo um aumento da colonização com o aumento da idade. As crianças são as principais portadoras e transmissoras de pneumococos para a comunidade. Isto é comprovado pelas superiores taxas de colonização verificadas em adultos que co-habitam com crianças, face às relativas aos adultos que não convivem habitualmente com estas [30]. Num estudo de colonização feito a uma população aborígine australiana, uma população relativamente isolada e caracterizada pela elevada incidência de infecção pneumocócica, foi reportada uma prevalência de colonização de 64,8% em crianças e de 22,8% em adultos [37]. Em Portugal ainda só se realizaram estudos de colonização em crianças tendo-se reportado uma taxa de 61,3% nas crianças com seis meses a seis anos de idade [53].

1.2 Infecção pneumocócica

A colonização por pneumococos é geralmente assintomática, mas constitui também o primeiro passo para o desenvolvimento de infecção. As infecções pneumocócicas variam na sua gravidade, podendo ser invasivas ou não invasivas, de acordo com a presença ou ausência, respectivamente, do microrganismo em locais anatómicos considerados habitualmente estéreis. Exemplos de infecções não invasivas são a otite média aguda e sinusite, e exemplos de infecções invasivas são a meningite e septicemia [19]. A pneumonia é uma das infecções pneumocócicas mais relevantes, que pode ser considerada invasiva ou não invasiva, consoante o isolamento ou não, respectivamente, do microrganismo a partir do sangue do doente.

Certos grupos de risco apresentam uma maior propensão para a infecção pneumocócica. As crianças menores de dois anos de idade, os adultos de idade igual ou superior a 65 anos e os indivíduos imunocomprometidos são os mais afectados por estas infecções [50].

Segundo a Organização Mundial de Saúde ocorrem, por ano e em todo o mundo, cerca de 14,5 milhões de episódios de infecção pneumocócica invasiva em crianças menores de 5 anos de idade, dos quais, cerca de 826 000 resultam em morte [47]. A incidência da infecção pneumocócica invasiva e a taxa de mortalidade associada variam de acordo com a região geográfica considerada, sendo mais elevadas em África, na Ásia e na América do Sul (Figura 1).

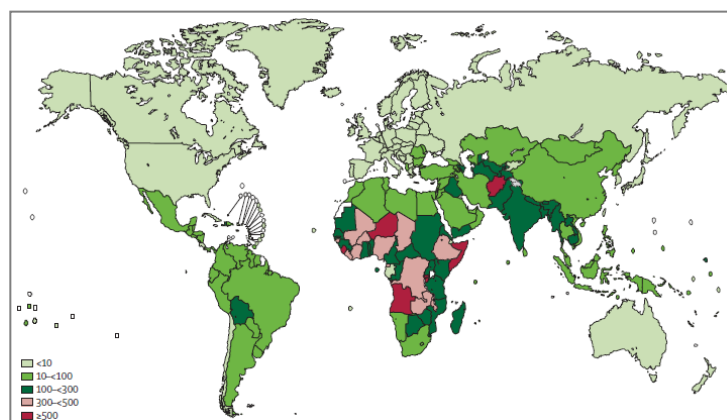


Figura 1: Taxa de mortalidade, por 100 000 habitantes, em crianças menores de 5 anos de idade. Adaptado de [47].

Apesar de não constituírem um grupo de risco, os adultos mais jovens (com 18 a 64 anos) são também afectados pela infecção pneumocócica e alguns estudos têm reportado taxas de incidência para este grupo etário. Em Espanha, reportou-se recentemente, em dois estudos distintos [7, 45], uma incidência de cerca 12/100 000 habitantes. Em Inglaterra e país de Gales, nos anos de 2009 e 2010, a incidência foi de 4,7/100 000 habitantes nos indivíduos com 15 a 44 anos de idade, e de 11/100 000 habitantes nos indivíduos com 45 a 64 anos de idade [41]. Em Portugal, no entanto, não são feitos estudos de incidência em nenhum grupo etário, devido à não obrigatoriedade da declaração destas infecções.

1.3 Epidemiologia dos serotipos de pneumococos

A cápsula polissacarídica constitui um dos principais factores de virulência de *S. pneumoniae*. Com base nos diferentes polissacáridos capsulares já identificados, são hoje reconhecidos mais de 90 serotipos de pneumococos [16]. A distribuição dos serotipos encontrados entre as estirpes responsáveis por infecção invasiva varia consideravelmente com inúmeros factores, tais como, por exemplo, a localização geográfica [29] e a idade do doente [60]. Para além disso, existe ainda variabilidade temporal, pelo que dentro de um mesmo grupo etário ou país, os serotipos mais prevalentes podem mudar, normalmente como consequência de pressões impostas pela utilização de antibióticos e/ou vacinas [4].

1.4 Resistência aos antimicrobianos em pneumococos

A descoberta da penicilina em 1929 por Alexander Fleming teve um impacto significativo na redução da mortalidade devido a infecções bacterianas. Contudo, a resistência a este e outros antibióticos acabou por surgir. Em pneumococos, em 1967 reportaram-se, na Austrália e na Nova Guiné, as primeiras estirpes resistentes à penicilina [28]. Passados dez anos foram detectados, na

África do Sul, cinco casos de infecção provocada por estirpes resistentes à penicilina, macrólidos, tetraciclina e cloranfenicol [8]. Desde 1980 que a resistência por parte dos pneumococos se encontra mundialmente disseminada [6]. As taxas de resistência reportadas têm crescido por todo o mundo e hoje em dia já chegam aos 60% em alguns países da América Latina e aos 80% em alguns países da Ásia.

A pressão imposta pelo consumo de antibióticos parece ser o principal factor desencadeante de resistência em pneumococos, visto que é nos países que mais consomem antibióticos que se detectam as maiores taxas de resistência [26]. A utilização de antibióticos alternativos aos beta-lactâmicos, tais como macrólidos e fluoroquinolonas, tem sido prática comum nos países onde as taxas de resistência à penicilina são elevadas. Como consequência, a resistência aos antibióticos alternativos nesses países tem vindo a aumentar [34, 39]. Assim sendo, não é surpreendente que os padrões de resistência aos antibióticos, por parte de *S. pneumoniae*, variem significativamente entre os diversos países. Na Europa essa variabilidade é bastante acentuada. Em 2009, alguns países, tais como a França, Espanha e Bulgária, reportaram taxas de não susceptibilidade à penicilina e eritromicina superiores a 20%, enquanto outros, tais como a Dinamarca, Suíça e Estónia, reportaram valores inferiores a 10%. Os valores reportados por Portugal, para esse mesmo ano, colocam-no em sexto e quinto lugares, no *ranking* da não susceptibilidade alcançada para a penicilina e eritromicina, respectivamente (www.ecdc.europa.eu). O facto de Portugal ter sido um dos países europeus que mais consumiu antibióticos de 1999 a 2007 (www.eurosurveillance.org) corrobora a ideia generalizada de que o elevado consumo de agentes antimicrobianos é um factor predisponente para o aumento das resistências.

Os beta-lactâmicos como a amoxicilina, ceftriaxona e cefotaxima são muito importantes no tratamento das infecções pneumocócicas. Esta classe de antimicrobianos impede a síntese da parede celular ao ligar-se às enzimas transpeptidases, denominadas de proteínas de ligação à penicilina (*penicillin-binding proteins*, PBPs), que são essenciais na formação do peptidoglicano [69]. A resistência aos beta-lactâmicos em pneumococos envolve a aquisição, por mecanismos de transferência genética, de PBPs com uma menor afinidade para estes antibióticos [27].

Em *S. pneumoniae*, os mecanismos de resistência aos macrólidos podem ser expressos em dois fenótipos principais, o fenotipo MLS_B, em que as estirpes são resistentes aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B, e o fenotipo M, em que as estirpes são resistentes aos macrólidos, mas não às lincosamidas, nem às estreptograminas B. Nas estirpes de fenotipo MLS_B, a resistência é mediada por metilases, codificadas por genes *erm*, que metilam o RNA ribossomal 23S, impedindo a ligação dos macrólidos e a sua consequente acção bactericida. Nas estirpes de fenotipo M, a resistência é mediada por bombas de efluxo, codificadas por genes *mef*, que reduzem a concentração intracelular do antibiótico e diminuem/impedem a sua acção bacteriostática [33]. A frequência dos fenótipos varia geograficamente, sendo que o fenotipo MLS_B é o dominante em muitos países da Europa [52] e o fenotipo M é o mais frequente nos EUA [24].

1.5 Genotipagem em pneumococos

Tendo em conta que *Streptococcus pneumoniae* é naturalmente transformável, podendo adquirir ácido desoxirribonucleico (DNA) exógeno e alterar profundamente o seu conteúdo

genético, a utilização de técnicas que avaliem a diversidade genética existente na população pneumocócica revela-se de extrema importância. As duas técnicas correntemente mais utilizadas na genotipagem de pneumococos são as técnicas de electroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) e de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST).

1.5.1 PFGE

A técnica de PFGE consiste na comparação de perfis de bandas de DNA entre estirpes, obtidas a partir da restrição do seu genoma total. Nesta técnica, o DNA total da bactéria é submetido à restrição de uma endonuclease de corte pouco frequente, dando origem a fragmentos de DNA de elevada massa molecular. Estes são posteriormente separados, com recurso a uma variante da técnica de electroforese em gel de agarose, na qual as orientações do campo eléctrico se alteram periodicamente, para permitir a separação eficaz dos fragmentos de DNA de elevada massa molecular [58]. Os padrões de bandas obtidos para cada estirpe são depois comparados entre si, de modo a inferir relações genéticas entre as estirpes [63]. Muitos laboratórios fazem esta comparação com recurso a programas informáticos, de modo a diminuir o erro, o tempo e a dificuldade associados ao processo de análise manual [17].

A técnica de PFGE é reproduzível e tem um elevado poder discriminatório. Esta é bastante útil para a epidemiologia local e é também a técnica de eleição para a detecção de surtos [59].

1.5.2 MLST

A técnica de MLST em pneumococos consiste na comparação, entre estirpes, das sequências de DNA correspondentes a fragmentos de sete genes conservados (*aroE*, *xpt*, *gki*, *gdh*, *spi*, *ddl*, *recP*). Os fragmentos de cada gene são amplificados pela reacção da polimerase em cadeia (PCR) e, posteriormente, sequenciados. As sequências de DNA obtidas são comparadas com as sequências depositadas numa base de dados disponível na internet (<http://www.mlst.net/>). A cada sequência é atribuído um número de alelo, de acordo com a sua homologia com alguma das sequências da base de dados. Ao conjunto formado pelos sete alelos obtidos é atribuído um número, denominado de perfil alélico (*Sequence Type*, ST). A comparação dos perfis alélicos entre estirpes permite inferir sobre a sua semelhança genética. Estirpes que difiram em apenas um ou dois alelos, denominadas de *Single Locus Variant* (SLV) e *Double Locus Variant* (DLV), respectivamente, podem estar relacionadas [23]. A inferência sobre a relação genética das estirpes é facilitada quando se utiliza um programa informático para análise. Um exemplo deste tipo de programas é o *phyloViz*, que através da implementação de um algoritmo (*goeBURST*), identifica o ST que poderá ter dado origem aos restantes (ST fundador). Ao conjunto formado pelo ST fundador e STs derivados do fundador dá-se o nome de complexo clonal (CC). Estirpes que se encontrem num mesmo complexo clonal têm maior probabilidade de estarem relacionadas [25].

A técnica de MLST tem como principais vantagens permitir a comparação dos resultados entre vários laboratórios, permitir criar bases de dados internacionais e ser bastante reproduzível e não ambígua. Esta técnica revela-se uma importante ferramenta tanto na epidemiologia local, como global.

De modo a classificar e caracterizar os principais clones de pneumococos associados à resistência aos antibióticos foi estabelecida, em 1997, uma rede de vigilância epidemiológica global, denominada de *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* (PMEN) [38]. Hoje em dia esta rede engloba não só os clones associados à resistência, mas também os mais relevantes em infecção invasiva que se encontram internacionalmente disseminados, tendo já sido descritos 43 clones (www.sph.emory.edu/PMEN/).

1.6 Vacinas anti-pneumocócicas

A elevada incidência da infecção pneumocócica e o aumento cada vez mais acentuado da resistência aos antibióticos por parte dos pneumococos fez com que se tornasse essencial o desenvolvimento de vacinas que prevenissem a infecção pneumocócica. As vacinas anti-pneumocócicas até ao momento licenciadas baseiam-se nos polissacáridos capsulares de pneumococos. Actualmente, existem dois tipos de vacinas anti-pneumocócicas disponíveis, as vacinas polissacarídicas e as vacinas polissacarídicas conjugadas. Enquanto as primeiras são compostas apenas por polissacáridos capsulares, as segundas, contêm, associado a cada polissacárido, uma proteína transportadora adjuvante.

1.6.1 Vacina polissacarídica

A vacina anti-pneumocócica polissacarídica actualmente disponível (PPV23) é composta por 23 polissacáridos capsulares (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, e 33F), que são os mais frequentes a causar infecção pneumocócica nos EUA e em outros locais do mundo. Esta vacina é aconselhada para imunizar os indivíduos de idade igual ou superior a 65 anos e os indivíduos com dois a 64 anos de idade que apresentem factores de risco para a infecção pneumocócica (ex. doenças crónicas e de imunossupressão) [12].

A vacina PPV23 não induz uma resposta celular dependente de células T e, conseqüentemente, não é imunogénica em crianças menores de dois anos de idade, um dos principais grupos de risco para a infecção pneumocócica. Para além disso, a eficácia desta vacina na prevenção da infecção pneumocócica, mesmo nos indivíduos de idade igual ou superior a 65 anos, tem sido alvo de bastante debate e controvérsia [32, 42].

1.6.2 Vacinas polissacarídicas conjugadas

A primeira vacina a revelar-se eficaz contra a infecção pneumocócica em crianças menores de dois anos de idade foi a vacina conjugada 7-valente (PCV7). Nesta vacina, cada polissacárido capsular está conjugado a uma proteína transportadora adjuvante (uma variante não tóxica da toxina da difteria, CRM₁₉₇), induzindo uma resposta imunitária que é dependente de células T. A vacina PCV7 foi licenciada nos EUA em Fevereiro de 2000 e na Europa em Fevereiro de 2001. Esta vacina esteve disponível para imunização das crianças menores de dois anos de idade até 2010, altura em que foi substituída pela sua homóloga 13-valente (PCV13) [36].

Na construção da vacina PCV7 escolheram-se os serotipos mais frequentes em infecção invasiva nos EUA e também aqueles que contabilizavam a maior parte da resistência aos antibióticos (serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F). Tendo em conta os serotipos que eram mais

frequentes em cada região, com a introdução desta vacina, estimava-se reduzir 88,7% das infecções pneumocócicas na América do Norte e na Austrália, 77,6% das infecções pneumocócicas na Europa e 67,3%, 63,4% e 43,1% das infecções pneumocócicas em África, na América Latina e na Ásia, respectivamente [29].

Enquanto nos EUA a vacinação universal das crianças foi imediatamente adoptada, na Europa a adesão variou entre os diferentes países, sendo que muitos deles, tal como Portugal, não optaram pela vacinação universal das crianças. Em Portugal, apesar da vacina PCV7 não ter feito parte do plano nacional de vacinação, esteve disponível para venda pelo sector privado desde 2001. A adesão à vacinação ocorreu de uma forma progressiva e em 2007 a sua cobertura já era de cerca de 70% [61].

A vacina PCV7 revelou ser eficaz na redução das infecções provocadas pelos serotipos que a compõem [14]. Para além disso, a redução da colonização pelos serotipos da vacina PCV7 nas crianças vacinadas, fez com que estes deixassem de estar tão disponíveis para serem transmitidos destas crianças para o resto da população. Assim sendo, o impacto da vacina PCV7 foi sentido, não só na população alvo de vacinação, como também na que não foi vacinada (imunidade de grupo [4].

A redução da colonização pelos serotipos vacinais foi acompanhada por um aumento da colonização por serotipos não vacinais. Ainda assim, a maioria dos estudos reportaram uma diminuição geral da incidência da infecção pneumocócica invasiva, no período pós-vacinal [67]. Em Portugal, também ocorreu uma alteração na proporção de serotipos vacinais e não vacinais [4, 54], mas o efeito da vacina na incidência da infecção pneumocócica invasiva não pode ser estimado, devido à não obrigatoriedade da declaração destas infecções.

De forma a englobar os principais serotipos de pneumococos que emergiram em infecção invasiva após a introdução da vacina 7-valente licenciaram-se, em 2009 e 2010, as vacinas 10-valente (PCV10) e 13-valente (PCV13), respectivamente. A vacina PCV10 está disponível na Europa desde Março de 2009 para imunização das crianças menores de 2 anos de idade [65]. Esta inclui, para além dos serotipos da vacina PCV7, os serotipos 1, 5 e 7F, e utiliza três proteínas transportadoras diferentes (incluindo uma que deriva da proteína D de *Haemophilus influenzae* não tipáveis) [57]. A vacina PCV13 encontra-se a substituir a vacina PCV7 desde Janeiro de 2010, em Portugal. Esta utiliza também o toxoide diftérico como proteína transportadora e engloba todos os serotipos das vacinas 7 e 10-valente e ainda outros três adicionais, os serotipos 3, 6A e 19A [68].

1.7 Pilus 1 e 2 de pneumococos

Apesar dos polissacáridos capsulares representarem o principal factor de virulência em pneumococos, existem outros produtos genéticos a contribuir para o potencial patogénico da bactéria. Recentemente, foram descobertos dois tipos de pili em pneumococos que parecem estar envolvidos na aderência a células epiteliais e no aumento da virulência. O primeiro pilus a ser descoberto, o pilus 1, encontra-se codificado numa ilha de patogenicidade denominada de PI-1, e o segundo pilus a ser descoberto, o pilus 2, encontra-se codificado numa outra ilha de patogenicidade, denominada de PI-2 [9, 10].

1.7.1 Pilus 1

A ilha PI-1, que possui cerca de 14 kilobases (kb) de dimensão e é flanqueada por elementos *IS1167*, contem os sete genes necessários para a formação de pilus 1 na superfície celular de pneumococos (genes *rlrA*, *rrgA*, *rrgB*, *rrgC*, *srtB*, *srtC* e *srtD*). O gene *rlrA* codifica um regulador transcricional, os genes *rrgA*, *rrgB* e *rrgC* codificam as proteínas que compõem o pilus e os genes *srtB*, *srtC* e *srtD* codificam três sortases que catalisam as reacções de polimerização do pilus. A ilha de patogenicidade 1 apresenta alguma variabilidade genética e hoje reconhecem-se três variantes desta ilha, denominadas de *clades* (*clades* I, II e III). Dentro de cada *clade* existe um mínimo de 98,8% de semelhança e, entre *clades*, a semelhança pode ser de 88,1% a 92,1%. Com excepção do gene *rlrA*, todos os outros genes da ilha de patogenicidade PI-1 apresentam alguma variabilidade genética. A amplificação do gene *rlrA* por PCR é uma forma simples de averiguar a presença ou ausência desta ilha [44]. As estirpes *rlrA* negativas (sem pilus 1) podem amplificar fragmentos de DNA de três dimensões diferentes, denominados de fragmentos tipo A, B ou C. A maioria das estirpes sem pilus 1 parece conter o fragmento do tipo A. A distribuição das *clades* e dos fragmentos é clonal, estando mais relacionada com o genotipo do que com o serotipo de pneumococos [5].

1.7.2 Pilus 2

A ilha de patogenicidade PI-2, com cerca de 7 kb de dimensão, é composta por cinco genes, *pitA*, *sipA*, *pitB*, *srtG1* e *srtG2*. Destes, os genes *pitB*, *sipA* e *srtG1* são essenciais para a formação do pilus 2 de pneumococos na superfície celular bacteriana. O gene *pitB* codifica para os polimeros que compõem o pilus 2, o gene *sipA* codifica uma sinal-peptidase e o gene *srtG1* codifica uma sortase. A distribuição da ilha de patogenicidade PI-2 parece estar relacionada com o genotipo de pneumococos, tal como acontece com a ilha de patogenicidade PI-1 [9].

