



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**CAMPUS UFRJ DUQUE DE CAXIAS**

**PROFESSOR GERALDO CIDADE**



**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOTECNOLOGIA**

**DAVID RIBEIRO AQUINO**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE AMOSTRAS  
DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLADAS DE INFECÇÕES  
DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19**

Duque de Caxias

2023

DAVID RIBEIRO AQUINO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE AMOSTRAS  
DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLADAS DE INFECÇÕES  
DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus UFRJ - Duque de Caxias, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia. Trabalho experimental realizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lucia Martins Teixeira

Coorientadora: Dr<sup>ª</sup> Ana Caroline Nunes Botelho

Duque de Caxias

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

R484c Ribeiro Aquino, David  
Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Streptococcus pneumoniae* isoladas de infecções durante a pandemia de COVID-19 / David Ribeiro Aquino. -- Rio de Janeiro, 2023.  
67 f.

Orientadora: Lucia Martins Teixeira.

Coorientadora: Ana Caroline Nunes Botelho.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Microbiologia médica. 2. *Streptococcus pneumoniae*. 3. Resistência aos antimicrobianos. 4. Virulência. 5. Sorotipos. I. Martins Teixeira, Lucia, orient. II. Nunes Botelho, Ana Caroline, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

DAVID RIBEIRO AQUINO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLADAS DE INFECÇÕES DURANTE A  
PANDEMIA DA COVID-19**

Data de Aprovação:

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Lucia Martins Teixeira, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ

---

Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha, Campus Duque de Caxias, UFRJ

---

Dra. Natália Silva Costa Granato, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ

---

Dra. Andréa de Andrade Rangel de Freitas, (Suplente, Revisora), Instituto de Microbiologia  
Paulos de Góes, UFRJ

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Eliane Faustino Ribeiro Aquino e Armando de Andrade Aquino, que foram os meus maiores incentivadores e inspirações durante a formação da minha educação e de quem eu sou como ser humano atualmente. Meu amado pai que, infelizmente, não acompanhará esta etapa de formação, pois faleceu em 2017, no entanto, sempre estará presente em minha memória. Minha mãe, mulher guerreira e dona de um coração gigante, sem ela eu não conseguiria e nem teria motivação para chegar até aqui. Amo-os incondicionalmente e sou extremamente grato por todo o esforço que vocês fizeram para que eu obtivesse sucesso, seja na área profissional ou pessoal.

Agradeço também a minha querida irmã, Nataly Ribeiro Aquino, por todo o apoio durante esses anos da graduação. Ela, que também me inspira, sendo uma mulher guerreira e que corre atrás dos seus objetivos, independente das circunstâncias, me fez acreditar em mim mesmo. Você é um exemplo de mãe. Te amo muito!

Aos meus sobrinhos, Christian e Catarina, por aflorarem em mim o sentimento e cuidado de paternidade. Todo o esforço realizado para o meu amadurecimento profissional também é por vocês.

Aos meus familiares em geral, principalmente a minha avó Maria José Faustino Ribeiro, que sempre me apoiaram com palavras de incentivo. Vocês foram essenciais nesta caminhada e espero ter dado uma pequena parcela de orgulho a todos. Muito obrigado!

Aos meus amigos que fiz durante o período de graduação, Ana Carolina Pires, Crislaine Santos, Gabriel Almeida, Ingrid Del Castilo, Ivanielle Mendonça, Larissa Suzana, Marcos Vinícius Hir, Nathália Bighi, Pedro Bernardo, Ricardo Maquieiro, Roberto Almeida, Tathiana Proença, Thaís Vieira e Vitor Damasceno, definitivamente vocês se tornaram meus irmãos e não me vejo vivendo em um mundo o qual vocês não estejam presentes. Obrigado por tanto apoio, amor e por se tornarem meus exemplos de resiliência, paciência e humanidade. Amo vocês!

Aos amigos que fiz em outros ambientes, Ana Vitória Assis, Andressa Guimarães, Isabela Ferreira, Joana Dantas, João Gabriel, Juan Neres e Roberta Pinheiro. Vocês marcaram a minha história!

Ao meu namorado, Lucas Antony, que me motivou nos meus dias sombrios, esteve do meu lado e me deu força para escrever este documento quando eu estava desacreditado do meu potencial. Te amo muito! Você é um exemplo de profissional e talento.