1.7.3 Utilização de pili na construção de uma vacina

Logo após a sua descoberta, alguns investigadores propuseram a utilização de pili na construção de uma vacina pneumocócica. Contudo, a frequência com que estas estruturas surgem na população de pneumococos parece ser bastante pequena para que tal seja possível. Um estudo reportou a presença da ilha PI-1 em 30,6% das estirpes analisadas [44] e um outro reportou que a ilha PI-2 surgia em apenas 16% da sua colecção de estirpes [9]. Em Portugal já foi estudada a distribuição da ilha PI-1 numa colecção de estirpes isoladas entre 1999 e 2002 e os resultados obtidos apontaram para uma frequência de apenas 27% [5]. Visto que o pilus 1 parece estar mais associado a alguns serotipos da vacina PCV7, e tendo em conta que neste período ainda não se tinha assistido ao declínio dos serotipos vacinais, é espectável que a frequência actual de pilus 1, em Portugal, seja ainda menor. No entanto, um estudo recente reportou uma re-emergência da ilha de patogenicidade PI-1 no período pós-vacinal, associada aos serotipos 19A e 35B, que são serotipos não incluídos na vacina PCV7, sugerindo que o pilus 1 pode conferir uma vantagem adaptativa a pneumococos [51]. O pilus 2, por sua vez, parece estar mais associado aos serotipos que emergiram após a utilização da vacina PCV7 (ex. 1, 7F e 19A) e um aumento na sua frequência entre os períodos pré e pós-vacinal já foi reportado recentemente [70].

2. OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivo caracterizar a população de pneumococos responsável por infecção invasiva em indivíduos adultos jovens (com 18 a 64 anos de idade), nos anos de 2008 e 2009, em Portugal. Esta caracterização consistiu na: 1) determinação da distribuição e frequência dos serotipos de pneumococos; 2) determinação das taxas de resistência a diferentes classes de antimicrobianos; 3) identificação das principais linhagens genéticas formadas por PFGE e MLST; 4) avaliação da presença e distribuição das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2.

Uma vez que nos anos de isolamento das estirpes analisadas neste trabalho decorreu uma elevada cobertura vacinal das crianças com a vacina PCV7 e que este período é também o imediatamente anterior à introdução da vacina PCV13 pretendeu-se ainda inferir sobre o efeito que a elevada cobertura vacinal das crianças com a vacina PCV7 poderá ter tido na população pneumocócica causadora de infecção invasiva em adultos e prever o impacto que a introdução da vacina PCV13 poderá vir a ter nesta mesma população.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Colecção de estirpes*

Neste estudo analisaram-se estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções invasivas em indivíduos adultos durante o ano de 2008 e 2009 em Portugal. Consideraram-se como “adultos” os indivíduos cujas idades se compreendiam entre os 18 e os 64 anos de idade, no momento da infecção, e consideraram-se como “infecções invasivas”, as infecções em que o agente bacteriano foi isolado a partir de amostras biológicas habitualmente estéreis. As estirpes analisadas neste trabalho foram obtidas através de um sistema de vigilância epidemiológica que está em curso desde 1999. Segundo este sistema, vários laboratórios de bacteriologia de todo o país estão encarregues de identificar e enviar todos os pneumococos isolados de infecção invasiva para o laboratório coordenador desta investigação, o Instituto de Microbiologia da FMUL [40]. Nos casos em que foram enviadas duas amostras biológicas diferentes relativas a um mesmo doente, apenas uma foi considerada. Foi dada preferência às amostras biológicas líquido cefalo-raquidiano (LCR), líquido pleural e líquido ascítico, relativamente às amostras de sangue. No total consideraram-se 425 estirpes, 210 respeitantes ao ano de 2008 e 215 ao ano de 2009. Até à sua análise, as estirpes foram conservadas a -80°C em tubos de congelação contendo meio *Tryptone Soya Broth* (Oxoid, Hampshire, England) e 15% de glicerol.

3.2 Confirmação do agente bacteriano

A identificação de *Streptococcus pneumoniae* foi feita nos laboratórios responsáveis pelo envio das estirpes, de acordo com os procedimentos internos de cada um. Após serem recebidas no laboratório coordenador confirmou-se a identidade e pureza das estirpes através das seguintes provas: hemólise alfa em gelose sangue-de-carneiro [meio *Tryptone Soya Agar* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (Probiológica, Belas, Portugal)], susceptibilidade à optoquina [hidroclorato de etilhidrocuptreína (BD, New Jersey, EUA)] e solubilidade em sais de bilis (desoxicolato de sódio 2%).

3.2.1 Hemólise em gelose sangue-de-carneiro. Para verificar a hemólise das estirpes recebidas semearam-se as estirpes em placas de gelose sangue-de-carneiro e incubaram-se as placas durante 24 h, em estufa a 35°C contendo uma atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação observou-se a hemólise provocada pelas colónias. Apenas as estirpes que formaram halos esverdeados no meio de cultura (hemólise alfa), foram consideradas.

3.2.2 Susceptibilidade à optoquina. Todas as estirpes incluídas neste trabalho foram testadas quanto à sua susceptibilidade à optoquina. A determinação da susceptibilidade à optoquina foi feita pelo método de difusão em agar, em que discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro contendo 5 µg de optoquina foram colocados em placas de gelose sangue-de-carneiro

* No presente trabalho a palavra *estirpe* é utilizada para referir cada microrganismo isolado num produto biológico.

previamente semeadas com as estirpes a testar. Após incubação durante 24 h em estufa a 35°C, com atmosfera de 5% de CO₂, mediram-se os diâmetros dos halos de inibição de crescimento. Halos inferiores a 14 mm classificam a estirpe como resistente à optoquina [48].

3.2.3. Solubilidade em sais de bÍlis. Todas as estirpes que se apresentaram resistentes à optoquina foram testadas quanto à solubilidade em sais de bÍlis. Para determinar a solubilidade em sais biliares prepararam-se suspensões bacterianas em solução de NaCl 0,85% de modo a que estas apresentassem uma turbidez de 0,5 a 1 na escala de McFarland. Adicionou-se igual volume de desoxicolato de sÓdio a 2% e incubou-se em estufa a 35°C. Após 15 min de incubação observou-se a turbidez das estirpes. As que passaram de turvas a translúcidas foram consideradas solúveis em bÍlis, ou seja, foram consideradas *S. pneumoniae*.

3.3 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

Neste estudo determinou-se a susceptibilidade das estirpes aos antimicrobianos que se encontram descritos no Quadro 1. Para a penicilina, amoxicilina e cefotaxima determinaram-se as concentrações inibitÓrias mÍnimas, com recurso a tiras de *Etest* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), para os restantes antibióticos determinou-se a susceptibilidade das estirpes pelo método de difusão em agar com recurso a discos de papel de filtro impregnados com antibiótico (Oxoid, Hampshire, England). A interpretação dos resultados foi feita com base nas recomendações do CLSI [20]. Não se utilizaram os critérios mais recentes do CLSI, que tem novas interpretações relativamente à susceptibilidade à penicilina nos casos de meningite, de modo a facilitar a comparação epidemiológica destes dados com os já publicados. Identificaram-se também os fenotipos de resistência aos macrólidos.

3.3.1 *Etest*. Para calcular as concentrações inibitÓrias mÍnimas semearam-se as estirpes em placas de *Mueller-Hinton* sangue-de-carneiro [meio *Mueller-Hinton* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (Probiológica, Belas, Portugal)]. Antes de serem semeadas, fez-se uma suspensão das estirpes em NaCl (0,85%) de modo a obter uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Após a sementeira, colocaram-se as tiras de *Eteste* contendo um gradiente de concentrações de antibiótico a testar e incubaram-se as placas em estufa a 35°C, durante 20-24 h. Após este período mediram-se os valores das concentrações inibitÓrias mÍnimas.

3.3.2 Difusão em agar. O procedimento é semelhante ao das tiras de *Etest*, no entanto, em vez de se colocarem tiras de *Etest*, colocam-se discos de papel de filtro, contendo uma concentração conhecida do antibiótico a testar. Após o mesmo período de incubação a 35°C, em estufa enriquecida com 5% de CO₂, medem-se os diâmetros dos halos de inibição com o auxílio de uma régua.

3.3.3 Fenotipos de resistência aos macrólidos. Os fenotipos de resistência aos macrólidos foram determinados com base na susceptibilidade das estirpes à eritromicina e à clindamicina.

Assim, as estirpes que apresentaram não susceptibilidade a ambos os antibióticos foram classificadas com o fenotipo MLS_B, e as estirpes que se apresentaram como sendo não susceptíveis apenas à eritromicina foram classificadas com o fenotipo M de resistência aos macrólidos.

Quadro 1: Descrição e concentração dos antimicrobianos utilizados.

Técnica	Antimicrobiano	Concentração µg/ml	Susceptível	Não susceptível	
				I	R
Etest	Penicilina	0,002 -32	≤ 0,06	0,12-1	≥ 2
	Amoxicilina	0,016 - 256	≤ 2	4	≥8
	Cefotaxima	0,002 - 32	≤ 1	2	≥ 4
Disco	Cloranfenicol	30	≥ 21	-	≤20
	Eritromicina	15	≥ 21	16-20	≤15
	Clindamicina	2	≥ 19	16-18	≤15
	Tetraciclina	30	≥ 23	19-22	≤18
	Telitromicina	15	≥ 19	16-18	≤15
	Levofloxacina	5	≥ 17	14-16	≤13
	Linezolid	30	≥ 21	-	-
	Vancomicina	30	≥ 17	-	-
	Sulfametoxazol-trimetoprim	25	≥ 19	16-18	≤15

“I” – intermédio; “R” – resistente.

3.4 Serotipagem

O método de serotipagem baseia-se na reacção de *quellung* em que anticorpos específicos reagem com os respectivos polissacáridos capsulares. A serotipagem de pneumococos consiste na mistura, numa lâmina de vidro, de aproximadamente 1 µL de soro, contendo anticorpos específicos (Statens Serum Institut, Copenhaga, Dinamarca), a cerca de 3 µL de suspensão bacteriana. Quando o soro reage com os polissacáridos capsulares da estirpe ocorre uma aglutinação que, na maioria dos casos, é visível macroscopicamente. Em caso de dúvida, utiliza-se o microscópio óptico para confirmar a presença ou ausência de aglutinação.

Neste trabalho, a ordem de utilização dos soros baseou-se num sistema em xadrez previamente descrito por Sørensen [62] e que tem por objectivo diminuir o tempo da serotipagem (Quadro 2). Utilizaram-se em primeiro lugar os soros gerais P a T, até se observar uma reacção positiva, e em seguida os soros gerais A a H. A obtenção de uma reacção positiva para os dois soros gerais determina o serogrupo. Prossegue-se a serotipagem confirmando a aglutinação com o soro específico desse serogrupo.

Nos casos em que a estirpe não aglutina com nenhum dos soros gerais da primeira linha, devem testar-se os soros gerais C a I, até se obter uma reacção positiva. Assim que ocorrer aglutinação, testam-se os soros específicos dos serogrupos apresentados na última coluna (“Outros serogrupos”) e que se encontram na mesma linha do soro geral para o qual a reacção foi positiva. Muitos serogrupos apresentam mais do que um serotipo. Os serogrupos compostos por mais do que um serotipo são aqueles que, no Quadro 2, estão marcados com um asterisco. Nestes casos, é ainda necessário testar mais um conjunto de soros para averiguar qual o serotipo. A serotipagem destas estirpes foi feita seguindo as instruções do fabricante dos soros.

Quadro 2: Sistema em xadrez de serotipagem de *S. pneumoniae*, adaptado de [62].

Soros Gerais	P	Q	R	S	T	Outros serogrupos
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24*;31;40
D			9*		11*	16*;36;37
E			12*	10*	33*	21;39
F				17*	22*	27;32*;41*
H	14	23*		15*		13;28*
G						29;34;35*;42;47*
I						25*;38;43;44;45;46;48

* Serogrupos compostos por vários serotipos: **6:** 6A, 6B, 6C e 6D; **7:** 7F, 7A, 7B e 7C; **9:** 9A, 9L, 9N e 9V; **10:** 10A, 10B, 10C e 10F; **11:** 11F, 11A, 11B, 11C, 11D; 11E; **12:** 12F, 12A, 12B; **15:** 15F, 15A, 15B, 15C; **16:** 16F, 16A; **17:** 17F, 17A; **18:** 18F, 18A, 18B, 18C; **19:** 19F, 19A, 19B, 19C; **22:** 22F, 22A; **23:** 23F, 23A, 23B; **24:** 24F, 24A, 24B; **25:** 25F, 25A; **28:** 28F, 28A; **32:** 32F, 32A; **33:** 33F, 33A, 33B, 33C, 33D; **35:** 35F, 35A, 35B, 35C; **41:** 41F, 41A; **47:** 47F, 47A.

3.5 PFGE

A metodologia levada a cabo para determinar os perfis de macrorestrição das estirpes consistiu na imobilização do DNA bacteriano em discos de agarose, restrição do DNA bacteriano com endonuclease de corte pouco frequente, electroforese dos discos em gel de campo pulsado e análise dos perfis genómicos obtidos.

3.5.1 Imobilização do DNA bacteriano em discos de agarose. Começou-se por semear as estirpes em ¼ de placa de gelose sangue-de-carneiro seguido de incubação em estufa a 35°C, enriquecida com atmosfera de 5% de CO₂. Após 18 a 24 h de incubação inoculou-se em 5 mL de meio líquido *Brain Heart Infusion* [BHI (Difco Laboratories, Detroit, EUA)], e incubou-se a 37°C durante o período de tempo necessário para que as estirpes atingissem a fase estacionária do seu crescimento (entre 0,7 e 0,9 de densidade óptica a 600 nm). Transferiram-se as suspensões bacterianas para tubos de plástico de 15 mL e centrifugaram-se a 3220 g durante 15 min, numa centrífuga refrigerada a 4°C (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Posteriormente, removeu-se o sobrenadante dos tubos e fez-se uma nova suspensão com 1 mL de tampão PIV (Tris 0,01 M, pH 7,5; NaCl 1 M). Transferiram-se as suspensões para microtubos de 1,5 mL e centrifugaram-se a 18000 g, durante 5 min (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Removeu-se o sobrenadante dos microtubos e fez-se uma nova suspensão em 200 µL de tampão PIV. As densidades celulares das estirpes foram ajustadas através da adição de tampão PIV, de modo a obter cerca de 7,5x10⁹ ufc/mL. Os volumes de tampão a adicionar a cada estirpe foram calculados tendo em conta as densidades ópticas apresentadas pelas estirpes a 620 nm. Após ajuste das densidades ópticas transferiu-se 150 µL de cada suspensão bacteriana para novos microtubos. Colocaram-se os microtubos durante 1 min num aparelho de banho seco programado para uma temperatura de 41°C. A cada um destes adicionou-se igual volume de agarose *Low melting point* 1,5% (p/v), que se encontrava à mesma temperatura. Agitou-se a mistura no *vortex* e pipetou-se o conteúdo dos microtubos para placas de vidro, formando 12 gotas de 20 µL cada. Cobriram-se as gotas de cada estirpe com uma lâmina de microscopia para dar forma de disco às gotas de agarose, e incubou-se a placa de vidro a -20°C, durante 5 min. Os discos obtidos foram transferidos para tubos de 15 mL

contendo 1 mL de solução de lise [tampão EC (Tris 0,01 M, pH 7,5; NaCl 1 M; EDTA 0,1 M, pH 8; ácido desoxicólico 0,2% (p/v); n-lauril-sarcosina 0,5% (p/v); Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter 0,5% (p/v)] contendo ribonuclease 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Incubaram-se os tubos durante 3 h em estufa a 35°C. Após este período removeu-se a solução de lise e adicionou-se solução ESP [EDTA 0,5 M, pH 9; n-lauril sarcosina 1% (p/v) contendo proteinase K 1,5 mg/mL (Roche, Mannheim, Alemanha)]. Incubou-se em estufa a 50°C durante 17 h. Após este tempo removeu-se o tampão ESP e adicionou-se tampão TE 1x (Tris 1 M, pH 7,5; EDTA 0,5 M, pH 8) para lavar os discos. Os tubos foram colocados num agitador durante 1 h repetindo-se o processo de lavagem duas vezes.

3.5.2 Restrição do DNA bacteriano. Transferiu-se um disco de agarose de cada estirpe para microtubos de 1,5 mL. Adicionou-se a cada tubo 50 µL de uma solução tampão adequada à endonuclease a utilizar e incubou-se em estufa a 30°C, durante 1 h. Removeu-se o tampão e adicionou-se 45 µL de uma mistura de restrição, contendo 0,7 unidades da endonuclease SmaI (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e a solução tampão. Incubou-se em estufa a 30°C, durante 17 h. Para as estirpes que apresentaram restrição incompleta, procedeu-se à restrição com enzima Cfr9I (Fermentas, Vilnius, Lituânia) em vez de SmaI. Nestes casos, as incubações com o tampão da enzima e com a mistura de restrição foram feitas em estufa a 37°C. Após a restrição a enzimática adicionou-se 5 µL de uma solução corante 6x [azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v), sacarose 40%] a cada microtubo e deixou-se a equilibrar durante 10 min, à temperatura ambiente.

3.5.3 Electroforese em gel de campo pulsado. Introduziram-se os discos de DNA previamente equilibrados com a solução corante nos poços de um gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5x (BioRad, Munique, Alemanha). Introduziram-se também discos da estirpe controlo R36A [56] e do marcador de massa molecular *Lambda ladder PFGE marker* (New England BioLabs, Beverley, EUA). No fim, selaram-se os poços do gel com agarose 1% (p/v). Colocou-se o gel no aparelho de electroforese (CHEF-DRIII[®] System, BioRad, Richmond, EUA) contendo tampão TBE 0,5x. A separação foi realizada durante 23 h, a uma temperatura de 14°C, com uma voltagem de 6 V/cm. O intervalo de variação dos pulsos inicial e final foi de 5 e 35 segundos, respectivamente. Finalizada a corrida transferiu-se o gel para uma tina contendo 400 mL de uma solução de brometo de etídio 0,1% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Após 18 a 24 h fotografou-se o gel com recurso a um transiluminador de ultravioleta e sistema de captação de imagem (EDAS 290, Eastman Kodak Company, Nova Iorque, EUA).

3.5.4 Análise dos perfis de macrorestrição. Os padrões genómicos obtidos para cada estirpe foram analisados e comparados através do programa informático BioNumerics, versão 6.5 (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Para tal, construíram-se dendrogramas utilizando o coeficiente de Dice, com as definições de optimização e tolerância de 1,0 e 1,5%, respectivamente, e o método de agrupamento hierárquico *unweighted pair group method with arithmetic means*

(UPGMA). Consideraram-se como pertencentes à mesma linhagem de PFGE todas as estirpes que apresentaram uma semelhança igual superior a 80%.

3.6 MLST

Neste trabalho determinou-se o perfil de MLST de 224 estirpes. As estirpes analisadas foram escolhidas aleatoriamente, mas de forma a englobar no mínimo 50% das estirpes de cada serotipo.

3.6.1 Obtenção do DNA cromossômico. O método de obtenção de DNA consistiu na fervura das células bacterianas. Para tal, procedeu-se ao crescimento das células em BHI e transferiram-se 9 µL de cada suspensão bacteriana para microtubos de 1,5 µL contendo 441 µL de água purificada pelo sistema miliQ (Millipore, Billerica, EUA). As células foram fervidas durante 2 min e posteriormente arrefecidas em gelo durante 5 min.