Às minhas queridas orientadoras, professora Dr<sup>a</sup>. Lucia Martins Teixeira e Dr<sup>a</sup>. Ana Caroline Botelho, especialmente pela oportunidade de ingresso ao grupo, por todas as palavras de incentivo e apoio, pela paciência de me ensinarem as técnicas e teorias necessárias, de corrigirem as minhas apresentações e relatórios com todo carinho. Vocês são muito especiais!

A toda a equipe do Laboratório de Apoio Biotecnológico, o famoso 27. Foi lá que eu aprendi a ser respeitado como estudante de iniciação científica, onde ganhei liberdade para realizar os meus experimentos, independente se os resultados dariam como o esperado ou não, onde conheci pessoas maravilhosas que me ensinaram tudo o que sei hoje sobre o microrganismo que eu estudei e onde tive conversas enriquecedoras sobre a vida. Obrigado professora Lucia, Carol, Amanda, Jaqueline, Andrea, Clara, Vitor, Adriana, Maicon, Aline e Diego.

Às minhas cantoras preferidas, Taylor Swift e Lady Gaga por confortarem o meu coração através de suas músicas.

À banca examinadora pela honra de terem aceitado o meu convite para participarem da defesa deste trabalho.

Aos docentes que tive o prazer de conviver e aprender durante a minha graduação. Sou um ser humano muito mais maduro após receber todo o conhecimento transmitido por vocês. Muito obrigado!

Aos funcionários da UFRJ, que sem eles as coisas não funcionariam com tanta maestria e organização.

E por fim, mas não menos importante, às instituições de fomento (PIBIC-UFRJ, FAPERJ, CNPq e CAPES) que possibilitaram, através da disponibilidade de recursos, a realização deste e outros trabalhos. Vocês são fundamentais para o desenvolvimento da ciência no Brasil!

## RESUMO

*Streptococcus pneumoniae*, comumente referido como pneumococo, é considerado um importante agente causador de infecções graves, tais como pneumonia, bacteremia e meningite, principalmente em crianças de até cinco anos, idosos e indivíduos imunocomprometidos. A cápsula é o principal fator de virulência deste microrganismo e a base para as vacinas atualmente disponíveis. Após a implementação do uso de vacinas, mudanças na distribuição de tipos capsulares de *S. pneumoniae* foram percebidas, assim como nos percentuais de resistência aos antimicrobianos, incluindo à penicilina, demandando monitoramento contínuo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente amostras de *S. pneumoniae* isoladas durante a pandemia de COVID-19 e obter dados sobre a distribuição de tipos capsulares e os perfis de resistência aos antimicrobianos e virulência de amostras associadas às doenças pneumocócicas graves, ocorridas nesse período. Foram estudadas 60 amostras de pneumococos, isoladas de diferentes espécimes clínicos, majoritariamente sangue (83%), obtidos de pacientes hospitalizados com quadros de infecções pneumocócicas em diferentes unidades de saúde do Rio de Janeiro. Tais amostras foram submetidas aos testes fenotípicos convencionais para confirmação da identificação. A metodologia de MALDI-TOF MS também foi realizada, assim como a amplificação do gene *lytA* (específico da espécie). Todas as amostras foram confirmadas como pertencentes à espécie *S. pneumoniae*, seja pelos resultados típicos nos testes fenotípicos, seja pela obtenção de escores de confiabilidade no MALDI-TOF MS, além da amplificação do gene *lytA*. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados por meio da técnica de disco-difusão, seguindo as recomendações do CLSI. Foram observados os seguintes percentuais de resistência a antimicrobianos: clindamicina (28,3%; 17), cloranfenicol (1,6%; 1), eritromicina (33,3%; 20), penicilina (31,7%; 19), sulfametoxazol-trimetoprim (41,6%; 25) e tetraciclina (41,6%; 25). Todas as amostras foram suscetíveis à levofloxacina, à rifampicina e à vancomicina. Foi observado que 20 (33,3%) amostras possuíam perfis de multirresistência. As concentrações mínimas inibitórias (CMI), de penicilina foram determinadas para as amostras que se apresentaram não suscetíveis à penicilina, e variaram de 0,047µg/mL à 32µg/mL. Nas amostras que apresentaram o fenótipo de resistência aos macrolídeos (eritromicina) e lincosamidas (clindamicina), foi pesquisada a presença dos genes *ermA*, *ermB* e *mefA* por meio de PCR *uniplex*. O gene *ermB* foi o predominante (28,35%; 17 das 60 amostras), seguido do gene *mefA* (18,3%; 11 das 60 amostras), e o gene *ermA* não foi detectado. O gene *ermB* foi detectado em 17 (85%) dessas

amostras que apresentaram fenótipo de resistência aos macrolídeos e lincosamidas, compreendendo 9 (45%) amostras que albergavam somente o gene *ermB* e 8 (40%) que também albergavam *mefA*. O gene *mefA* foi observado em 11 (18,3%) amostras, incluindo 3 (27,3%) que carregavam somente *mefA* e as 8 (72,7%) que também possuíam o gene *ermB*. Genes codificadores de pili dos tipos I e II foram investigados por PCR *uniplex*, sendo identificada a presença das seguintes estruturas associadas à virulência: pilus do tipo I (21,6%; 13) e pilus do tipo II (20%; 12). Os tipos capsulares foram determinados por testes de PCR multiplex, e os mais frequentes foram: 19A (20%; 12), 3 (10%; 6), 6 (5%; 3), 12 (5%; 3) e 7F/7A (5%; 3). Dessa forma, percebeu-se que os sorotipos mais frequentemente encontrados não pertencem à formulação da vacina que é amplamente disponibilizada no sistema de saúde público brasileiro, além disso, o sorotipo 19A é comumente associado aos casos de infecções pneumocócicas invasivas e à multirresistência. Sendo assim, o presente estudo contribui com dados atuais sobre a resistência aos antimicrobianos e os perfis de multirresistência dos pneumococos circulantes em nossa região, assim como da presença de fatores de virulência (pili) que facilitam a colonização no hospedeiro e que podem se tornar alvos vacinais no futuro e, sobretudo, da distribuição dos tipos capsulares que foram responsáveis pelos casos de infecções pneumocócicas ocorridos no período de investigação. Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo relatando as características de amostras de pneumococos circulando durante o período da pandemia de COVID-19 no Rio de Janeiro.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*, doença pneumocócica invasiva, tipos capsulares, resistência a antimicrobianos, genes de virulência, pili, , COVID-19.



## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae*, commonly referred to as pneumococcus, is considered an important causative agent of serious infections, such as pneumonia, bacteremia and meningitis, especially in children up to five years old, the elderly and immunocompromised individuals. The capsule is the main virulence factor of this microorganism and the basis for currently available vaccines. After implementing the use of vaccines, changes in the distribution of capsular types of *S. pneumoniae* were noticed, as well as in the percentages of antimicrobial resistance, including penicillin, demanding continuous monitoring. The objective of this work was to characterize phenotypically and genotypically samples of *S. pneumoniae* isolated during the COVID-19 pandemic and to obtain data on the distribution of capsular types and profiles of resistance to antimicrobials and virulence of samples associated with severe pneumococcal diseases that occurred in that period. Sixty pneumococcal samples were studied, isolated from different clinical specimens, mostly blood (83%), obtained from patients hospitalized with pneumococcal infections in different health units in Rio de Janeiro. Such samples were submitted to conventional phenotypic tests to confirm the identification. The MALDI-TOF MS methodology was also performed, as well as the amplification of the *lytA* gene (species specific). All samples were confirmed as belonging to the *S. pneumoniae* species, either by typical results in phenotypic tests, or by obtaining reliability scores in the MALDI-TOF MS, in addition to amplification of the *lytA* gene. Antimicrobial susceptibility tests were performed using the disk-diffusion technique, following CLSI recommendations. The following percentages of antimicrobial resistance were observed: clindamycin (28.3%; 17), chloramphenicol (1.6%; 1), erythromycin (33.3%; 20), penicillin (31.7%; 19), trimethoprim-sulfamethoxazole (41.6%; 25) and tetracycline (41.6%; 25). All samples were susceptible to levofloxacin, rifampicin and vancomycin. It was observed that 20 (33.3%) samples had multiresistance profiles. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of penicillin were determined for samples that were not susceptible to penicillin, and ranged from 0.047 $\mu$ g/mL to 32 $\mu$ g/mL. In samples that showed the phenotype of resistance to macrolides (erythromycin) and lincosamides (clindamycin), the presence of the *ermA*, *ermB* and *mefA* genes was investigated using uniplex PCR. The *ermB* gene was predominant (28.35%; 17 out of 60 samples), followed by the *mefA* gene (18.3%; 11 out of 60 samples), and the *ermA* gene was not detected. The *ermB* gene was detected in 17 (85%) of these samples that showed macrolide and lincosamide resistance phenotype, comprising 9 (45%) samples that harbored only the *ermB* gene and 8 (40%) that also harbored *mefA*. The *mefA*