3.6.2 Amplificação por PCR dos fragmentos internos de 7 genes conservados. Todas as reacções de PCR apresentadas neste trabalho foram efectuadas utilizando uma enzima de polimerização [polimerase de DNA Taq (Promega, Madison, USA) ou uma mistura de polimerases de DNA para PCR's longos, *Expand Long Template PCR system* (Roche, Mannheim Alemanha)], um tampão adequado para a enzima utilizada fornecido pelo fabricante, oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Pasley, Escócia), uma mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e água purificada pelo sistema Mili-Q. Nos casos em que foi necessário adicionar MgCl₂ à mistura de reacção utilizou-se a solução comercial da marca Promega (Madison, EUA). As reacções de amplificação foram feitas com recurso a um termociclador da marca BioRad, modelo *MyCycler Thermal Cycler* (Munich, Alemanha).

Para determinar os perfis de MLST das estirpes seleccionadas amplificaram-se os fragmentos internos dos genes *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados encontram-se descritas no Quadro 3 e os componentes e as respectivas quantidades utilizadas na mistura de reacção estão indicados no Quadro 4. O programa de PCR utilizado está descrito no Quadro 6, excepto para amplificação do fragmento do gene *recP*, em que se utilizou o programa descrito no Quadro 5.

3.6.3 Purificação. A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando um sistema de purificação de DNA, de acordo com as instruções do fabricante (Roche, Indianapolis, EUA).

3.6.4 Sequenciação. O DNA purificado foi enviado para a empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul) para ser sequenciado. A sequenciação foi feita a partir dos oligonucleotídeos iniciadores universais M13F (GTA AAA CGA CGG CCA GT) e M13R-pUC (CAG GAA ACA GCT ATG AC) (Quadro 3).

3.6.5 Identificação de alelos e perfis alélicos. A identificação dos alelos e perfis alélicos de cada estirpe foi feita utilizando o programa informático BioNumerics e a base de dados de MLST (<http://www.mlst.net/>). Neste programa, as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com

sequências padrão disponíveis na base de dados. Nos casos em que se obtiveram novos alelos ou perfis alélicos, submetem-se as sequências ao responsável pela base de dados de *S. pneumoniae*, para que fossem atribuídos novos números de alelo e/ou perfis alélicos.

3.7 Pesquisa das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2

3.7.1 Obtenção do DNA cromossômico. O DNA foi obtido através da fervura das células como descrito em 3.6.1.

3.7.2 Pesquisa da ilha de patogenicidade PI-1. A pesquisa da ilha PI-1 foi feita através da amplificação do gene *rtrA*. Apenas as estirpes que amplificaram este gene foram consideradas como portadoras desta ilha. Para confirmar que as estirpes positivas para o gene *rtrA* possuíam a ilha de patogenicidade PI-1 na sua totalidade, escolheu-se uma estirpe *rtrA* positiva de cada serotipo para realizar um PCR longo, de modo a amplificar todo o *locus* genético. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene *rtrA* (*rtrA*-F e *rtrA*-DN) estão descritos no Quadro 3, o programa de PCR está descrito no Quadro 5, os componentes e os respectivos volumes usados na mistura de reacção de amplificação encontram-se no Quadro 4. A ilha de patogenicidade PI-1 foi pesquisada com recurso ao sistema de amplificação *Expand Long Template PCR System*, utilizando os componentes descritos no Quadro 8 e o programa de PCR do Quadro 7. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são os que flanqueiam a ilha de patogenicidade, *pfl*-F e *p*-R, e as suas sequências estão apresentadas no Quadro 3. Para determinar a dimensão dos fragmentos de DNA das estirpes *rtrA* negativas utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores *pfl*-F e *p*-R (Quadro 3), o programa de PCR do Quadro 5 e os componentes descritos no Quadro 4. Utilizaram-se estirpes controlo para todas as reacções de amplificação respeitantes à ilha de patogenicidade PI-1, a estirpe TIGR4 [64], que possui pilus 1, foi utilizada como controlo positivo e a estirpe R6 [31], que não possui pilus 1, foi utilizada como controlo negativo.

3.7.3 Pesquisa da ilha de patogenicidade PI-2. Para pesquisar a presença da ilha PI-2 efectuaram-se duas reacções de PCR para cada estirpe, uma para amplificar o gene *sipA* e outra para amplificar um fragmento de DNA correspondente à ausência deste gene. As estirpes que amplificaram o gene *sipA* foram consideradas como portadoras da ilha PI-2. Relativamente à amplificação do gene *sipA* utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores *sipA*-F e *sipA*-R (Quadro 3), os reagentes de PCR indicados no Quadro 4 e o programa de PCR do Quadro 5. Para amplificar o fragmento de DNA correspondente à ausência da ilha PI-2, utilizaram-se as sequências iniciadoras que flanqueiam a ilha, *pepT*-F e *hemH*-R (Quadro 3), os componentes apresentados no Quadro 4 e o programa de PCR do Quadro 5.

Quadro 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reacções de PCR.

Propósito	Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5'→3')	Dimensão (bp)
MLST *	<i>aroE</i> _M13F	tgt aaa acg acg gcc agt CGT TTA GCT GCA GTT GTT GC	405
	<i>aroE</i> _M13R-pUC	cag gaa aca gct atg acC CCC ACA CTG GTG GCA TTA AC	
	<i>gdh</i> _M13F	tgt aaa acg acg gcc agt GTG CTG AAA AGA TTA AGG TCT	460
	<i>gdh</i> _M13R-pUC	cag gaa aca gct atg acC TGC TTC CAG CTT TAT AGT CAT G	
	<i>gki</i> _M13F	tgt aaa acg acg gcc agt GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC	483
	<i>gki</i> _M13R-pUC	cag gaa aca gct atg acC TCT CCC GCA GCT GAC AC	
	<i>recP</i> _M13F	tgt aaa acg acg gcc agt GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG	450
	<i>recP</i> _M13R-pUC	cag gaa aca gct atg acC GCT TCC AAG TCT GTT CCA TTT TC	
	<i>spi</i> _M13F	tgt aaa acg acg gcc agt CGC TTA GAA AGG TAA GTT ATG	474
	<i>spi</i> _M13R-pUC	cag gaa aca gct atg acC AGG CTG AGA TTG GTG ATT CTC	
	<i>xpt</i> _M13F	tgt aaa acg acg gcc agt GGA GGT CTT ATG AAA TTA TTA G	441
	<i>xpt</i> _M13R-pUC	cag gaa aca gct atg acC AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC	
	<i>ddl</i> _M13F	tgt aaa acg acg gcc agt TTG CCA TGG ATA AAA TCA CGA C	
	<i>ddl</i> _M13R-pUC	cag gaa aca gct atg acC CGC GTT GTA AAA CTT TCC	
Gene <i>rlrA</i>	<i>rlrA</i> -F	TCT GAT AGA TGA GAC GCT GTT G	1117
	<i>rlrA</i> -R	CTC CGC TTC TTT CTA CTA CAA G	
PI-1	<i>pfl</i> -F	ATC TCA TTG ACT ACA CAA GTA TCA CCT C	IP-1: 14Kb ^B (A)1310; (B)1912; (C)2616
Fragmentos <i>rlrA</i> neg.	<i>pfl</i> -R	CAA GAG CAT ACT CCA ACT CAT AAA TAT GTG	
Clades PI-1	I-F	AAC AGA TGG GGA TAT GGA TAA AAT AAT TG	384
	I-R	AAT GGT AAT TCA ATT TCA ATT GGA	
	II-F	AAT CCA TAA GTT ACT GCT CTC AGA	637
	II-R	ATC CAT AGC TAC ATT ATT CAA AGT	
	III-F	GAC AGA TCA AGA GCT TGA CGC TTG	482
III-R	CTG GAT CTA CGA AAC CTG GTG CAG		
Gene <i>sipA</i>	<i>sipA</i> -F	CGT GGG TAT CAG GTG TCC TAT GAT AA	750
	<i>sipA</i> -R	GCC TCG TCT TCT AAT GAC TGT TAC	
Fragmento <i>sipA</i> neg.	<i>pepT</i> -F	GCT GGA TCG AGT TTG AAA CCA GAA	1050
	<i>hemH</i> -R	TAA GGA TCA CCA AAG TCC AAG GCA	

* As letras maiúsculas das sequências iniciadoras usadas em MLST correspondem a sequências que hibridam com o genoma de pneumococos, as letras minúsculas referem-se aos iniciadores M13F e M13R-pUC, que foram adicionadas para facilitar a sequenciação. ^B Na estirpe TIGR4. “bp” – pares de bases; “neg” – negativas.

Quadro 4: Componentes e respectivos volumes utilizados nas reacções de PCR.

Componentes	MLST (μL)	Gene <i>rlrA</i> (μL)	Fragmentos <i>rlrA</i> negativas (μL)	<i>Clades</i> (μL)	Gene <i>sipA</i> (μL)	Fragmento <i>sipA</i> negativas (μL)
Polimerase de DNA Taq (5 U/ μL)	0,2	0,15	0,2	0,2	0,15	0,2
Tampão (10x)	10	5	5	5	5	5
dNTPs (10 mM)	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂	4	2	2	2	2	2
Oligonucleotídeo iniciador F	2	1	1	1	1	1
Oligonucleotídeo iniciador R	2	1	1	1	1	1
DNA	20	10	10	10	4	10
Água	10,8	5,35	5,3	1,3	11,35	1,3
Volume Total	50	25	25	25	25	25

Quadro 5: Programas de PCR.

Passo	MLST <i>recP</i>			Gene <i>rlrA</i>			Fragmentos <i>rlrA</i> negativas			<i>Clades</i> PI-1 / Gene <i>sipA</i>			Fragmento <i>sipA</i> negativas		
	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	4 min	1x	94°C	5 min	1x	94°C	4 min	1x	94°C	4 min	1x	94°C	4 min	1x
Desnaturação	95°C	30 s		95°C	30 s		95°C	30 s		95°C	30 s		95°C	30 s	
Hibridação	48°C	30 s	30 x	60°C	30 s	29 x	62°C	30 s	30 x	55°C	30 s	30 x	62°C	30 s	30 x
Alongamento	72°C	30 s		72°C	30 s		72°C	3 min		72°C	30 s		72°C	3 min	
Terminação	72°C	10 min	1x	72°C	10 min	1x	72°C	10 min	1x	72°C	10 min	1x	72°C	10 min	1x

Quadro 6: Programa de PCR utilizado para amplificar os fragmentos dos genes *aroE*, *gki*, *gdh*, *ddl*, *xpt* e *spi*, na técnica de MLST.

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	95°C	5 min	1x
Desnaturação	95°C	1 min	
Hibridação	48°C	45 seg	4 x
Alongamento	72°C	1 min	
Desnaturação	94°C	1 min	
Hibridação	65°C	45 s	29x
Alongamento	72°C	1 min	
Terminação	72°C	5 min	1x

Quadro 7: Programa de PCR utilizado para amplificar a ilha de patogenicidade PI-1.

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	2 min	1x
Desnaturação	94°C	10 s	
Hibridação	58°C	30 s	10 x
Alongamento	68°C	13 min	
Desnaturação	94°C	15 s	
Hibridação	58°C	30 s	20x
Alongamento	68°C	13 min	
Terminação	68°C	7 min	1x

Quadro 8: Componentes e volumes utilizados para amplificar a ilha de patogenicidade PI-1.

Componentes	Volume (µL)
Mistura de polimerases de DNA (5 U/µL)	0,85
Tampão nº3 (10x)	5
dNTPs (10 mM)	2,5
Oligonucleotídeo iniciador F (10 pmol/µL)	1,5
Oligonucleotídeo iniciador R (10 pmol/µL)	1,5
DNA (200 ng/µL)	2
Água MiliQ	36,65
Volume Total	50

3.8 Análise estatística. Para analisar a diversidade de uma população utilizou-se o índice de diversidade de Simpson (SID), que calcula a probabilidade de duas estirpes, escolhidas aleatoriamente de uma população, serem de tipos diferentes [18]. Para comparar dois métodos de tipagem utilizou-se o coeficiente de Wallace (W). Este calcula a probabilidade de duas estirpes, que tenham sido classificadas com um mesmo tipo através de um método de tipagem, serem do mesmo tipo quando classificadas através de um outro método de tipagem [18, 49]. Para determinar a força de associação entre dois valores de dados binários calculou-se o *odds ratio* (OR). Utilizou-se o método exacto de Fisher bilateral (p) para determinar significâncias estatísticas e corrigiram-se os valores para testes múltiplos (FDR), controlando a taxa de falsas descobertas [13]. O SID e o W foram calculados em www.comparingpartitions.info/. Os valores de *odds ratio*, os intervalos de confiança a 95% (95%CI) e os valores p e FDR foram determinados utilizando as bibliotecas *epitools* e *multitest* do programa informático R.

4. RESULTADOS

4.1 População em estudo

4.1.1 Distribuição das estirpes por idade e sexo dos doentes. A Figura 2 mostra a distribuição das estirpes por idade e sexo dos doentes, nos anos de 2008 e de 2009. A idade média apresentada pelos doentes foi, em ambos os períodos, de 46 anos de idade. Analisando a distribuição dos doentes pelas faixas etárias 18 a 49 anos de idade (inclusive) e 50 a 64 anos de idade (inclusive), observa-se que 58,6% (n=249) dos doentes pertenciam ao primeiro grupo, enquanto os restantes (41,4%, n=176) pertenciam ao segundo. Relativamente ao sexo dos doentes, 34,8% das estirpes (n=148) foram isoladas de doentes do sexo feminino e 65,2% (n=277) de doentes do sexo masculino.

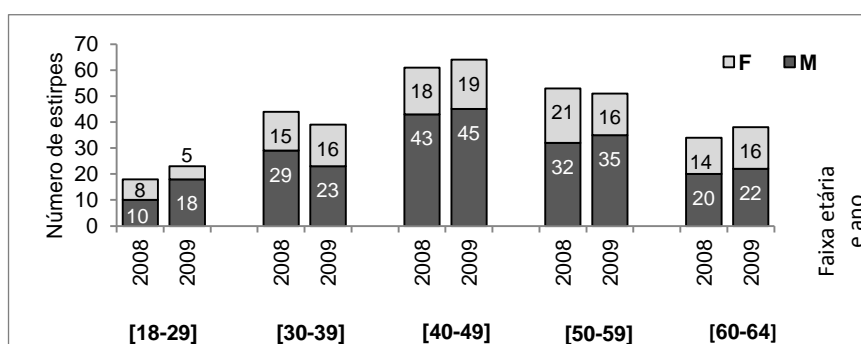


Figura 2: Distribuição das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009, em função da idade e sexo dos doentes. "F"- sexo feminino e "M"- sexo masculino. A idade dos doentes é apresentada em anos.

4.1.2 Sazonalidade. Do total das estirpes que compõem este estudo, 63,7% foram isoladas nos meses mais frios do ano, nomeadamente, Janeiro, Fevereiro, Março, Outubro, Novembro e Dezembro. Analisando em conjunto os dados de 2008 e de 2009, verifica-se que foi em Fevereiro que se isolou o maior número de estirpes (14,4%), e que o mês de Agosto foi aquele em que se isolou o menor (3,8%). A figura 3 mostra a distribuição sazonal das estirpes em 2008 e 2009.

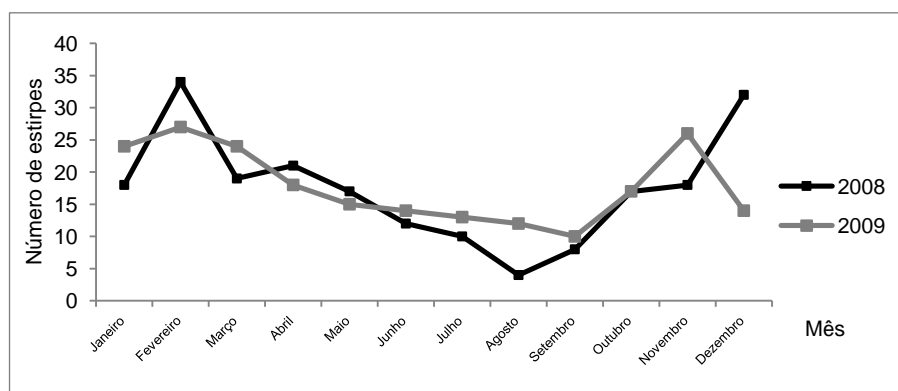


Figura 3: Distribuição sazonal das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009.

4.1.3 Amostras biológicas. Das 425 estirpes incluídas nesta análise, 88,5% (n=376) foram obtidas a partir de sangue, 6,6% (n=28) a partir de LCR, 2,8% (n=12) a partir de líquido pleural e 2,1% a partir de outros produtos biológicos (líquido ascítico, n=8, e líquido articular, n=1). A única estirpe obtida a partir de líquido articular foi isolada no ano de 2008.

4.2 Serotipagem

4.2.1 Distribuição dos serotipos em 2008 e 2009. No total detectaram-se 43 serotipos de pneumococos diferentes, 33 em 2008 e 37 em 2009. A diversidade foi elevada e indistinguível entre estes dois anos (sobreposição dos intervalos de confiança). Em 2008 o índice de diversidade de Simpson (SID) foi de 0,924 (95%CI=0,906-0,941) e em 2009 foi de 0,938 (95%CI=0,924-0,953). Embora com uma distribuição diferente, os anos de 2008 e 2009 possuem em comum os cinco serotipos mais frequentes: 1, 3, 7F, 14 e 19A. Das 425 estirpes analisadas em 2008 e 2009, 51% apresentaram um destes cinco serotipos. O serotipo 1 foi o mais comum em ambos os períodos, tendo provocado 16,7% e 17,9% das infecções consideradas neste estudo, nos anos de 2008 e 2009, respectivamente. Alguns serotipos foram detectados em apenas um dos anos. Os serotipos 13, 17A, 18A, 21, 28A, 34 e 39 surgiram apenas em 2008, enquanto os serotipos 6B, 7C, 15A, 17F, 18C, 25F, 29, 31, 33A e 35B, foram isolados apenas em 2009. A frequência destes serotipos na população foi sempre baixa (menor ou igual a 4). A Figura 4 mostra a distribuição dos serotipos nas estirpes de 2008 e 2009.

4.2.2 Distribuição dos serotipos por idade e sexo dos doentes. A distribuição dos serotipos pelas faixas etárias e pelo sexo dos doentes encontra-se representada na Figura 5. Esta figura mostra ainda a distribuição dos serotipos em função das vacinas PCV7, PCV10 e PCV13. Analisando os serotipos em função do sexo dos doentes, verifica-se que as estirpes responsáveis por infecção nas mulheres se distribuem por 33 serotipos diferentes, enquanto as estirpes responsáveis por infecção nos homens se distribuem por 43 serotipos diferentes. A diversidade destas duas populações é, contudo, semelhante (sobreposição dos intervalos de confiança). Os SIDs para estes dois grupos são de 0,748 (95%CI=0,604-0,892) e 0,835 (95%CI=0,737-0,933), respectivamente. Os serotipos 1, 7F, 3 e 8 (ordenação a partir do mais frequente) foram responsáveis por 51% das infecções detectadas no grupo das mulheres e os serotipos 1, 7F, 3, 14, 19A e 4 (ordenação a partir do mais frequente) foram responsáveis por 52% das infecções detectadas nos homens. Contudo, nenhum serotipo revelou estar mais associado a homens ou mulheres após realização de testes estatísticos (FDR > 0,05).

No que respeita à distribuição dos serotipos em função da faixa etária, observa-se uma elevada diversidade (indistinguível) de serotipos nos dois grupos etários considerados. No grupo constituído pelos indivíduos com 18 a 49 anos de idade detectaram-se 36 serotipos diferentes e no grupo constituído pelos indivíduos com 50 a 64 anos de idade detectaram-se 37. Para o grupo dos indivíduos com 18 a 49 anos de idade, o SID é de 0,898 (95%CI=0,848-0,949) e para o grupo dos indivíduos com 50 a 64 anos de idade, o SID é de 0,835 (95%CI=0,751-0,919). Os serotipos mais frequentes, que contabilizaram um mínimo de 50% das infecções nestes dois grupos etários, foram

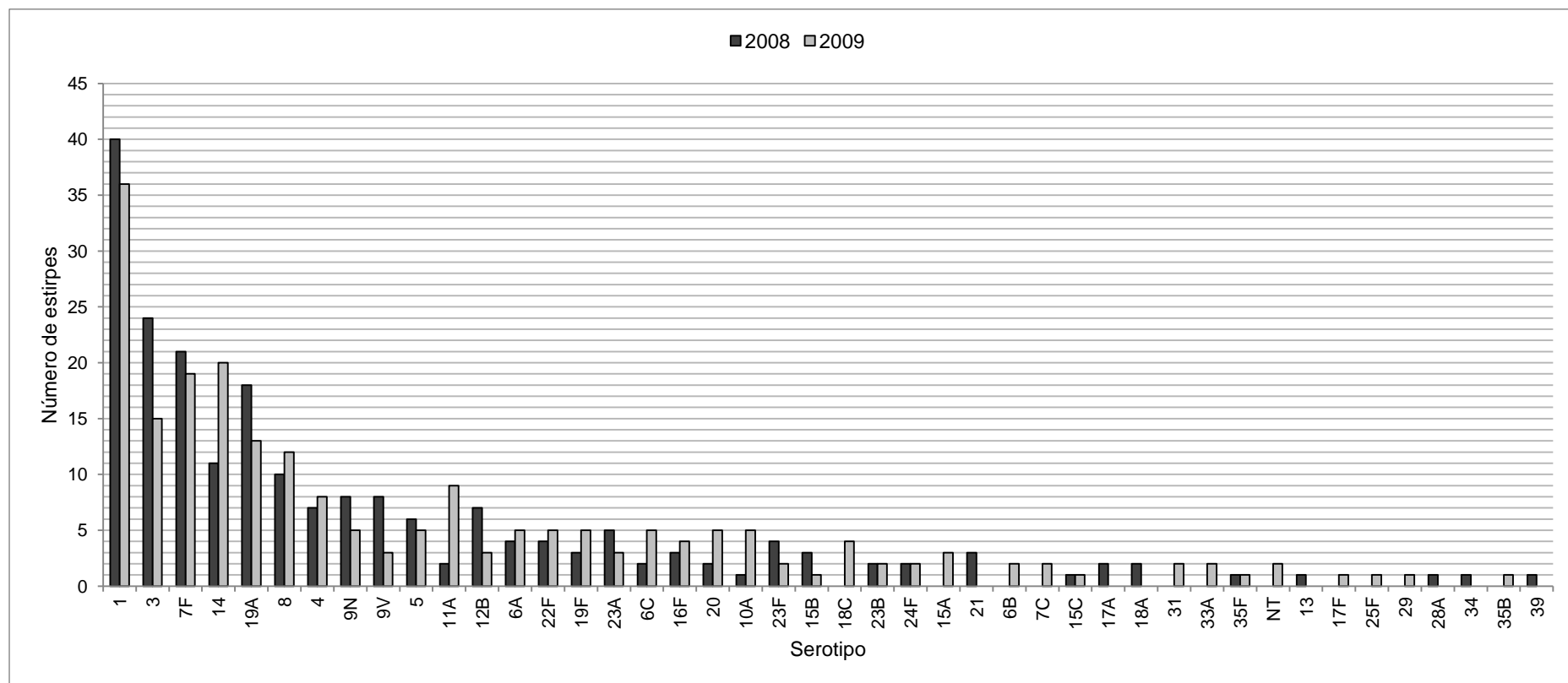


Figura 4: Frequência dos serotipos de pneumococos isolados de infecção invasiva em adultos nos anos de 2008 e 2009. Os serotipos estão organizados por ordem decrescente da soma das frequências de 2008 e 2009. “NT” – não tipável.

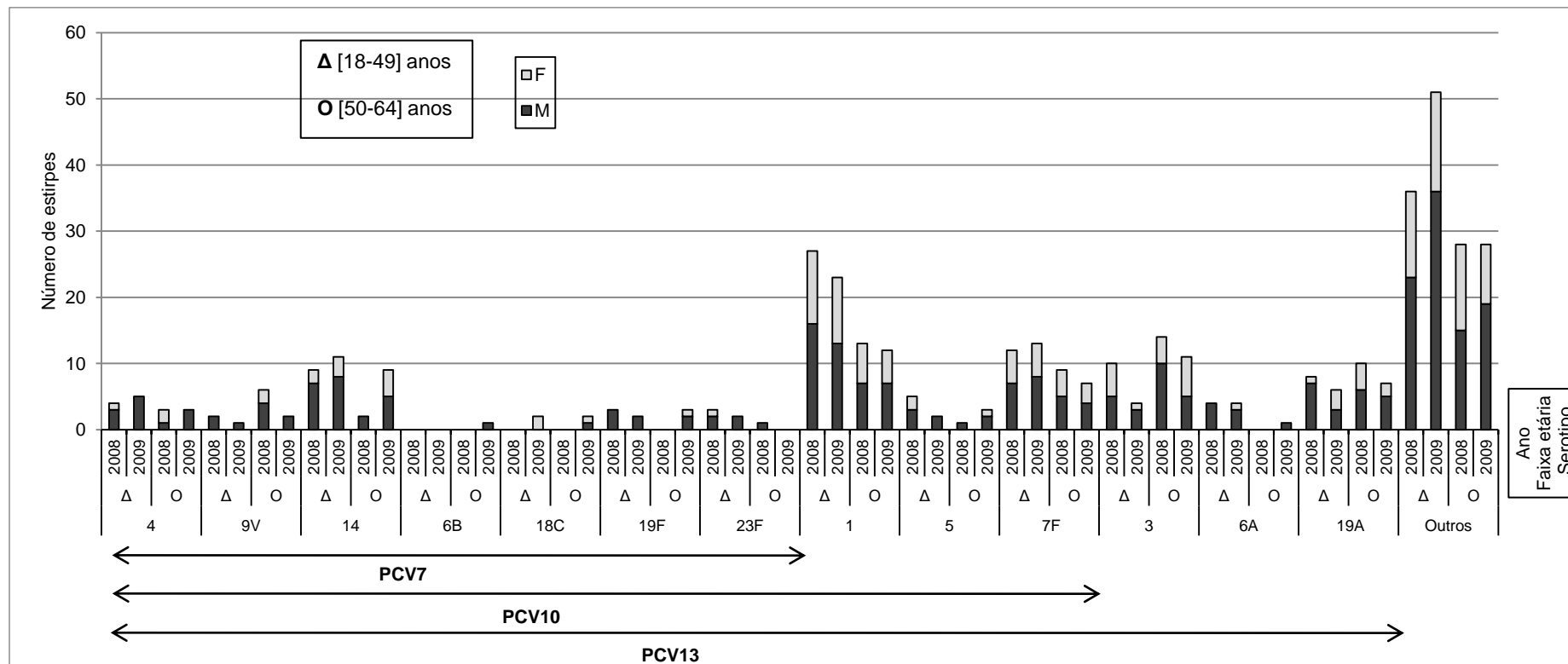


Figura 5: Distribuição dos serotipos de pneumococos pelas faixas etárias [18-49] e [50-64] anos e pelo sexo dos doentes, nos anos de 2008 e 2009. Os serotipos que estão incluídos nas vacinas PCV7, PCV10 e PCV13 estão representados com setas. A designação “outros” refere-se aos restantes serotipos de pneumococos que também foram detectados na população em estudo, mas que não fazem parte destas vacinas. A faixa etária [18-49] anos é representada pelo símbolo “Δ” e a faixa etária [50-64] anos é representada pelo símbolo “O”. Abreviaturas: “F” - sexo feminino, “M” - sexo masculino.

os serotipos 1, 7F, 14, 8 e 3 (ordenação a partir do mais frequente) no caso dos mais jovens (frequência de 50,2%), e os serotipos 1, 3, 19A, 7F e 14 (ordenação a partir do mais frequente) no caso dos mais velhos (frequência de 53,4%). Enquanto no primeiro grupo o serotipo 1 foi o mais frequentemente isolado, tendo sido responsável por 20,1% de todas as infecções, no segundo, o serotipo 1 partilha com o serotipo 3 o lugar de mais frequente. Para averiguar a existência de associação entre serotipo 3 e a faixa etária [50-64] anos determinou-se o valor de *odds ratio* respectivo. Apesar de se ter detectado uma associação positiva e estatisticamente significativa entre o serotipo 3 e a faixa etária mais velha ($p=0,00342$), esta deixou de ser significativa após a correcção para testes múltiplos ($FDR=0,1503$).

Os serotipos das vacinas PCV7, PCV10 e PCV13 foram responsáveis por 18,1%, 48% e 65,6% das infecções detectadas. Analisando por faixa etária, estas vacinas teriam o potencial de cobrir, respectivamente, 18,1%, 51% e 65,5% das infecções detectadas no grupo dos indivíduos com 18 a 49 anos de idade e 18,2%, 43,8% e 68,2%, das infecções detectadas no grupo de indivíduos com 50 a 64 anos de idade.

4.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos

4.3.1 Susceptibilidade geral. A Figura 6 mostra a percentagem de estirpes que se apresentaram não susceptíveis aos antimicrobianos testados. Os antibióticos vancomicina, linezolid e levofloxacina não foram incluídos no gráfico, visto que todas as estirpes se apresentaram susceptíveis a estes três agentes. Não se registou nenhuma alteração estatisticamente significativa entre a proporção de não susceptibilidade, entre os anos de 2008 e 2009.

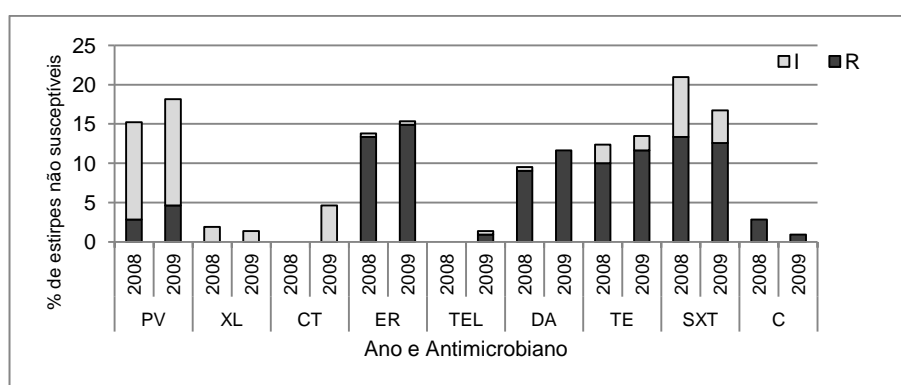


Figura 6: Susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009. “PV” - penicilina; “XL” - amoxicilina; “CT” - cefotaxima; “ER” - eritromicina; “TEL” - telitromicina; “DA” - clindamicina; “TE” - tetraciclina; “SXT” - sulfametoxazol-trimetoprim; “C” - cloranfenicol; “I” - intermédio; “R” - resistente.

Das 425 estirpes analisadas em 2008 e 2009, 136 (32%) apresentaram-se não susceptíveis a pelo menos um antibiótico e 65 (15,3%) apresentaram-se multi-resistentes (não susceptíveis a pelo menos três classes diferentes de antibióticos). Os antimicrobianos para os quais se registaram os maiores valores de não susceptibilidade foram, por ordem decrescente, o sulfametoxazol-trimetoprim (18,2%), penicilina (16,7%), eritromicina (14,6%), tetraciclina (12,9%) e clindamicina

(10,6%). No caso da penicilina, a não susceptibilidade correspondeu sobretudo a uma resistência intermédia. Para a amoxicilina e para a cefotaxima, apenas se detectaram estirpes com resistência intermédia (1,7% e 2,4%, respectivamente). Tal como para a cefotaxima, a não susceptibilidade à telitromicina foi registada apenas no ano de 2009 (0,7%). A não susceptibilidade ao cloranfenicol foi de 1,9%.

4.3.3 Serotipos associados à não susceptibilidade aos antimicrobianos. Para averiguar a existência de uma associação entre resistência aos antibióticos e serotipo determinaram-se os coeficientes de Wallace entre esta técnica de tipagem relativamente à não susceptibilidade à penicilina ou eritromicina (Quadro 11, Anexo 1). De acordo com os valores obtidos, duas estirpes de serotipo igual possuem uma probabilidade superior a 80% de apresentarem o mesmo perfil de resistência à penicilina, ou eritromicina.

Os serotipos mais frequentemente encontrados entre as estirpes não susceptíveis bem como os seus perfis de susceptibilidade estão descritos no Quadro 9. Apresentam-se os resultados de 2008 e 2009 em conjunto, visto não existirem diferenças significativas entre estes dois anos.

Quadro 9: Serotipos de pneumococos isolados de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009, que apresentaram as maiores taxas de não susceptibilidade aos antimicrobianos.

Serotipo	n	S	Número de estirpes não susceptíveis a						
			Pelo menos 1 antibiótico	PV	ER	DA	TE	SXT	MR
5	11	1	10	0	0	0	0	10	0
6C	7	2	5	5	2	2	2	1	2
9V	11	4	7	5	2	0	2	6	2
10A	6	2	4	1	1	1	3	1	1
14	31	0	31	26	16	5	0	21	14
15A	3	0	3	3	3	3	1	0	3
19A	31	10	21	9	15	15	20	12	20
19F	8	0	8	6	7	6	6	2	6
23F	6	1	5	5	0	0	0	0	0
24F	4	1	3	2	3	3	3	3	3
Outros	307	268	39	5	12	10	18	24	14
Total	425	289	136	67	61	45	55	80	65

“n” – número total de estirpes; “S” – totalmente susceptíveis; “PV” – penicilina; “ER” – eritromicina; “DA” – clindamicina; “TE” – tetraciclina; “SXT” – sulfametoxazol-trimetoprim; “MR” – Multi-resistentes (consideraram-se multi-resistentes aos antibióticos as estirpes que apresentaram não susceptibilidade a pelo menos três classes diferentes de antibióticos). “Outros” – corresponde aos outros 33 serotipos e às estirpes não tipáveis também detectadas. Incluíram-se no quadro apenas os serotipos detectados num mínimo de três estirpes. A negrito apresentam-se os serotipos que fazem parte da vacina PCV7.

Para determinar que serotipos se encontram significativamente associados à não susceptibilidade determinaram-se os valores de *odds ratio* relativamente à penicilina, eritromicina e multi-resistência (Quadro 12, Anexo 2). Os resultados permitiram verificar que as estirpes de serotipo 6C, 14, 15A, 19A, 19F e 23F estão associadas com a não susceptibilidade à penicilina e que as estirpes de serotipo 14, 15A, 19A e 19F estão associadas com a não susceptibilidade à

eritromicina. Pelo contrário, o serotipo 1 mostrou estar associado com a susceptibilidade à penicilina e eritromicina e o serotipo 7F mostrou estar associado com a susceptibilidade à penicilina. Neste trabalho, a multi-resistência aos antibióticos está associada aos serotipos 14, 15A, 19A e 19F. Contudo, foram as estirpes de serotipo 19A, que mais contribuíram para os valores detectados para a multi-resistência visto que 30,8% das estirpes multi-resistentes são deste serotipo. O serotipo 19A foi o que mais contribuiu para a não susceptibilidade à clindamicina (33,3%) e tetraciclina (36,4%) e foi o segundo mais frequente entre as estirpes não susceptíveis à penicilina (18,3%), eritromicina (24,2%) e sulfametoxazol-trimetoprim (15%). Todas as estirpes de serotipo 14 apresentaram-se não susceptíveis a pelo menos um antibiótico. As estirpes deste serotipo foram as que mais contribuíram para os valores de não susceptibilidade alcançados para a penicilina, eritromicina e sulfametoxazol-trimetoprim (36,6%, 27,4% e 26,3% das estirpes resistentes a estes antibióticos, respectivamente, são de serotipo 14). Apesar dos valores de não susceptibilidade detectados neste estudo para a tetraciclina se aproximarem dos 13%, todas as estirpes de serotipo 14 se apresentaram susceptíveis a este antibiótico.

Relativamente aos antibióticos que não foram incluídos no Quadro 9, os resultados obtidos são os que se seguem: para a amoxicilina e para a cefotaxima, encontraram-se os mesmos três serotipos entre as estirpes não susceptíveis (9V, 14 e 19A); detectaram-se três estirpes de serotipos diferentes não susceptíveis à telitromicina (10A, 14 e 19A); a resistência ao cloranfenicol foi encontrada numa vasta gama de serotipos diferentes (6B, 6C, 7F, 12B, 18A, 19A e 23A).

Os serotipos que fazem parte das vacinas PCV7 e PCV13 foram responsáveis por 60,6% e 80,3%, respectivamente, da não susceptibilidade alcançada para a penicilina (os resultados obtidos para as vacinas PCV7 e PCV10 são iguais para este antibiótico, pois todas as estirpes de serotipo 1, 5 e 7F se apresentaram susceptíveis à penicilina). Os serotipos vacinais da PCV7, PCV10 e PCV13 foram responsáveis por 43,5%, 48,4% e 77,4%, respectivamente, da não susceptibilidade obtida para a eritromicina. Entre as estirpes não susceptíveis aos antibióticos detectaram-se 16 serotipos distintos, que não estão incluídos em nenhuma das vacinas conjugadas (6C, 8, 9N, 10A, 12B, 15A, 15B, 15C, 16F, 18A, 20, 21, 23A, 23B, 24F, 33A).

4.3.4 Fenotipos de resistência aos macrólidos e serotipos associados. A Figura 7 mostra a percentagem de estirpes que apresentaram os fenotipos MLS_B e M de resistência aos macrólidos e no Quadro 10 mostram-se os serotipos associados a esses fenotipos.

No período estudado, 10,6% (n=45) das estirpes apresentaram fenotipo MLS_B de resistência aos macrólidos e 4% (n=17) apresentaram fenotipo M. De 2008 para 2009 há um ligeiro aumento na percentagem de estirpes com o fenotipo MLS_B e uma ligeira diminuição na percentagem de estirpes com o fenotipo M, mas estas alterações não são estatisticamente significativas (p=0.6383 e p=0.8062, respectivamente).

O fenotipo MLS_B foi detectado em 14 serotipos diferentes e o fenotipo M foi detectado em cinco. O serotipo que mais contribuiu para o fenotipo MLS_B foi o 19A (33,3%) e o que mais contribuiu para o fenotipo M foi o 14 (70,6%). Todas as estirpes de serotipo 19A que se apresentaram não susceptíveis à eritromicina, apresentaram o fenotipo MLS_B. O coeficiente de Wallace detectado para o serotipo em função do fenotipo de resistência aos macrólidos indica que

duas estirpes de um mesmo serotipo possuem cerca de 82% de probabilidade de terem o mesmo fenotipo de resistência aos macrólidos (Quadro 11, Anexo 1). De modo a identificar quais os serotipos associados aos fenotipos de resistência aos macrólidos calcularam-se os valores de *odds ratio* (Quadro 12, Anexo 2). Os resultados indicam que os serotipos 15A, 19F, 24F e 19A estão significativamente associados ao fenotipo MLS_B de resistência aos macrólidos e que o serotipo 14 está significativamente associado ao fenotipo M.

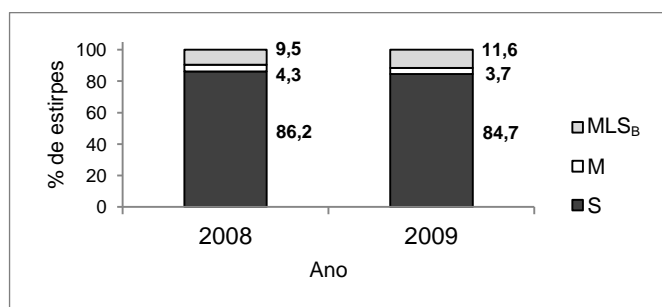


Figura 7: Fenotipos de resistência aos macrólidos das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009. "S" - estirpes totalmente susceptíveis aos macrólidos.

Quadro 10: Serotipos isolados de infecção invasiva em adultos, nos anos de 2008 e 2009, que apresentaram fenótipos MLS_B e M de resistência aos macrólidos.