gene was seen in 11 (18.3%) strains, including 3 (27.3%) that carried only *mefA* and the 8 (72.7%) that also carried the *ermB* gene. Genes encoding types I and II pili were investigated by uniplex PCR, identifying the presence of the following structures associated with virulence: type I pilus (21.6%; 13) and type II pilus (20%; 12). The capsular types were determined by multiplex PCR tests, and the most frequent were: 19A (20%; 12), 3 (10%; 6), 6 (5%; 3), 12 (5%; 3) and 7F /7A (5%; 3). Thus, it was noticed that the most frequently found serotypes do not belong to the vaccine formulation that is widely available in the Brazilian public health system, in addition, serotype 19A is commonly associated with cases of invasive pneumococcal infections and multidrug resistance. Therefore, the present study contributes with current data on antimicrobial resistance and multidrug resistance profiles of pneumococci circulating in our region, as well as the presence of virulence factors (pili) that facilitate colonization in the host and that can become targets. vaccines in the future and, above all, the distribution of capsular types that were responsible for the cases of pneumococcal infections that occurred during the investigation period. To the best of our knowledge, this is the first study reporting the characteristics of samples of pneumococci circulating during the period of the COVID-19 pandemic in Rio de Janeiro.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, invasive pneumococcal disease, capsular types, antimicrobial resistance, virulence genes, pili, COVID-19.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A e B,** Imagens do crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em placas contendo AS para observação das características morfológicas coloniais e atividade hemolítica. **C,** Imagem representativa de gel de agarose após eletroforese demonstrando a presença do gene *lytA* .....33
- Figura 2:** Susceptibilidade ao antimicrobianos entre as 60 amostras de *Streptococcus pneumoniae* estudadas.....34
- Figura 3.** Distribuição das amostras de *Streptococcus pneumoniae* apresentando multirresistência aos antimicrobianos, de acordo com o número de classes de antimicrobianos envolvidos.....35
- Figura 4.** Distribuição dos tipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* identificados por meio da metodologia de PCR *multiplex* .....38
- Figura 5.** Géis de agarose representativos dos resultados de ampliações de genes codificadores dos tipos capsulares de *S. pneumoniae* através da metodologia de PCR *multilplex*.....40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Perfis de resistência a antimicrobianos observados entre as 20 amostras de *Streptococcus pneumoniae* multirresistentes, de acordo com os tipos capsulares .....35
- Tabela 2.** Concentrações mínimas inibitórias (CMI<sub>s</sub>) de penicilina observadas entre as amostras de *Streptococcus pneumoniae* e sua classificação definitiva quanto a susceptibilidade à penicilina .....36
- Tabela 3.** Distribuição dos sorotipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* encontrados neste trabalho, de acordo com os esquemas vacinais utilizados atualmente .....39

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> e suas características gerais.....	13
1.2 Relevância clínica e epidemiologia.....	14
1.3 Fatores de virulência.....	16
1.4 Diagnóstico e profilaxia das infecções pneumocócicas.....	18
1.5 Tratamento das infecções pneumocócicas e susceptibilidade aos antimicrobianos.....	20
1.6 Possível relação com a COVID-19.....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
Objetivo geral.....	25
Objetivos específicos.....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Amostras bacterianas.....	26
4.2 Ativação das amostras bacterianas .....	26
4.3 Identificação das amostras bacterianas .....	26
4.4 Testes fenotípicos.....	26
4.5 Testes genotípicos.....	28
4.5.1 Obtenção do DNA bacteriano.....	28
4.5.2 Detecção do gene <i>lytA</i> .....	28
4.6 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	29
4.7 Pesquisa dos genes de resistência aos macrolídeos e lincosamidas.....	30
4.8 Pesquisa de genes de virulência (codificadores de pili tipos I e II).....	31