Serotipo	N total	MLS _B			M		
		2008	2009	Total	2008	2009	Total
1	76	2	0	2	-	-	-
3	39	1	1	2	1	-	1
6B	2	-	1	1	-	-	-
6C	7	-	2	2	-	-	-
7F	40	1	-	1	-	-	-
9V	11	-	-	-	1	1	2
10A	6	-	1	1	-	-	-
14	31	2	3	5	5	7	12
15A	3	-	3	3	-	-	-
15B	4	1	-	1	1	-	1
19A	31	8	7	15	-	-	-
19F	8	2	4	6	1	-	1
23A	8	1	-	1	-	-	-
24F	4	2	1	3	-	-	-
33A	2	-	2	2	-	-	-
Total	-	20	25	45	9	8	17

"N total" - número total de estirpes isoladas.

4.4 Perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, e perfis de MLST

Para avaliar a diversidade genética das estirpes responsáveis por infecção invasiva em indivíduos adultos nos anos de 2008 e 2009 determinaram-se os seus perfis de PFGE e MLST. Todas as estirpes desta colecção (n=425) foram analisadas por PFGE e 224 foram analisadas por MLST. Após análise por MLST verificou-se a existência de 87 perfis alélicos (ST) distintos, que por sua vez se distribuem por 48 complexos clonais (CC), de acordo com a análise goeBURST. A

diversidade dos perfis de MLST é elevada, tal como indicado pelo índice de diversidade de Simpson ($SID=0,983$, $95\%CI=0,974-0,992$). Os perfis alélicos mais frequentes, que surgiram em 49,6% das estirpes, foram os perfis ST306 ($n=34$, 15,2%), ST191 ($n=21$, 9,4%) ST180 ($n=10$, 4,5%), ST156 ($n=10$, 4,5%), ST53 ($n=7$, 3,1%), ST66 ($n=7$, 3,1%) ST289 ($n=5$, 2,2%), ST408 ($n=5$, 2,2%), ST232 ($n=4$, 1,8%), ST179 ($n=4$, 1,8%) e ST199 ($n=4$, 1,8%). Os complexos clonais mais frequentes, que surgiram em 52,2% das estirpes analisadas, foram os complexos CC306 ($n=38$, 17,0%), CC156 ($n=26$, 11,6%), CC191 ($n=21$, 9,4%), CC62 ($n=12$, 5,8%), CC180 ($n=10$, 4,5%) e CC230 ($n=9$, 4,0%).

Para avaliar a associação entre perfis de PFGE e perfis de MLST determinaram-se os coeficientes de Wallace respectivos (Quadro 11, Anexo 1). O coeficiente de Wallace da técnica de MLST em relação à de PFGE é de 0,941 o que indica que duas estirpes com um mesmo ST têm uma probabilidade de cerca de 94% de pertencerem à mesma linhagem de PFGE. Contudo, duas estirpes que pertençam a uma mesma linhagem de PFGE têm apenas 57% de probabilidade de possuírem um mesmo ST ($W=0,572$).

A existência de uma relação entre serotipo e resistência aos antibióticos já foi verificada neste trabalho (secção 4.3.3). Para averiguar a existência de uma relação entre genotipo e resistência aos antibióticos, determinaram-se os coeficientes de Wallace entre as linhagens de PFGE e MLST, relativamente ao perfil de susceptibilidade à penicilina, eritromicina e fenotipos de resistência aos macrólidos (Quadro 11, Anexo 1). Os resultados obtidos indicam que o genotipo está de facto relacionado com o perfil de susceptibilidade aos antibióticos, tendo uma força de associação que é igual ou superior à do serotipo. A técnica de tipagem que melhor prevê o perfil de susceptibilidade à penicilina é o MLST. Duas estirpes que possuam em comum o mesmo ST têm uma probabilidade de cerca de 97,5% de possuírem o mesmo perfil de susceptibilidade a este antibiótico ($W=0,975$). Para determinar que perfis alélicos estão relacionados com os perfis de resistência à penicilina, eritromicina, e fenotipos de resistência aos macrólidos calcularam-se os valores de *odds ratio* respectivos (quadro 12, anexo 2). Os resultados obtidos indicam que o ST156 está associado com a não susceptibilidade à penicilina e que o ST179 está associado com a não susceptibilidade à eritromicina e fenótipo MLS_B de resistência aos macrólidos. Contudo muitos outros STs foram responsáveis pelos valores de não susceptibilidade detectados para estes antibióticos. Todas as estirpes de ST143, ST276, ST338 e ST4575 se revelaram não susceptíveis à penicilina e todas as estirpes de ST9, ST193, ST276, ST350 e ST4575 se revelaram não susceptíveis à eritromicina. Apesar de se ter detectado uma associação positiva estatisticamente significativa pelo teste de Fisher ($p<0,05$), após a correcção para testes múltiplos esta significância foi eliminada.

Na Figura 8 apresenta-se um exemplo de uma fotografia de um gel de PFGE obtido neste trabalho. Posteriormente apresentam-se os dendrogramas simplificados dos perfis obtidos por PFGE dos sete serotipos mais frequentes na colecção de estirpes em estudo (1, 3, 7F, 14, 19A, 8 e 4) e também de outros dois, que embora não sejam tão frequentes estão associados à resistência aos antibióticos (9V e 19F). Juntamente com os dendrogramas apresentam-se os STs e os perfis de resistência aos antibióticos (antibiótípos) correspondentes a cada linhagem de PFGE. Consideraram-se “clones” de PFGE, as linhagens de PFGE compostas por cinco ou mais estirpes. A informação relativa aos restantes serotipos encontra-se resumida no Quadro 13 (Anexo 3).

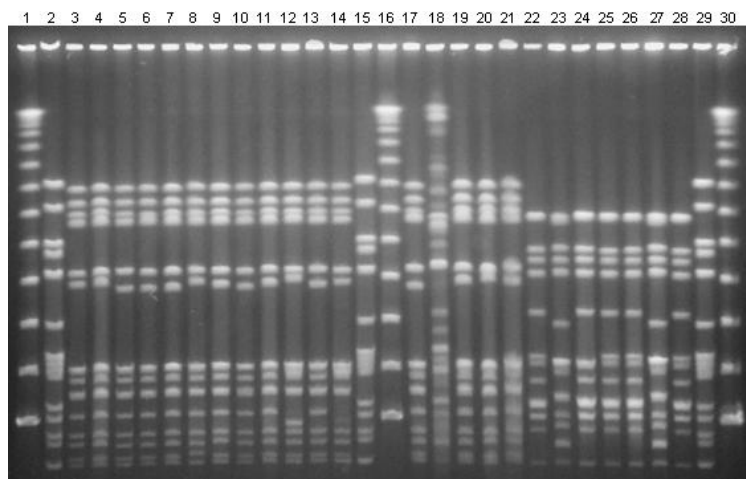


Figura 8: Fotografia de um gel de PFGE. As pistas 1, 16 e 30 correspondem ao marcador de massa molecular *Lambda Ladder PFGE Marker*, as pistas 2, 15 e 29 correspondem à estirpe R36A [56]; as pistas 3 a 14 e 17 a 21 correspondem a estirpes de serotipo 1 e as pistas 22 a 28 correspondem a estirpes de serotipo 3. A estirpe da pista 18 apresenta restrição incompleta com a enzima Smal, pelo que foi necessário repetir a técnica de PFGE, para esta estirpe, com a enzima Cfr9I.

4.4.1 Serotipo 1

As estirpes de serotipo 1 (Figura 9) distribuem-se em duas linhagens distintas de PFGE. Na linhagem de PFGE com maior número de estirpes existem, pelo menos, três STs diferentes, sendo que, de acordo com a análise goeBURST, fazem todos parte do mesmo complexo clonal (CC306). O ST4578 é um SLV do fundador e o ST228 é um DLV. O ST306 corresponde a um clone internacional da colecção PMEN, Sweden¹-306 (www.sph.emory.edu/PMEN/). Este ST e o ST228 são frequentes na Europa [15], mas o ST4578 é um perfil alélico novo que foi reportado pela primeira vez por Portugal, no ano de 2007 (<http://www.mlst.net/>). Relativamente à linhagem de PFGE composta por duas estirpes, estas são caracterizadas pelo ST350, que já reportado na Europa (<http://www.mlst.net/>). Este ST pertence ao CC306 apesar de só possuir quatro alelos em comum com o ST fundador. É de salientar que é nesta linhagem que se encontram as duas únicas estirpes de serotipo 1 que apresentam resistência a antibióticos testados.

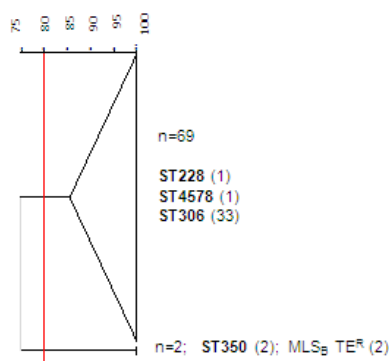


Figura 9: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 1, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009: As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “*MLSB*” - resistente aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B; “*TE^R*” – resistente à tetraciclina.

4.4.2 Serotipo 3

As estirpes de serotipo 3 distribuem-se por quatro linhagens de PFGE diferentes (Figura 10). Dos perfis alélicos detectados, o ST180 foi o mais frequente, sendo, de acordo com a análise goeBURST, o fundador do complexo clonal onde se insere. Este representa um clone da colecção PMEN, o clone Netherlands³-180 (www.sph.emory.edu/PMEN/). Os STs 232 e 1377 pertencem ao CC378 e são DLVs entre si. O ST260, encontrado tanto na linhagem com maior número de estirpes como na linhagem com duas estirpes, é também fundador de um complexo clonal. Segundo a base de dados de MLST (<http://www.mlst.net/>) todos estes STs já foram detectados em outros países. A maioria das estirpes apresentou-se susceptível aos antimicrobianos testados.

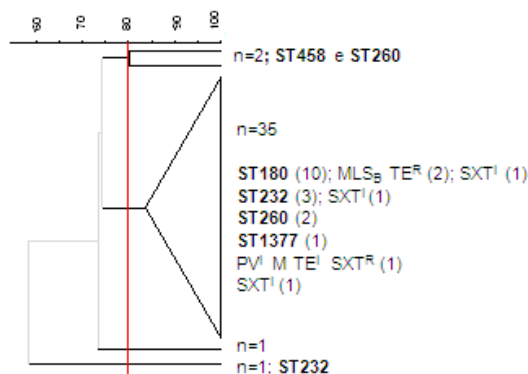


Figura 10: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 3, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “MLS_B” - resistente aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B; “TE” - tetraciclina; “SXT” - sulfametoxazol-trimetoprim; “PV” - penicilina; “M” - resistente aos macrólidos. Letras acima da linha: “R” - resistente; “I” - intermédio.

4.4.3 Serotipo 7F

Todas as estirpes de serotipo 7F (Figura 11) pertencem ao mesmo clone de PFGE representado pelo perfil alélico 191. Este clone corresponde a um clone disseminado internacionalmente da colecção PMEN, o clone Netherlands^{7F}-191 (www.sph.emory.edu/PMEN/). Das 40 estirpes, apenas duas apresentaram resistência aos antimicrobianos.

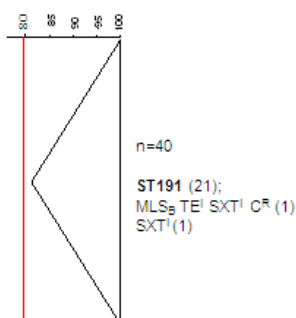


Figura 11: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 7F, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “MLS_B” - resistente aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B; “TE” - tetraciclina; “SXT” - sulfametoxazol-trimetoprim; “C” - cloranfenicol. Letras acima da linha: “R” - resistente; “I” - intermédio.

4.4.4 Serotipo 14

As estirpes de serotipo 14 (Figura 12) distribuem-se por três linhagens diferentes de PFGE. No clone de PFGE principal (n=25) detectaram-se quatro perfis alélicos distintos. A análise goeBURST demonstrou que o ST156 é o fundador de um grande complexo clonal, onde se inserem os STs 143, 2944 e 4575. Estes perfis alélicos são iguais (ST156) ou variantes (ST143, ST2944 e ST4575) do clone da colecção PMEN, Spain^{9V}-156 (www.sph.emory.edu/PMEN/). O ST4575 foi descoberto pela primeira vez em Portugal, em 2004 (<http://www.mlst.net/>). Relativamente ao outro clone de PFGE, constituído por cinco estirpes, detectou-se o ST9, que corresponde ao clone da colecção PMEN, England¹⁴-9 (www.sph.emory.edu/PMEN/). Este já foi detectado como causador de infecções na Europa, Austrália e Argentina (<http://www.mlst.net/>). Neste clone encontram-se estirpes susceptíveis à penicilina e de fenotipo M, enquanto que no maior se encontram estirpes não susceptíveis à penicilina e que estão implicadas em ambos os fenotipos de resistência aos macrólidos (M ou MLS_B). É neste último clone que se encontra o ST156, que, tal como já foi referido, está associado à não susceptibilidade à penicilina.

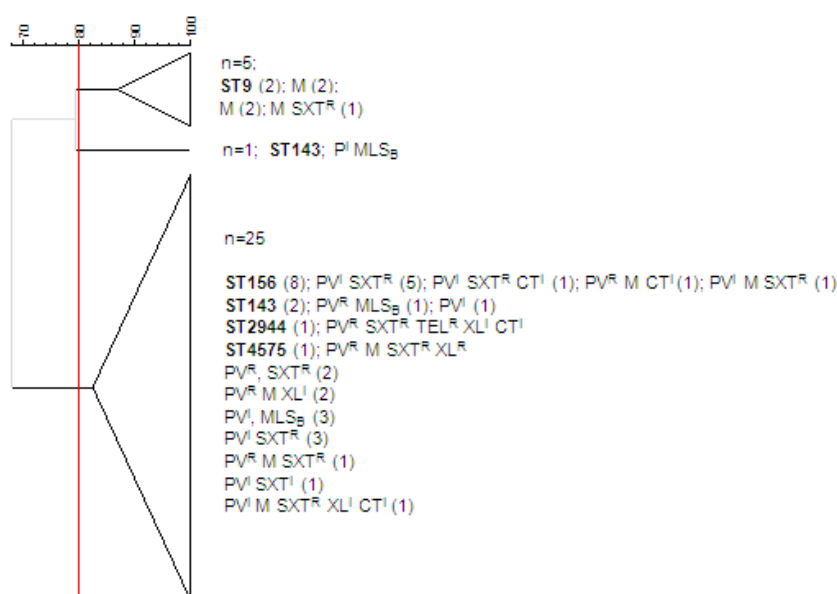


Figura 12: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 14, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “PV” - penicilina; “SXT” - sulfametoxazol-trimetoprim; “CT” - cefotaxima; “M” - resistente aos macrólidos; “MLS_B” - resistente aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B; “TEL” - telitromicina; “XL” - amoxicilina. Letras acima da linha: “R” - resistente; “I” - intermédio.

4.4.5 Serotipo 19A

As estirpes de serotipo 19A (Figura 13) distribuem-se por oito linhagens distintas de PFGE, sendo que a maior delas tem 12 estirpes. Neste clone identificaram-se quatro STs diferentes, ST276, ST878, ST6178 e ST6174, que pertencem ao mesmo CC (CC230). O ST230 corresponde a um clone da colecção PMEN, Denmark¹⁴-230, que tem aumentado de frequência na Europa após a introdução da vacina PCV7, incluindo em Portugal [3]. Os STs 6174 e 6178 foram descobertos

pela primeira vez em Portugal, no ano de 2008 (<http://www.mlst.net/>). Todas as estirpes pertencentes ao clone de PFGE maior apresentaram-se não susceptíveis à penicilina e muitas apresentaram também o fenotipo MLS_B de resistência aos macrólidos. Um outro clone de PFGE apresentou dois STs diferentes, o ST416 e o ST2013. Estes STs pertencem a complexos clonais distintos, segundo a análise goeBURST. O ST2013 faz parte do CC230 (<http://www.mlst.net/>) e o ST416 faz parte do CC199. O fundador do CC199 (ST199) corresponde a um clone da colecção PMEN, o clone Netherlands^{15B}-37, que está disseminado por todo o mundo (www.sph.emory.edu/PMEN/). Na linhagem com três estirpes detectaram-se os STs 199 e 1201. O ST1201, de acordo com a análise goeBURST, faz parte de um outro complexo clonal, o CC15. O fundador deste complexo clonal já foi detectado em vários países do mundo (<http://www.mlst.net/>).

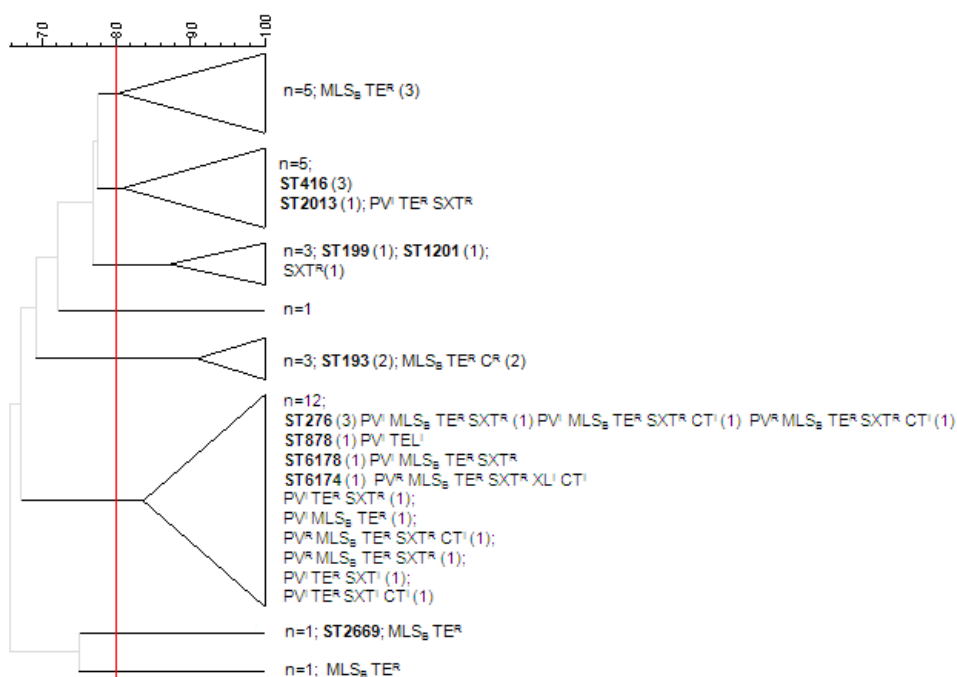


Figura 13: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 19A, isoladas de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “ MLS_B ” - resistente aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B; “TE” - tetraciclina; “PV” - penicilina; “SXT” - sulfametoxazol-trimetoprim; “CT” - cefotaxima; “C” – cloranfenicol; “TEL” - telitromicina. Letras acima da linha: “R” - resistente; “I” - intermédio.

4.4.6 Serotipo 8

As estirpes de serotipo 8 (Figura 14) distribuem-se por quatro linhagens distintas de PFGE. Na maior delas ($n=16$) detectou-se o ST53. Este ST corresponde ao clone internacionalmente disseminado da colecção PMEN, Netherlands⁸-53. Uma outra linhagem de PFGE ($n=4$) inclui estirpes de ST404. Estirpes com este perfil alélico já foram reportadas por alguns países da Europa e Brasil (<http://www.mlst.net/>). Estes dois STs, segundo a análise goeBURST, fazem parte de dois complexos clonais distintos (CC62 e CC1480, respectivamente).

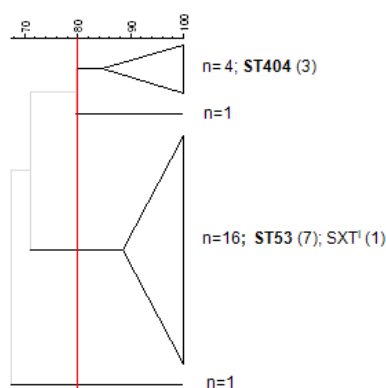


Figura 14: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 8, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “SXT^I” - resistência intermédia ao sulfametoxazol-trimetoprim.

4.4.7 Serotipo 4

As estirpes de serotipo 4 (Figura 15) distribuem-se por seis linhagens de PFGE. Na linhagem constituída por cinco estirpes detectaram-se dois STs diferentes. O ST1221 foi detectado pela primeira vez em Portugal, como causador de infecção invasiva no ano 2000. O ST259 já foi reportado por Espanha (<http://www.mlst.net/>). Estes dois STs, segundo a análise goeBURST, pertencem a complexos clonais distintos e pequenos, onde são considerados fundadores. Uma outra linhagem de PFGE apresentou três estirpes de perfil alélico 205 (CC205). Este ST encontra-se bastante disseminado na Europa e também já foi reportado na Austrália, EUA e Canadá. O ST1222 (CC5902), detectado noutra linhagem de PFGE, já foi reportado pela África do Sul (<http://www.mlst.net/>).

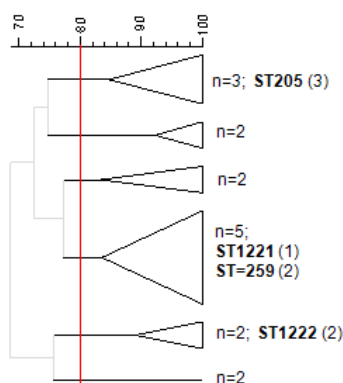


Figura 15: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 4, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs.

4.4.8 Serotipo 9V

As estirpes do serotipo 9V (Figura 16) formaram quatro linhagens de PFGE distintas. Na principal (n=8) detectaram-se os STs 156 e 162. O ST156, que já foi referido para o serotipo 14 (clone PMEN Spain^{9V}-156), é o fundador do complexo clonal onde se insere o ST162. O ST162 já foi reportado em alguns países da Europa e nos EUA (<http://www.mlst.net/>). O ST280, que foi detectado em duas estirpes que se encontram em duas linhagens diferentes de PFGE, segundo a análise goeBURST, pertence ao CC156, apesar de só possuir um alelo em comum com o seu fundador. O ST280 já foi reportado na Europa, Ásia, África e América do Sul (<http://www.mlst.net/>).

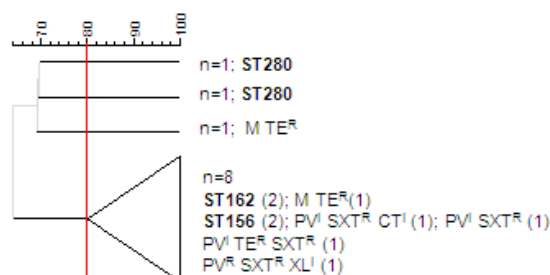


Figura 16: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 9V, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “M” – resistência aos macrólidos; “TE” - tetraciclina; “PV” - penicilina; “SXT” - sulfametoxazol-trimetoprim; “CT” – cefotaxima; “XL” - amoxicilina. Letras acima da linha: “R” - resistente; “I” - intermédio.

4.4.9 Serotipo 19F

As estirpes de serotipo 19F (Figura 17) distribuem-se por duas linhagens distintas de PFGE, que parecem ter perfis alélicos próprios. Na linhagem principal (n=7) detectou-se o ST179, cuja presença já foi reportada na Europa e na Coreia do Sul (<http://www.mlst.net/>). Este ST, tal como já foi referido, está associado à resistência à eritromicina e fenótipo MLS_B de resistência aos macrólidos. A estirpe pertencente à outra linhagem de PFGE apresenta o perfil alélico 162, que também foi detectado em estirpes de serotipo 9V, neste trabalho.

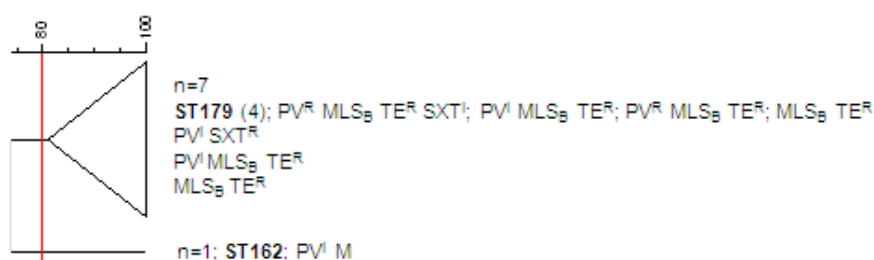


Figura 17: Dendrograma simplificado construído com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes de serotipo 19F, obtidas a partir de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. As estirpes com uma semelhança genética igual ou superior a 80% (indicada pela linha de corte vermelha) foram consideradas como pertencentes à mesma linhagem de PFGE. Entre parêntesis indica-se o número de estirpes detectadas para cada ST ou antibiótipo. Os números a negrito representam STs. Abreviaturas: “PV” - penicilina; “MLS_B” - resistente aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B; “TE” – tetraciclina; “SXT” - sulfametoxazol-trimetoprim; “M” – resistência aos macrólidos. Letras acima da linha: “R” - resistente; “I” - intermédio.

4.5 Distribuição das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2

Das 425 estirpes em análise 13,3% (n=56) apresentaram o gene *rlrA* (indicador da presença da ilha de patogenicidade PI-1) e 28% (n=119) apresentaram o gene *sipA* (indicador da presença da ilha de patogenicidade PI-2). Apenas uma estirpe, de serotipo 19A (e ST2669), apresentou os dois genes, indicando a presença das duas ilhas de patogenicidade. Entre as estirpes em que se amplificou o gene *rlrA* seleccionaram-se representantes de cada serotipo, para amplificar todo o *locus*. Todas as estirpes testadas amplificaram um fragmento de DNA de cerca de 14 kb, confirmando que a presença do gene *rlrA* é um bom indicador da presença da ilha PI-1.

A presença das ilhas PI-1 e PI-2 foi analisada em função da sua frequência nos serotipos (Figura 18). De acordo com esta análise é possível verificar que a ilha PI-1 surgiu em sete serotipos diferentes, sendo que cinco fazem parte da vacina PCV7 (4, 6B, 9V, 14 e 19F). A ilha PI-2 surgiu apenas em estirpes de serotipo 1, 7F e 19A, que são serotipos incluídos na vacina 13-valente. A associação do serotipo com a presença da ilha PI-1 e PI-2 é realçada pelos coeficientes de Wallace obtidos (Quadro 11, Anexo 1). De acordo com estes valores, duas estirpes de um mesmo serotipo têm uma probabilidade de cerca de 93% de se apresentarem iguais relativamente à presença ou ausência da ilha PI-1. No caso da ilha PI-2, a probabilidade de duas estirpes de um mesmo serotipo se apresentarem iguais relativamente à presença ou ausência desta ilha é de cerca de 99%. Determinaram-se ainda os valores de *odds ratio* para detectar associações estatisticamente significativas entre os serotipos e a presença das ilhas PI-1 e PI-2 (Quadro 12, Anexo 1). Com esta análise foi possível verificar que os serotipos 4, 9V, 14 e 19F estão associados com a presença da ilha PI-1 e que os serotipos 1 e 7F estão associados com a presença da ilha PI-2.

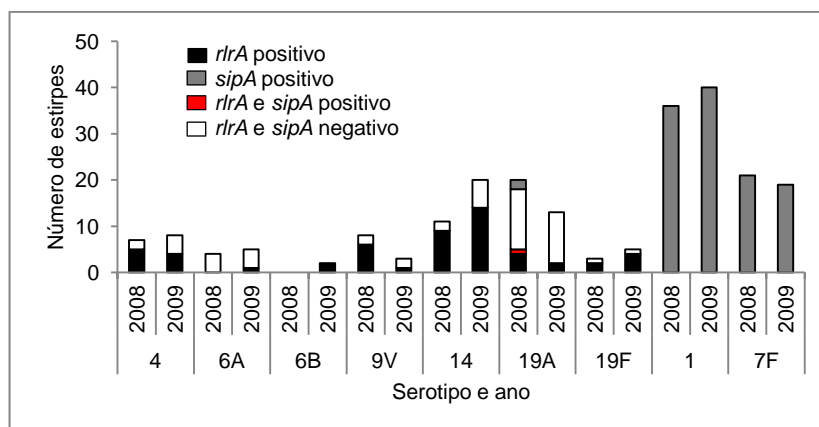


Figura 18: Distribuição das ilhas PI-1 e PI-2 de acordo com os serotipos em que foram detectadas.

Um estudo realizado em Portugal, no Instituto de Microbiologia, demonstrou que a presença da ilha PI-1 é uma propriedade clonal [5] e que a associação entre clone de PFGE e a presença da ilha PI-1 é mais forte do que a associação entre o serotipo e a presença desta ilha. No presente estudo, o coeficiente de Wallace obtido entre os clones de PFGE e a presença/ausência da ilha PI-1 é bastante elevado ($W=0,948$, Quadro 11, Anexo 1), mas não pode ser considerado superior ao obtido para a associação entre o serotipo e a presença da ilha PI-1, devido à sobreposição dos

intervalos de confiança. A presença das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2 está também relacionada com os clones de MLST, tal como sugerido pelos coeficientes de Wallace [$W=0,98$ e $W=1,00$, respectivamente (Quadro 11, Anexo 1)] Para saber que STs estão relacionados com as ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2 calcularam-se os valores de *odds ratio* respectivos (Quadro 12, Anexo 2). Os resultados obtidos indicam que existe uma associação positiva entre os STs 143, 156, 162, 205 e 416 com a ilha PI-1 e uma associação positiva entre os STs 191 e 306 com a ilha PI-2.

Neste trabalho analisou-se a frequência das *clades* nas estirpes em que se detectou o gene *rfaA* e também a frequência dos fragmentos de DNA nas estirpes negativas para este gene. Com esta análise foi possível verificar que, das 56 estirpes que apresentaram a ilha PI-1, 35 (62,5%) correspondiam à ilha tipo *clade* I, 6 (10,7%) correspondiam à ilha tipo *clade* II e 15 (26,8%) correspondiam à ilha tipo *clade* III. Relativamente às estirpes *rfaA* negativas, 320 (88,15%) amplificaram um fragmento do tipo A, 4 (1,10%) amplificaram um fragmento do tipo B, e 39 (10,7%) amplificaram um fragmento do tipo C. Para determinar qual o método de tipagem que melhor prevê a distribuição dos tipos de *clades* e dos fragmentos das estirpes *rfaA* negativas, determinaram-se os coeficientes de Wallace respectivos (Quadro 11, Anexo 1). Em relação aos tipos de *clades* da ilha PI-1, o melhor método para prever o tipo de *clade* é o MLST. Em relação aos fragmentos obtidos nas estirpes *rfaA* negativas, apesar do coeficiente de Wallace mais elevado ter sido detectado para o MLST, nenhum dos métodos de tipagem revelou ter um poder significativamente maior que os outros para prever a distribuição dos tipos de fragmentos (intervalos de confiança sobreponíveis).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho caracterizou-se uma colecção de estirpes de pneumococos responsável por infecção invasiva em indivíduos adultos, com 18 a 64 anos de idade. Este grupo etário não é abrangido por nenhuma das vacinas pneumocócicas disponíveis, mas pode beneficiar da vacinação das crianças através do fenómeno de imunidade de grupo.

Em Portugal, a vacina PCV7 foi introduzida para venda pelo sector privado em 2001. A adesão à vacinação foi inicialmente baixa, mas aumentou de uma forma progressiva ao longo do tempo (cerca de 20% em 2001, 40% em 2004 e 70% em 2007) [61]. Um estudo do Instituto de Microbiologia analisou a população pneumocócica causadora de infecção invasiva em Portugal de 1999 a 2005 [4]. A alteração na proporção dos serotipos nas crianças a partir de 2003 e nos adultos a partir de 2004 levou à sugestão de que mesmo a baixa cobertura com a vacina PCV7 tem o potencial de alterar a contribuição dos vários serotipos na infecção pneumocócica invasiva, tanto na população alvo de vacinação, como naquela que não é vacinada.

Nesta tese caracteriza-se a população de pneumococos que afectou os adultos num período em que a cobertura vacinal das crianças foi elevada. Para avaliar qual o efeito da elevada cobertura vacinal das crianças nesta população pneumocócica proceder-se-á à comparação dos resultados deste trabalho, com os relativos ao período pré-vacinal. Visto que só a partir de 2004 se observaram diferenças na proporção de serotipos na população adulta, as estirpes recolhidas entre 1999 e 2003, de infecção invasiva em adultos, serão consideradas neste trabalho como pré-vacinais. A informação sobre estas estirpes encontra-se publicada [59, 60] ou disponível na base de dados do laboratório. No total serão consideradas 343 estirpes relativas a este período.

Tendo em conta que os resultados deste trabalho correspondem também ao período imediatamente anterior à introdução da vacina PCV13 em crianças, pretende-se ainda prever qual será o impacto desta vacina na população pneumocócica causadora de infecção invasiva nos adultos portugueses.

5.1 População em estudo

Cerca de 2/3 das estirpes incluídas neste trabalho foram isoladas a partir de indivíduos de sexo masculino e a faixa etária em que se isolou o maior número de estirpes foi a dos indivíduos com 40 a 49 anos de idade. Estes resultados assemelham-se aos de um estudo realizado na Califórnia (EUA), que reportou uma maior frequência de infecção pneumocócica nos indivíduos de sexo masculino e nos indivíduos com 30 a 50 anos de idade, numa população onde as taxas de infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) são elevadas [46]. Uma predominância da infecção pneumocócica invasiva em indivíduos adultos de sexo masculino foi também reportada num outro estudo, realizado em Barcelona (Espanha), em que a população estudada apresentava uma taxa considerável de diabetes e infecção por HIV [7]. Um sistema imunitário debilitado é um factor de risco para a infecção pneumocócica. Este trabalho não teve como objectivo avaliar as taxas de comorbilidade da população estudada e por esse motivo não é possível associar uma maior frequência da infecção invasiva em adultos de sexo masculino com 40 a 49 anos de idade com a existência de factores de risco. Contudo, a semelhança existente entre este estudo e os atrás

referidos sugere que os indivíduos adultos portugueses mais afectados pela infecção pneumocócica são aqueles que apresentam co-morbilidades.

5.2 Serotipagem

Os serotipos 1, 3, 7F, 14 e 19A foram os mais frequentes na colecção de pneumococos estudada tendo provocado, no seu conjunto, cerca de 51% das infecções. Ao comparar os dados deste trabalho com os relativos ao período pré-vacinal, verificou-se que os serotipos 1, 3 e 14 já se encontravam, antes da introdução da vacina, entre os cinco mais frequentes [60]. O serotipo 14 faz parte da vacina PCV7, pelo que seria de esperar que a imunidade de grupo estabelecida com a imunização das crianças diminuísse a sua proporção como causador de infecção invasiva em adultos. O facto deste serotipo continuar a ser bastante frequente na colonização de crianças não vacinadas [53] poderá justificar a elevada frequência deste serotipo em infecção invasiva em adultos. Uma outra explicação, não exclusiva, seria a transmissão deste serotipo entre adultos, mas visto que não existem estudos de colonização em Portugal para este grupo etário, não se pode, neste trabalho, avaliar esta hipótese. Para além disso, mesmo que este serotipo não fosse um frequente colonizador da nasofaringe, o facto de apresentar uma elevada capacidade invasiva [55] pode por si só justificar a sua elevada prevalência. Isto é realçado, se tivermos em conta que o serotipo 1, que é o serotipo mais frequente em infecção invasiva no adulto em Portugal, é raramente encontrado em colonização [55].

Os serotipos da vacina PCV7 eram, na altura da sua introdução, os mais frequentes a provocar infecção invasiva em crianças dos EUA, e foram por esse motivo, muitas vezes, denominados de serotipos pediátricos. Em Portugal, atendendo ao período considerado como pré-vacinal, os serotipos da vacina PCV7 correspondiam apenas a 30,9% dos serotipos detectados em infecção invasiva em adultos [4]. Contudo, o facto deste valor ser ainda menor nos anos de 2008 e 2009 (18,2%), sugere que os adultos beneficiaram da imunização das crianças, o que corrobora os resultados que já haviam sido reportados sobre a evolução da população pneumocócica em adultos, relativamente aos anos imediatamente posteriores à introdução da vacina [4].

Para averiguar a alteração na proporção de serotipos entre os períodos pré-vacinal e o analisado neste estudo determinaram-se os valores de *odds ratio* respectivos. Os resultados obtidos revelaram que entre estes dois períodos terá ocorrido uma diminuição significativa da proporção de infecções provocadas pelos serotipo 4 ($FDR < 0,05$) e um aumento, que é apenas significativo se não considerarmos a correcção para testes múltiplos, da proporção de infecções provocadas pelos serotipos 1, 7F e 19A ($p < 0,05$ e $FDR > 0,05$). Os serotipos 1, 7F e 19A já se encontram englobados na vacina PCV13. Neste estudo verificou-se que mais de 65% das estirpes isoladas de infecção invasiva em adultos em 2008 e 2009 estariam cobertos por esta vacina. Este valor é inferior ao detectado para a população pediátrica portuguesa (83%) [1], mas similar ao de outros estudos realizados em adultos [45]. Trata-se de um valor consideravelmente superior ao obtido com a vacina PCV7 no momento da sua introdução. Tendo em conta os resultados deste trabalho e verificando-se a existência de imunidade de grupo com a administração da vacina PCV13 em crianças, prevê-se que esta vacina venha a afectar significativamente a população pneumocócica causadora de infecção invasiva nos indivíduos adultos portugueses.

A utilização da vacina PCV13 em adultos de idade igual ou superior a 50 anos está a ser equacionada. Tendo em conta que os adultos beneficiam de forma indirecta da vacinação das crianças, poderíamos pensar que a introdução desta vacina também para adultos não seria a opção mais razoável. Contudo, alguns cenários apontam para a necessidade desta medida: 1) podem existir diferentes clones de pneumococos a colonizar crianças e adultos; 2) a colonização dos indivíduos não vacinados pode manter em circulação os serotipos vacinais, que têm assim a oportunidade de continuar a provocar infecção invasiva na população não vacinada; 3) alguns dos serotipos englobados na nova vacina (ex. serotipo 1) apresentam um comportamento sobretudo invasivo, encontrando-se raramente em colonização, pelo que, nestes casos, a imunidade de grupo revela-se insuficiente para proteger a população não vacinada. Tendo em consideração estes cenários, e que neste trabalho se detectou que os serotipos da vacina PCV13 são muito frequentes como causadores de infecção invasiva nos adultos de idade igual ou superior a 50 anos (68,2%), conclui-se que o licenciamento desta vacina também para adultos desta idade constituirá um passo importante na manutenção da sua saúde. Contudo, os serotipos da vacina PCV13 revelaram-se também como uma importante causa de infecção invasiva nos indivíduos com 18 a 49 anos de idade (65,5%). Para além disso, foi nos indivíduos com 40 a 49 anos de idade que se isolou o maior número de estirpes. Estes resultados sugerem que também os adultos de idade inferior a 50 anos poderão ser fortemente beneficiados se forem alvo da vacinação directa com a vacina PCV13.

A distribuição dos serotipos de pneumococos varia de acordo com a região geográfica considerada, pelo que a epidemiologia da infecção pneumocócica deve ser globalmente adoptada. Contudo, neste trabalho, verificou-se que os cinco serotipos mais frequentes na colecção de pneumococos estudada são também os cinco mais frequentes nos adultos espanhóis da Catalunha [45], o que poderá estar relacionado não só com a faixa etária considerada, mas também com a proximidade geográfica entre estes dois países e com semelhanças nas práticas de consumo de antibióticos e utilização da vacina PCV7.