4.9 Determinação dos tipos capsulares por reação de PCR.....	32
4.10 Eletroforese em gel de agarose.....	32
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
5.1 Identificação das amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	33
5.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	33
5.3 Perfis de multirresistência entre amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	34
5.4 Determinação da Concentração mínima inibitória (CMI) para amostras resistentes à penicilina .....	36
5.5 Presença dos genes associados à resistência aos macrolídeos e lincosamidas .....	36
5.6 Presença de genes de virulência codificadores de pili.....	37
5.7 Determinação dos tipos capsulares de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	37
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo A .....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo B .....</b>	<b>64</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae* e suas características gerais

A espécie *Streptococcus pneumoniae*, conhecida popularmente como “pneumococo”, é um dos principais agentes patogênicos pertencentes ao gênero *Streptococcus*, ao filo *Firmicutes*, à ordem *Lactobacillales* e à família *Streptococcaceae* (SPELLERBERG e BRANDT, 2019; LUNDBO e BENFIELD, 2017). Isolado primeiramente por Pasteur e Steinberg há mais de 100 anos, é descrita na literatura como cocos Gram-positivos (através da metodologia da coloração de Gram), dispostos aos pares, formando diplococos, ou em cadeias curtas. Assim como as demais espécies do gênero *Streptococcus*, os pneumococos não são produtores da enzima catalase, que é responsável por transformar peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Além disso, possuem metabolismo anaeróbico facultativo e são microrganismos consideravelmente exigentes, uma vez que seu crescimento é intensificado em meios de cultura enriquecidos com sangue e em atmosfera contendo em torno de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (BURGHOUT *et al.*, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

O gênero *Streptococcus* é bastante diverso e, para uma melhor compreensão das espécies, foi inicialmente organizado de acordo com várias de suas propriedades fenotípicas, incluindo as características antigênicas de seus membros, as quais estão relacionadas a moléculas de polissacarídeos presentes nas paredes celulares desses microrganismos. A espécie *S. pneumoniae* pertence ao grupo *viridans*, assim como as espécies *S. mutans*, *S. sanguis*, entre outros, uma vez que são essencialmente  $\alpha$ -hemolíticos, apresentando coloração esverdeada em meios enriquecidos com sangue devido a sua capacidade de lisar parcialmente eritrócitos. A espécie *S. pneumoniae* também está inserida no subgrupo *mitis* juntamente com as espécies *S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* e *S. oralis*, onde se agrupam de forma filogenética e possuem habitat primário no trato respiratório superior humano. No entanto, apesar da sua estreita relação genética, as quatro espécies apresentam potenciais patogênicos distintos, sendo *S. pneumoniae* considerada a de maior relevância clínica devido a sua frequente associação com infecções invasivas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; KILIAN e TETTELIN, 2019).

Os testes convencionais representam a base da identificação do pneumococo, permitindo a sua diferenciação em relação às demais espécies de *Streptococcus* do grupo

*mitis*. Dentre tais metodologias estão: a observação morfológica das colônias e atividade hemolítica quando cultivadas crescidas em meio de ágar sangue, e das características morfotintoriais das células bacterianas após coloração pelo método de Gram; testes de susceptibilidade à optoquina (cloridrato de etilhidrocupreína) e de solubilidade na presença de sais biliares (desoxicolato de sódio), ainda que existam relatos de amostras de pneumococos resistentes à optoquina e amostras de outras espécies do grupo *mitis* solúveis em bile (SPELLERBERG e BRANDT, 2019). Com o avanço tecnológico, novas metodologias de identificação bacteriana ganharam espaço nos ambientes laboratoriais, como é o caso dos sistemas miniaturizados API<sup>®</sup> rapid ID 32 Strep, VITEK<sup>®</sup> 2 e a espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS, do inglês MS Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry). Entretanto, esses sistemas automatizados possuem limitações na diferenciação acurada dos estreptococos do grupo *mitis* (LUND e HENRICHSEN, 1978; MUNDY *et al.*, 1998; MURRAY, 2010; TELES *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2013; SATZKE *et al.*, 2013; MURRAY *et al.*, 2014; IMAI *et al.*, 2020 SADOWY *et al.*, 2020).