5.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos

As taxas de resistência por parte da população de pneumococos estudada neste trabalho revelaram-se elevadas. Comparando o período estudado com o pré-vacinal verifica-se que ocorreu um aumento significativo, para cerca do dobro, da taxa de não susceptibilidade à eritromicina (de 7% para 14,6%, $p=0,0008$), tetraciclina (de 6,4% para 12,9%, $p=0,0035$) e clindamicina (de 5,8% para 10,6%, $p=0,0191$). Quanto aos antibióticos penicilina e sulfametoxazol-trimetoprim verifica-se que as taxas de não susceptibilidade permanecem elevadas e relativamente constantes (de 19% para 16,7%, $p=0,4474$, e de 19,8% para 18,2%, $p=0,7826$, respectivamente).

A não susceptibilidade aos antimicrobianos tem estado associada a um número restrito de serotipos de pneumococos (www.ecdc.europa.eu). Com a introdução da vacina PCV7 esperava-se reduzir as taxas de resistência aos antibióticos, uma vez que os serotipos englobados nesta vacina eram também os mais resistentes. Apesar dos serotipos da vacina PCV7 terem sido pouco frequentes na população pneumocócica que afectou os adultos em 2008 e 2009, 60,6% e 43,5% da não susceptibilidade à penicilina e eritromicina, respectivamente, foi provocada por estirpes

cujos serotipos estão incluídos nesta vacina, o que aponta para a importância destes serotipos na resistência aos antibióticos e para a importância da vacina PCV7 na redução das infecções provocadas por estirpes resistentes.

O aumento da proporção de estirpes de serotipo 19A, um serotipo associado à não susceptibilidade a vários antibióticos e que não faz parte da vacina PCV7, contribuiu significativamente para os valores de resistência detectados em 2008-2009. A vacina PCV13, ao incluir o serotipo 19A, poderá ter um forte impacto na redução da resistência aos antibióticos por parte dos pneumococos causadores de infecção invasiva em adultos, no caso do fenómeno de imunidade de grupo se verificar. Esta vacina cobre os serotipos que foram detectados em 80,3% e 77,4% das estirpes resistentes à penicilina e eritromicina, respectivamente. Contudo, neste trabalho, detectaram-se entre as estirpes não susceptíveis, 16 serotipos que não estão incluídos na vacina 13-valente. O aumento da incidência de algum destes serotipos após a introdução da vacina PCV13 poderá comprometer a sua eficácia na redução da resistência aos antibióticos, tal como aconteceu com a vacina PCV7. A monitorização futura das taxas de resistência aos antibióticos e da prevalência dos serotipos de pneumococos será fulcral para avaliar este ponto. A vacina PCV10, por sua vez, visto que não engloba o serotipo 19A, não se revela muito superior à vacina PCV7 na redução das resistências.

O aumento das taxas de não susceptibilidade aos antibióticos entre o período pré-vacinal e o avaliado neste trabalho, poderá ter-se devido não só ao aumento da proporção de certos serotipos associados a resistência, como também ao aumento da proporção de estirpes resistentes dentro de algum serotipo em particular. Para averiguar esta hipótese calcularam-se os valores de *odds ratio* relativos à proporção interna de resistência de cada serotipo, entre estes dois períodos. Com esta análise foi possível detectar que o aumento da não susceptibilidade à eritromicina não se deveu apenas a um aumento da proporção de serotipos não susceptíveis, mas também a um aumento da proporção de estirpes não susceptíveis dentro do serotipo 14 (FDR<0,05).

As taxas de resistência aos antibióticos por parte dos pneumococos e de outros microrganismos variam de acordo com a localização geográfica considerada. As diferenças encontradas entre os vários países parecem estar relacionadas sobretudo com diferenças no consumo de antibióticos. Em pneumococos, já foi proposto que as elevadas taxas de resistência à penicilina e à eritromicina se devem ao elevado consumo de β -lactâmicos e macrólidos [26].

A não susceptibilidade à penicilina encontra-se disseminada por toda a Europa. As taxas de não susceptibilidade detectadas neste trabalho posicionam Portugal entre os países onde estas são mais elevadas (www.ecdc.europa.eu). Portugal está também entre os países da Europa que mais consome antibióticos (www.eurosurveillance.org), incluindo a penicilina, pelo que os valores de não susceptibilidade alcançados para este antibiótico, neste trabalho, poderão dever-se ao elevado consumo deste agente.

O aumento para o dobro, desde o período pré-vacinal até ao analisado neste trabalho, da taxa de não susceptibilidade à eritromicina poderá dever-se ao consumo cada vez mais acentuado de macrólidos em Portugal. Mas quanto ao aumento, para cerca do dobro, da não susceptibilidade à clindamicina e tetraciclina, não se pode estabelecer uma relação com o elevado consumo de antibióticos, visto que nenhum destes é comumente utilizado em Portugal [26]. O aumento da

não susceptibilidade à tetraciclina e clindamicina verificado neste trabalho, poderá estar relacionado com o aumento da resistência à eritromicina. No caso da tetraciclina, o aumento da não susceptibilidade poderá dever-se ao facto de os genes que conferem resistência à tetraciclina e eritromicina se encontrarem no mesmo transposição [35, 43]. No caso da clindamicina, o aumento da não susceptibilidade deve estar relacionada com o facto de algumas estirpes desta colecção transportarem um gene que é responsável por conferir resistência a estes dois antibióticos em simultâneo (fenótipo MLS_B). No entanto, para concluir sobre estas hipóteses seria necessário confirmar a presença destes genes nas estirpes em causa.

O fenotipo MLS_B é o mais prevalente na maioria dos países do Sul da Europa e os resultados deste trabalho estão de acordo com esta afirmação [52]. Contudo, avaliando a evolução da prevalência dos fenotipos de resistência aos macrólidos entre os períodos 1999-2003 e 2008-2009 verifica-se que as estirpes com fenotipo MLS_B aumentaram para cerca do dobro (de 5,8% para 10,6%, $p=0,0191$), enquanto as estirpes de fenotipo M aumentaram para mais do triplo (de 1,16% para 4%, $p=0,0238$). O aumento para o triplo das estirpes de fenotipo M deve-se ao aumento da proporção, dentro do serotipo 14, das estirpes que apresentam este fenotipo ($p=0,0037$). Relativamente ao aumento para o dobro das estirpes de fenotipo MLS_B, não se detectou nenhuma alteração significativa na proporção interna de algum serotipo em particular, pelo que neste caso, o aumento observado se deve à alteração na frequência dos vários serotipos envolvidos com o fenotipo MLS_B.

5.4 Caracterização genética das estirpes por PFGE e MLST

Através das técnicas de PFGE e MLST foi possível avaliar a diversidade genética existente dentro de cada serotipo de pneumococo e identificar os principais clones responsáveis por infecção invasiva em indivíduos adultos em 2008 e 2009.

Tendo em conta que ocorreu uma alteração na proporção de serotipos após a utilização da vacina PCV7, seria interessante averiguar se esta alteração fenotípica da população pneumocócica foi também acompanhada de uma alteração genotípica. Através da análise de dendrogramas construídos com base nos perfis de macrorestrição, obtidos por PFGE, das estirpes relativas aos períodos 1999-2003 e 2008-2009 não foi possível identificar clones (constituídos por cinco ou mais estirpes) que fossem formados exclusivamente por estirpes de apenas um dos períodos. Desta forma, conclui-se que o aumento na proporção de serotipos não-PCV7 entre os períodos pré e pós-vacinal terá envolvido a expansão de linhagens genéticas pré-existentes.

Ao analisar a distribuição dos perfis alélicos e complexos clonais entre os períodos 1999-2003 e 2008-2009 não se pôde, através da determinação dos valores de *odds ratio*, identificar nenhuma associação estatisticamente significativa (após correcção para testes múltiplos) entre perfis alélicos e complexos clonais com algum destes períodos, o que sugere uma semelhança genética entre as duas populações analisadas.

A aplicação da técnica de MLST e a análise goeBURST permitiu verificar que cerca de metade das estirpes analisadas por MLST pertenciam aos complexos CC306, CC156, CC191, CC62, CC180 e CC230. Com estes resultados ressalta-se, novamente, a elevada homologia existente entre a população pneumocócica que afecta os adultos portugueses e os adultos espanhóis da

Catalunha [45]. Exceptua-se o complexo clonal CC62, que surgiu apenas entre os mais frequentes deste estudo, e os complexos clonais CC304 e CC1223, que surgiram apenas entre os mais frequentes do estudo espanhol. Contudo, no estudo espanhol não se apresentou a distribuição dos complexos clonais de acordo com a faixa etária, e neste estudo não se determinaram os perfis alélicos para todas as estirpes, pelo que a concordância dos resultados pode ser diferente. Ainda assim, a população pneumocócica que tem afectado Portugal e Espanha parece ser bastante semelhante. Isto já havia sido referido no estudo de Munoz-Almagro *et al.*, em que detectaram uma elevada semelhança na distribuição dos serotipos em infecção invasiva nas crianças dos dois países.

Entre a Europa e os EUA existem algumas diferenças quanto à população de pneumococos. Os resultados de MLST deste trabalho permitiram confirmar a existência dessas diferenças, sendo que uma das mais relevantes se prende com o serotipo 1, o mais frequentemente isolado de infecção invasiva em adultos, em 2008 e 2009. Enquanto neste trabalho a maioria das estirpes de serotipo 1 são de ST306, nos EUA a maioria são de ST227 [11]. Contudo, algumas semelhanças também se verificam, sendo que as linhagens genéticas respeitantes aos serotipos 3 (ST180), 7F (ST191) e 8 (ST53), revelaram ser comuns a estas duas regiões geográficas.

Com a aplicação da técnica de MLST foi ainda possível verificar que muitas das estirpes causadoras de infecção invasiva em indivíduos adultos em 2008 e 2009 possuíam perfis alélicos correspondentes aos de clones da colecção PMEN (England¹⁴-9, Netherlands⁸-53, Sweden^{15A}-63, Spain^{9V}-156, Netherlands³-180, Netherlands^{7F}-191, Greece²¹-193, Netherlands^{15B}-199, Sweden⁴-205, Denmark^{12F}-218, Denmark¹⁴-230, Columbia⁵-289, Sweden¹-306, Columbia^{23F}-338) que são clones disseminados internacionalmente e cuja importância na infecção invasiva já foi estabelecida [38]. Em contraste, certas estirpes apresentaram STs que ainda só foram reportados por Portugal (ST6180, ST6177, ST4578, ST4575, ST6174, ST6178 e ST1221 e perfis alélicos novos ainda por determinar). Isto aponta para a importância da epidemiologia local no estabelecimento de um cenário global das linhagens genéticas de pneumococos que existem em todo o mundo.

Os complexos clonais que contabilizaram a maioria das infecções nas estirpes analisadas por MLST corresponderam sobretudo a serotipos que já estão englobados na vacina PCV13. Contudo o CC62, que foi dos mais frequentes, surgiu em estirpes de serotipo 11A e 8 (ST53), que correspondem a serotipos que não estão englobados em nenhuma vacina conjugada. Visto que estes foram dos serotipos não-PCV13 que surgiram com mais frequência na colecção de estirpes estudada e que a linhagem genética ST53 parece ter uma elevada capacidade invasiva [55], será necessário continuar a vigilância epidemiológica de modo a verificar se estes serão os serotipos mais frequentes em infecção invasiva nos adultos após a introdução da vacina PCV13. Para além disso, o CC230, que esteve também entre os complexos clonais mais frequentes, surgiu, não só em estirpes de serotipo 19A, que faz parte da vacina PCV13, como em estirpes de serotipo 24F, que não faz parte da vacina e que está também associado a resistência, pelo que a monitorização da sua evolução será também importante.

5.5 Distribuição das ilhas de patogenicidade PI-1 e PI-2

A utilização de pilus na construção de uma vacina pneumocócica tem sido proposta por alguns investigadores [9]. Contudo, estas estruturas não se encontram distribuídas universalmente entre os pneumococos. Neste trabalho foi possível verificar que apenas 13,3% das estirpes apresentavam a ilha de patogenicidade PI-1 e que apenas 28% das estirpes apresentavam a ilha de patogenicidade PI-2. Mesmo quando se tem em conta a soma dos valores obtidos (40,5%), a proporção de estirpes que apresentam qualquer uma destas estruturas continua a ser pequena, pelo que se conclui que os pili em pneumococos não constituem factores de virulência fundamentais e que a utilização destas estruturas na construção de uma vacina anti-pneumocócica poderá não ser uma opção viável.

Um estudo realizado em Portugal concluiu que a presença da ilha de patogenicidade PI-1 está mais associada com o genotipo do que com o serotipo de pneumococos [5]. Contudo, neste trabalho, os perfis de PFGE não se revelaram superiores aos serotipos a prever a presença/ausência da ilha de patogenicidade PI-1.

A distribuição da ilha PI-2 ainda não foi estudada nas estirpes referentes a infecção invasiva em adultos portugueses no período pré-vacinal, pelo que não é possível averiguar se o valor obtido neste trabalho traduz alguma alteração face ao período pré-vacinal. Contudo, o valor detectado para a ilha PI-1 representa uma diminuição face ao período pré-vacinal [5], o que não está de acordo com um estudo recente realizado nos EUA que reportou um aumento na frequência destas estruturas [51]. Visto que nas estirpes responsáveis por infecção invasiva em adultos a presença da ilha é detectada sobretudo em estirpes cujos serotipos fazem parte da vacina PCV7, e tendo em conta que nenhum serotipo alterou a sua proporção interna relativamente à presença desta estrutura genética ($FDR < 0,05$), conclui-se que a diminuição na proporção dos serotipos da vacina-PCV7 é a razão para a diminuição desta ilha entre os períodos pré e pós-vacinal.

5.6 Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações: 1) A informação disponível relativamente ao estado de saúde do doente poderia ser mais pormenorizada de modo a detectar, dentro da população adulta portuguesa, a existência de factores de risco; 2) A alteração na proporção dos serotipos observada neste trabalho parece ser consequência da imunidade de grupo que se estabeleceu com a vacinação das crianças. Contudo, não se pode, neste estudo, concluir que se trata realmente de um efeito da vacinação das crianças, visto que esta não foi universal e que podem ocorrer alterações na população pneumocócica de forma independente da vacinação, tais como alterações naturais em serotipos específicos ou alterações impostas pela utilização de antibióticos [21]; 3) Neste trabalho seria benéfico ter-se determinado a presença dos genes associados com a resistência aos antibióticos, de modo a concluir sobre os motivos subjacentes ao aumento das taxas de não susceptibilidade detectados para a clindamicina e tetraciclina; 4) Apesar de nenhum perfil alélico estar mais associado com algum dos períodos comparados neste trabalho, não se pode concluir que estes dois períodos sejam semelhantes quanto aos seus perfis de MLST, visto que apenas uma parte das estirpes foi analisada por esta técnica de tipagem (28,9% em 1999-2003 e 52,7% em 2008-2009); 5) Apesar da base de dados de MLST, disponível na internet, ser

fundamental para realizar uma comparação das linhagens genéticas de pneumococos a nível mundial, muitos países não têm por hábito reportar os seus dados a não ser que estejam perante um perfil alélico novo, o que empobrece a análise.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho caracterizou-se feno e genotipicamente uma colecção de estirpes de pneumococos responsável por infecção invasiva em indivíduos adultos, nos anos de 2008 e 2009, em Portugal, e efectuou-se uma comparação dos resultados obtidos com os relativos ao período pré-vacinal (1999-2003), de modo a inferir sobre o possível impacto que a elevada cobertura vacinal das crianças com a vacina PCV7 poderá ter tido na população pneumocócica causadora de infecção invasiva nos adultos portugueses.

Os resultados da serotipagem permitiram identificar os serotipos 1, 3, 7F, 14 e 19A como os mais frequentes em infecção invasiva no adulto em 2008 e 2009. Entre o período pré-vacinal e o analisado neste trabalho verificou-se uma diminuição significativa da proporção de infecções provocadas por estirpes de serotipo 4, ao mesmo tempo que ocorreu um aumento (apenas significativo se não considerarmos a correcção para testes múltiplos) da proporção de infecções provocadas por estirpes de serotipos 1, 7F e 19A. A diminuição dos serotipos-PCV7 de 30,9% para 18,2% entre o período pré-vacinal e o analisado neste trabalho sugere que a vacinação das crianças beneficiou também a população adulta portuguesa. A elevada frequência dos serotipos da vacina PCV13 na população de pneumococos estudada (>65%) indica que a introdução desta vacina em Portugal será benéfica também para adultos.

Relativamente às taxas de não susceptibilidade aos antimicrobianos, os valores mais elevados foram alcançados para a penicilina, eritromicina e sulfametoxazol-trimetoprim, em que 16,7%, 14,6% e 18,2% das estirpes, respectivamente, mostraram ser não susceptíveis. O valor de não susceptibilidade detectado para a eritromicina representou um aumento para cerca do dobro, relativamente ao período pré-vacinal.

Os complexos clonais CC306, CC156, CC191, CC62, CC180 e CC230 foram os mais frequentes na população pneumocócica estudada. Tendo em conta que as estirpes de pneumococos analisadas neste trabalho e as referentes ao período pré-vacinal se englobam em linhagens de PFGE comuns e que não existe nenhum ST que esteja mais associado com alguns destes períodos, sugere-se que o aumento da proporção dos serotipos não vacinais foi acompanhado pela emergência de linhagens genéticas pré-existentes.

As ilhas de patogenicidade 1 e 2 foram encontradas em apenas 13,3% e 28% das estirpes desta colecção, respectivamente, indicando que não devem constituir um factor de virulência essencial em pneumococos e que não são a melhor opção na construção de uma nova vacina anti-pneumocócica.

Os resultados deste trabalho sugerem, portanto, um efeito indirecto da vacinação das crianças com a vacina PCV7 na população pneumocócica que afecta os adultos. Sugerem ainda que a vacina PCV13 terá a oportunidade de reduzir significativamente as infecções invasivas em adultos provocadas pelos serotipos que a compõem, bem como as taxas de resistência aos antibióticos. A monitorização futura da população pneumocócica revela-se de extrema importância para averiguar se os efeitos esperados com a vacina PCV13 irão de facto verificar-se e se serotipos não-vacinais irão emergir após a sua utilização, tal como aconteceu com a vacina PCV7.

7. ANEXOS

7.1 Anexo 1

Quadro 11: Coeficientes de Wallace dos três métodos de tipagem em relação: aos métodos de tipagem, perfis de resistência aos antibióticos e ilhas de patogenicidade.

	Serotipo	PFGE	MLST (ST)	PV	ER	Fenotipo macrólidos	PI-1	Clade PI-1	Fragmentos PI-1	PI-2
Serotipo	–	0,750 (0,677-0,822)	0,639 (0,554-0,724)	0,888 (0,869-0,908)	0,830 (0,759-0,900)	0,818 (0,747-0,889)	0,929 (0,904-0,954)	0,904 (0,878-0,930)	0,704 (0,625-0,783)	0,991 (0,975-1,000)
PFGE	0,693 (0,649-0,737)	–	0,572 (0,510-0,634)	0,913 (0,876-0,949)	0,864 (0,813-0,915)	0,858 (0,804-0,911)	0,948 (0,927-0,970)	0,929 (0,905-0,954)	0,750 (0,670-0,830)	0,980 (0,958-1,000)
MLST (ST)	0,973 (0,958-0,988)	0,941 (0,919-0,963)	–	0,975 (0,960-0,990)	0,940 (0,899-0,982)	0,940 (0,899-0,982)	0,984 (0,969-0,998)	0,969 (0,956-0,982)	0,836 (0,737-0,935)	1,000 (1,000-1,000)

Entre parêntesis encontram-se os intervalos de confiança a 95%. “MLST (ST)” - perfis alélicos; “PV” - perfil de susceptibilidade à penicilina; “ER” - perfil de susceptibilidade à eritromicina; “PI-1” - ilha de patogenicidade PI-1; “Clade PI-1” - tipos de *clades* da ilha de patogenicidade PI-1 (I, II e III); “Fragmentos PI-1” - tipos de fragmentos nas estirpes *rfaA* negativas (A, B e C); “PI-2” - ilha de patogenicidade PI-2. A interpretação dos coeficientes de Wallace deve ser feita comparando os métodos de tipagem, que se encontram na primeira coluna [serotipo, PFGE, MLST (ST)], com as características representadas na primeira linha do quadro. Por exemplo, o coeficiente de Wallace do serotipo em relação ao PFGE é de 0,750, o que indica que duas estirpes com um mesmo serotipo têm 75% de probabilidade de pertencerem ao mesmo clone de PFGE.

7.2 Anexo 2

Quadro 12: Valores de *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança a 95%.

	Penicilina	Eritromicina	MR	M	MLS _B	PI-1	PI-2	
Serotipo	1	0,0 (0,0-0,2)	0,1 (0,0-0,5)	0,1 (0,0-0,5)	n.s.	n.s.	0 (0-0,28)	inf (129,1-inf)
	3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0 (0-0,61)	0 (0-0,2)
	4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	11,46 (3,47-49,98)	n.s.
	6C	13,2 (2,1-141,7)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	N.S.	n.s.
	7F	0,0 (0,0-0,4)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0 (0-0,57)	inf (40,1-inf)
	9V	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	12,89 (3,15-62,30)	0 (0-0,8)
	14	39,6 (14,1-139,0)	9,3 (4,0-22,0)	5,5 (2,4-12,7)	47,7 (14,0-191,5)	n.s.	30,86 (12,21-86,33)	0 (0-0,3)
	15A	Inf (2,09-inf)	Inf (2,5-inf)	inf (2,3-inf)	n.s.	inf (3,6-inf)	n.s.	n.s.
	19A	4,2 (1,8-9,6)	6,9 (3,0-15,9)	13,9 (5,9-34,5)	n.s.	11,2 (4,7-27,1)	n.s.	n.s.
	19F	16,1 (2,8-166,1)	45,4 (5,7-2056,4)	18,0 (3,1-186,1)	n.s.	28,6 (4,9-296,8)	21,72 (3,75-224,98)	n.s.
	23F	26,4 (2,9-1258,8)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	24F	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	26,6 (2,1-1411,0)	n.s.	n.s.
ST	143	n.s.	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	inf (2,5-inf)	n.s.
	156	inf (13,4-inf)	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	30,4 (2,5-308,0)	n.s.
	162	n.s.	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	inf (2,5-inf)	n.s.
	179	n.s.	inf (3,7-inf)	n.d.	n.s.	inf (5,3-inf)	inf (4,2-inf)	n.s.
	191	n.s.	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	n.s.	inf (20,4-inf)
	306	n.s.	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	n.s.	inf (49,6-inf)
	205	n.s.	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	inf (2,5-inf)	n.s.
	416	n.s.	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	inf (2,5-inf)	n.s.

OR > 1 indica uma associação positiva entre o serotipo ou ST com a característica em análise (penicilina, eritromicina, MR, M, MLS_B, PI-1 e PI-2). OR < 1 indica uma associação negativa. Valores entre parêntesis: intervalos de confiança a 95%. Apresentam-se apenas valores para os quais se obteve significância estatística após correção para testes múltiplos (FDR < 0,05). "n.s."- OR não significativo; "n.d."- OR não determinado; "inf"- infinito; "MR"- multi-resistência; "MLS_B"- resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B; "M"- resistência aos macrólidos.

7.3 Anexo 3

Quadro 13: Linhagens de PFGE, perfis alélicos e complexos clonais dos serotipos não representados em dendrogramas.

Serotipo-PFGE (n)	ST (CC)	Serotipo-PFGE (n)	ST (CC)
5-1 (11)	289 (289) ; 1223 (289)	18C-3 (1)	n.d.
6A-1 (4)	65 (460)	18C-4 (1)	n.d.
6A-2 (3)	1876 (473); N	20-1 (4)	235 (235); 1030 (235)
6A-3 (1)	42 (439)	20-2 (2)	1026 (1026)
6A-4 (1)	n.d.	20-3 (1)	1871 (4531)
6B-1 (1)	138 (156)	21-1 (2)	1877 (2478)
6B-2 (1)	n.d.	21-2 (1)	432 (432)
6C-1 (3)	2667 (156)	22F-1 (6)	433 (433)
6C-2 (2)	395 (395)	22F-2 (2)	1372 (113)
6C-3 (2)	3396 (315)	22F-3 (1)	n.d.
7C-1 (2)	1201 (15)	23A-1 (7)	42 (439); 190 (439); 6177 (439); N
9N-1 (11)	66 (66)	23A-2 (1)	1609 (439)
9N-2 (2)	66 (66)	23B-1 (4)	439 (439)
10A-1 (4)	97 (460); 1282 (460)	23F-1 (6)	338 (156); 1095 (156)
10A-2 (2)	3135 (230)	24F-1 (2)	n.d.
11A (11)	408 (62); 62 (62)	24F-2 (1)	230 (230)
12B-1 (10)	218 (218) ; 6180 (218)	24F-3 (1)	n.d.
13-1 (1)	70 (79)	25F-1 (1)	1083 (1083)
15A-1 (3)	63 (63)	28A-1 (1)	494 (546)
15B-1 (3)	199 (177) ; 411 (199)	29-1 (1)	N
15B-2 (1)	3863 (177)	31-1 (2)	1766 (3548)
15C-1 (2)	199 (177) ; 411 (199)	33A-1 (2)	717 (717)
16F-1 (5)	30 (30)	34-1 (1)	2001 (1439)
16F-2 (2)	5902 (5902)	35B-1 (1)	3329 (198)
17A-1 (2)	2599 (2599)	35F-1 (1)	1368 (1260)
17F-1 (1)	123 (113)	35F-2 (1)	4849 (460)
18A-1 (2)	241 (241)	39-1 (1)	1126 (1478)
18C-1 (1)	102 (102)	NT-1 (1)	478 (1884)
18C-2 (1)	199 (177)	NT-2 (1)	n.d.

"n": número de estirpes dentro de cada linhagem de PFGE; "N" - perfil alélico novo para o qual ainda não foi atribuído número; "ST" - perfil alélico; "(CC)" - complexo clonal. "n.d." - não determinado. A negrito encontram-se os perfis alélicos da coleção PMEN [38]: **ST63**: Sweden^{15A}-63; **ST113**: Netherlands^{18C}-113; **ST156**: Spain⁹-156; **ST177**: Portugal^{19F}-177; **ST199**: Netherlands^{15B}-199; **ST289**: Columbia⁵-289; **ST230**: Denmark¹⁴-230; **ST218**: Denmark^{12F}-218.

8. REFERÊNCIAS

1. Aguiar, S.I., M.J. Brito, J. Gonçalo-Marques, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2010. Serotypes 1, 7F and 19A became the leading causes of pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal after 7 years of heptavalent conjugate vaccine use. *Vaccine*, 28(32): pp. 5167-73.
2. Aguiar, S.I., M.J. Frias, L. Santos, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2006. Emergence of optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Portugal. *Microb Drug Resist*, 12(4): pp. 239-45.
3. Aguiar, S.I., F.R. Pinto, S. Nunes, I. Serrano, J. Melo-Cristino, R. Sá-Leão, M. Ramirez, and H. de Lencastre. 2010. Denmark14-230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. *J Clin Microbiol*, 48(1): pp. 101-8.
4. Aguiar, S.I., I. Serrano, F.R. Pinto, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2008. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect*, 14(9): pp. 835-43.
5. Aguiar, S.I., I. Serrano, F.R. Pinto, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2008. The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiol*, 8: pp. 41.
6. Appelbaum, P.C. 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis*, 15(1): pp. 77-83.
7. Ardanuy, C., F. Tubau, R. Pallares, L. Calatayud, M.A. Dominguez, D. Rolo, I. Grau, R. Martin, and J. Linares. 2009. Epidemiology of invasive pneumococcal disease among adult patients in barcelona before and after pediatric 7-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction, 1997-2007. *Clin Infect Dis*, 48(1): pp. 57-64.
8. Austrian, R. 1999. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. *J Infect Dis*, 179 (2): pp. 338-41.
9. Bagnoli, F., M. Moschioni, C. Donati, V. Dimitrovska, I. Ferlenghi, C. Facciotti, A. Muzzi, F. Giusti, C. Emolo, A. Sinisi, *et al.* 2008. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol*, 190(15): pp. 5480-92.
10. Barocchi, M.A., J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, S. Dahlberg, J. Fernebro, M. Moschioni, V. Masignani, *et al.* 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8): pp. 2857-62.
11. Beall, B., M.C. McEllistrem, R.E. Gertz, Jr., S. Wedel, D.J. Boxrud, A.L. Gonzalez, M.J. Medina, R. Pai, T.A. Thompson, L.H. Harrison, *et al.* 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): pp. 999-1017.
12. Benin, A.L., K.L. O'Brien, J.P. Watt, R. Reid, E.R. Zell, S. Katz, C. Donaldson, A. Parkinson, A. Schuchat, M. Santosham, *et al.* 2003. Effectiveness of the 23-valent polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in Navajo adults. *J Infect Dis*, 188(1): pp. 81-9.
13. Benjamini, Y. and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B: Stat Methodol*, pp. 289-300.
14. Black, S., H. Shinefield, R. Baxter, R. Austrian, L. Bracken, J. Hansen, E. Lewis, and B. Fireman. 2004. Postlicensure surveillance for pneumococcal invasive disease after use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Northern California Kaiser Permanente. *Pediatr Infect Dis J*, 23(6): pp. 485-9.
15. Brueggemann, A.B. and B.G. Spratt. 2003. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol*, 41(11): pp. 4966-70.
16. Calix, J.J. and M.H. Nahm. 2010. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated wcjE gene. *J Infect Dis*, 202(1): pp. 29-38.
17. Carriço, J.A., F.R. Pinto, C. Simas, S. Nunes, N.G. Sousa, N. Frazão, H. de Lencastre, and J.S. Almeida. 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 43(11): pp. 5483-90.
18. Carriço, J.A., C. Silva-Costa, J. Melo-Cristino, F.R. Pinto, H. de Lencastre, J.S. Almeida, and M. Ramirez. 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol*, 44(7): pp. 2524-32.
19. Cherian, T. 2007. WHO expert consultation on serotype composition of pneumococcal conjugate vaccines for use in resource-poor developing countries, 26-27 October 2006, Geneva. *Vaccine*, 25(36): pp. 6557-64.
20. Clinical, and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - sixteenth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
21. Dagan, R. 2009. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*, 15 (3): pp. 16-20.
22. De Lencastre, H., K.G. Kristinsson, A. Brito-Avô, I.S. Sanches, R. Sá-Leão, J. Saldanha, E. Sigvaldadottir, S. Karlsson, D. Oliveira, R. Mato, *et al.* 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(1): pp. 19-29.
23. Enright, M.C. and B.G. Spratt. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 7(12): pp. 482-7.

24. Farrell, D.J., I. Morrissey, S. Bakker, and D. Felmingham. 2002. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999-2000 study. *J Antimicrob Chemother*, 50 (1): pp. 39-47.
25. Francisco, A.P., M. Bugalho, M. Ramirez, and J.A. Carriço. 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*, 10: pp. 152.
26. Goossens, H., M. Ferech, R. Vander Stichele, and M. Elseviers. 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 365(9459): pp. 579-87.
27. Hakenbeck, R., K. Kaminski, A. König, M. van der Linden, J. Paik, P. Reichmann, and D. Zahner. 1999. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, 5(2): pp. 91-9.
28. Hansman, D., L. Devitt, H. Miles, and I. Riley. 1974. Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *Med J Aust*, 2(10): pp. 353-6.
29. Hausdorff, W.P., J. Bryant, P.R. Paradiso, and G.R. Siber. 2000. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis*, 30(1): pp. 100-21.
30. Hill, P.C., J. Townend, M. Antonio, B. Akisanya, C. Ebruke, G. Lahai, B.M. Greenwood, and R.A. Adegbola. 2010. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in rural Gambian villages: a longitudinal study. *Clin Infect Dis*, 50(11): pp. 1468-76.
31. Hoskins, J., W.E. Alborn, Jr., J. Arnold, L.C. Blaszcak, S. Burgett, B.S. DeHoff, S.T. Estrem, L. Fritz, D.J. Fu, W. Fuller, et al. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol*, 183(19): pp. 5709-17.
32. Huss, A., P. Scott, A.E. Stuck, C. Trotter, and M. Egger. 2009. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *CMAJ*, 180(1): pp. 48-58.
33. Jacobs, M.R. 2004. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med*, 117(3A): pp. 3S-15S.
34. Klugman, K.P. and J.R. Lonks. 2005. Hidden epidemic of macrolide-resistant pneumococci. *Emerg Infect Dis*, 11(6): pp. 802-7.
35. Leclercq, R. and P. Courvalin. 2002. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(9): pp. 2727-34.
36. Lopalco, P.L. 2006. Use of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in EU. *Euro Surveill*, 11(12): pp. E061207 3.
37. Mackenzie, G.A., A.J. Leach, J.R. Carapetis, J. Fisher, and P.S. Morris. 2010. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. *BMC Infect Dis*, 10: pp. 304.
38. McGee, L., L. McDougal, J. Zhou, B.G. Spratt, F.C. Tenover, R. George, R. Hakenbeck, W. Hryniewicz, J.C. Lefevre, A. Tomasz, et al. 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol*, 39(7): pp. 2565-71.
39. Melo-Cristino, J., M. Ramirez, N. Serrano, and T. Hanscheid. 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(1): pp. 73-80.
40. Melo-Cristino, J., L. Santos, and M. Ramirez. 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): pp. 9-30.
41. Miller, E., N.J. Andrews, P.A. Waight, M.P. Slack, and R.C. George. 2011. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, [Epub ahead of print].
42. Moberley, S.A., J. Holden, D.P. Tatham, and R.M. Andrews. 2008. Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, (1): pp. CD000422.
43. Montanari, M.P., I. Cochetti, M. Mingoia, and P.E. Varaldo. 2003. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(7): pp. 2236-41.
44. Moschioni, M., C. Donati, A. Muzzi, V. Masignani, S. Censini, W.P. Hanage, C.J. Bishop, J.N. Reis, S. Normark, B. Henriques-Normark, et al. 2008. *Streptococcus pneumoniae* contains 3 rlrA pilus variants that are clonally related. *J Infect Dis*, 197(6): pp. 888-96.
45. Munoz-Almagro, C., P. Ciruela, C. Esteva, F. Marco, M. Navarro, R. Bartolome, G. Sauca, C. Galles, M. Morta, F. Ballester, et al. 2011. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect*, 63(2): pp. 151-62.
46. Nuorti, J.P., J.C. Butler, L. Gelling, J.L. Kool, A.L. Reingold, and D.J. Vugia. 2000. Epidemiologic relation between HIV and invasive pneumococcal disease in San Francisco County, California. *Ann Intern Med*, 132(3): pp. 182-90.
47. O'Brien, K.L., L.J. Wolfson, J.P. Watt, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O.S. Levine, and T. Cherian. 2009. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 374(9693): pp. 893-902.

48. Murray, P. R., E.J. Baron., J. H. Tenover, M. A. Tenover, and R. H. Tenover. 2003. Manual of clinical microbiology. 8th ed., Washington, DC: ASM Press.
49. Pinto, F.R., J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2008. A confidence interval for the wallace coefficient of concordance and its application to microbial typing methods. PLoS One, 3(11): pp. e3696.
50. Prommalikit, O., K. Pengsaa, and U. Thisyakorn. 2010. Pneumococcal infections in high-risk and immunocompromised hosts. J Med Assoc Thai, 93(5): pp. 61-70.
51. Regev-Yochay, G., W.P. Hanage, K. Trzcinski, S.L. Rifas-Shiman, G. Lee, A. Bessolo, S.S. Huang, S.I. Pelton, A.J. McAdam, J.A. Finkelstein, et al. 2010. Re-emergence of the type 1 pilus among *Streptococcus pneumoniae* isolates in Massachusetts, USA. Vaccine, 28(30): pp. 4842-6.
52. Reinert, R.R., A. Ringelstein, M. van der Linden, M.Y. Cil, A. Al-Lahham, and F.J. Schmitz. 2005. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. J Clin Microbiol, 43(3): pp. 1294-300.
53. Rodrigues, F., S. Nunes, R. Sá-Leão, G. Goncalves, L. Lemos, and H. de Lencastre. 2009. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care centers in the central region of Portugal, in the era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. Microb Drug Resist, 15(4): pp. 269-77.
54. Sá-Leão, R., S. Nunes, A. Brito-Avô, N. Frazão, A.S. Simoes, M.I. Crisostomo, A.C. Paulo, J. Saldanha, I. Santos-Sanches, and H. de Lencastre. 2009. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. Clin Microbiol Infect, 15(11): pp. 1002-7.
55. Sá-Leão, R., F. Pinto, S. Aguiar, S. Nunes, J.A. Carriço, N. Frazão, N. Goncalves-Sousa, J. Melo-Cristino, H. de Lencastre, and M. Ramirez. 2011. Analysis of invasiveness of pneumococcal serotypes and clones circulating in Portugal before widespread use of conjugate vaccines reveals heterogeneous behavior of clones expressing the same serotype. J Clin Microbiol, 49(4): pp. 1369-75.
56. Salamon, H., M.R. Segal, A. Ponce de Leon, and P.M. Small. 1998. Accommodating error analysis in comparison and clustering of molecular fingerprints. Emerg Infect Dis, 4(2): pp. 159-68.
57. Schuerman, L., D. Borys, B. Hoet, A. Forsgren, and R. Prymula. 2009. Prevention of otitis media: now a reality? Vaccine, 27(42): pp. 5748-54.
58. Schwartz, D.C. and C.R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 37(1): pp. 67-75.
59. Serrano, I., J. Melo-Cristino, J.A. Carriço, and M. Ramirez. 2005. Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal. J Clin Microbiol, 43(4): pp. 1706-15.
60. Serrano, I., M. Ramirez, and J. Melo-Cristino. 2004. Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy. Clin Microbiol Infect, 10(7): pp. 652-6.
61. Simões, A.S., L. Pereira, S. Nunes, A. Brito-Avô, H. de Lencastre, and R. Sá-Leão. 2011. Clonal Evolution Leading to Maintenance of Antibiotic Resistance Rates among Colonizing Pneumococci in the PCV7 Era in Portugal. J Clin Microbiol, 49(8): pp. 2810-7.
62. Sorensen, U.B. 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. J Clin Microbiol, 31(8): pp. 2097-100.
63. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 33(9): pp. 2233-9.
64. Tettelin, H., K.E. Nelson, I.T. Paulsen, J.A. Eisen, T.D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R.T. DeBoy, D.H. Haft, R.J. Dodson, et al. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Science, 293(5529): pp. 498-506.
65. Vesikari, T., J. Wysocki, B. Chevallier, A. Karvonen, H. Czajka, J.P. Arsene, P. Lommel, I. Dieussaert, and L. Schuerman. 2009. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable Haemophilus influenzae protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine. Pediatr Infect Dis J, 28(4): pp. 66-76.
66. Watson, D.A., D.M. Musher, J.W. Jacobson, and J. Verhoef. 1993. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin Infect Dis, 17(5): pp. 913-24.
67. Weinberger, D.M., R. Malley, and M. Lipsitch. 2011. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. Lancet.
68. Yeh, S.H., A. Gurtman, D.C. Hurlley, S.L. Block, R.H. Schwartz, S. Patterson, K.U. Jansen, J. Love, W.C. Gruber, E.A. Emini, et al. 2010. Immunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in infants and toddlers. Pediatrics, 126(3): pp. e493-505.
69. Yocum, R.R., D.J. Waxman, J.R. Rasmussen, and J.L. Strominger. 1979. Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. Proc Natl Acad Sci U S A, 76(6): pp. 2730-4.
70. Zahner, D., A. Gudlavalleti, and D.S. Stephens. 2010. Increase in pilus islet 2-encoded pili among *Streptococcus pneumoniae* isolates, Atlanta, Georgia, USA. Emerg Infect Dis, 16(6): pp. 955-62.