## 1.2 Relevância clínica e epidemiologia

*S. pneumoniae* é um patógeno responsável por milhões de mortes em todo o mundo, sendo as doenças causadas por ele denominadas de infecções pneumocócicas ou pneumococcias. Seu habitat primário é o sistema respiratório superior humano, principalmente na região da nasofaringe, onde coloniza de forma assintomática seus hospedeiros (BROOKS e MIAS, 2018). No entanto, esse microrganismo é capaz de migrar e alcançar locais próximos, causando, então, infecções tais como otite média, sinusite e pneumonia. Além disso, *S. pneumoniae* pode causar infecções invasivas, como as da corrente circulatória e a meningite (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Os percentuais de portadores de pneumococos entre indivíduos saudáveis podem variar, sendo relatados 5 a 10% para adultos e 20 a 40% para crianças (MELEGARO, GAY e MEDLEY, 2004; WYLLIE *et al.*, 2016). Diversos fatores são associados ao risco de aquisição de colonização e estabelecimento do estado de portador de amostras de pneumococos. São eles: raça (principalmente nativos americanos e aborígenes australianos), infância, regiões em que a estação do inverno é predominante e áreas onde há aglomeração de



crianças como, por exemplo, as creches, onde se estima que pelo menos 40 a 60% das crianças presentes possam ser colonizadas por pneumococos (GRAY, TURNER e DILLON, 1982; DAVIDSON *et al.*, 1994; DUNAIS *et al.*, 2003 SMITH-VAUGHAN *et al.*, 2009; ADEGBOLA *et al.*, 2014). Além disso, sabe-se que a duração da colonização por pneumococos diminui com o aumento da idade, e oferece riscos principalmente para crianças menores de 5 anos, idosos, pessoas imunocomprometidas, com deficiências respiratórias e fumantes, pois são grupos que apresentam níveis baixos de anticorpos protetores contra os polissacarídeos capsulares dos pneumococos (GRAY, CONVERSE e DILLON, 1980; SMITH *et al.*, 1993; HOGBERG *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2016).

Os pneumococos representam os principais patógenos associados aos quadros clínicos de pneumonia adquirida na comunidade. Estima-se que, em 2015, a pneumonia pneumocócica resultou em 1,5 milhão de óbitos em todo o mundo, incluindo cerca de 400.000 mortes de crianças menores de cinco anos de idade (GBD, 2015). Além disso, estima-se que, em todo o mundo, os pneumococos sejam responsáveis por 15 casos de doenças pneumocócicas invasivas (DPIs) em 100.000 pessoas por ano, resultando em mais de 1 milhão de mortes por ano. De acordo com o Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 e 2008, no Brasil, foram identificados 7.129.291 casos de pneumonia por *S. pneumoniae*, sendo as crianças menores de cinco anos representaram 45% dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). As infecções pneumocócicas também representam elevado impacto econômico ao redor do mundo: dados de um estudo realizado por Huang e colaboradores apontam que os custos médicos diretos resultantes das infecções pneumocócicas totalizaram cerca de US\$ 3,5 bilhões somente na região dos Estados Unidos (HUANG *et al.*, 2011).

Embora seja aceito que pneumococos representantes dos mais de 90 sorotipos capsulares possam causar infecções nos seus hospedeiros, existem alguns sorotipos que estão presentes com maior frequência na etapa de colonização, ainda que fatores como idade e região geográfica dos indivíduos devam ser considerados. No entanto, cerca de 20 sorotipos estão associados com mais de 80% dos casos de DPIs, independente da faixa etária dos indivíduos. Na região da América Latina, 13 sorotipos de pneumococos são responsáveis por grande parte (aproximadamente 85%) das DPIs. São eles: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

### 1.3 Fatores de virulência

O principal fator de virulência do pneumococo é a sua cápsula polissacarídica, que é um polímero de alto peso molecular composto de subunidades oligossacarídicas repetitivas, cada uma composta por duas a oito moléculas desses açúcares. A função da cápsula polissacarídica é evitar que a célula bacteriana seja fagocitada pelas células de defesa do sistema imunológico do hospedeiro. Devido a sua diversidade antigênica e estrutural, possibilitando a existência de mais de 90 sorotipos de pneumococos, a cápsula além de ser um importante fator de virulência, também representa um alvo para desenvolver métodos de identificação e diferenciação por reações sorológicas como, por exemplo, na reação de *Quellung*, realizada com antissoros específicos para cada sorotipo existente ((SPELLERBERG e BRANDT, 2019). A cápsula polissacarídica pneumocócica também é a base para o desenvolvimento das vacinas pneumocócicas atualmente em uso, uma vez que o polissacarídeo formador dessa cápsula é imunogênico e capaz de induzir a produção de anticorpos que irão atuar como protetores, evitando, assim, a ocorrência de infecções graves por esse patógeno (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015). Por fim, a cápsula polissacarídica também é associada ao aumento da virulência de *S. pneumoniae* devido à capacidade de sofrer mutações nas regiões gênicas responsáveis pela síntese de polissacarídeos capsulares (*locus cps*), tendo como consequência a mudança de sorotipo (BROOKS e MIAS, 2018; SANTOS *et al.*, 2022).

As proteínas que se ligam à colina (componente lipídico presente na membrana celular), as CBPs, estão ancoradas à superfície celular dos pneumococos, e constituem fatores associados com a capacidade de virulência desses microrganismos. Dentre as CBPs, destacam-se a autolisina (*lytA*), a proteína A da superfície de pneumococos (PspA) e a adesina também conhecida de CbpA. O número de CBPs distintas existentes pode variar de acordo com a cepa de pneumococo observada, sendo 10 tipos presentes na cepa de referência R6 e 15 na amostra de referência TIGR4 (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

A principal autolisina (codificada pelo gene *lytA*, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidase) de *S. pneumoniae* é membro de um grupo amplamente distribuído de enzimas responsáveis por degradar a parede celular, além de desempenhar papéis fisiológicos relacionados ao crescimento e renovação da parede celular e separação celular em microrganismos (TOMASZ, 1984). A autolisina pneumocócica em fase estacionária bacteriana ou na presença de antimicrobianos causa lise celular. Ela possui uma organização considerada modular e sua função catalítica está localizada na porção N-terminal, enquanto a

porção C-terminal desenvolve um papel de ligante da enzima nos resíduos de colina presentes nas paredes celulares dos pneumococos (LÓPEZ *et al.*, 1992; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015). Embora ainda haja controvérsias sobre a importância da autolisina na patogênese, ela é considerada um fator de virulência uma vez que medeia a liberação de componentes da parede celular altamente inflamatórios e de pneumolisina (TUOMANEN *et al.*, 1985).

PspA é uma das proteínas de superfície celular mais abundantes nos pneumococos. Ela se liga à lactoferrina e inibe a deposição e ativação do sistema complemento, impedindo, assim, a fagocitose. A PspA é expressa por grande parte dos sorotipos de maior importância clínica, sendo considerada um dos principais determinantes da imunidade protetora. Estudos revelam sua essencialidade na colonização da nasofaringe, além do seu papel na infecção pulmonar e bacteremia. A PspA também parece ser um potencial alvo no desenvolvimento de vacinas, uma vez que grande parte dos genomas de pneumococos abriga o gene *pspA* (MCDANIEL *et al.*, 1987; CRAIN *et al.*, 1990; REN *et al.*, 2004; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

A pneumolisina (Ply) é uma proteína com massa molecular de aproximadamente 53 kDa, que faz parte da família de citolisinas dependentes de colesterol (CDC) que formam poros nas membranas celulares eucarióticas. Ela é produzida por todas as amostras clínicas de pneumococos, sendo liberada, geralmente, quando o microrganismo sofre a ação da autolisina. CDCs consideravelmente semelhantes estão presentes em outras bactérias, como *Bacillus anthracis* (antrolisina O), *Clostridium perfringens* (perfringolisina O, Pfo), *Clostridium sordellii* (sordellisina), *Listeriamonocytogenes* (listeriolisina O), *Listeria seeligeri* (seeligeriolisina O), ou *Streptococcus mitis* (mitilisina). Nos pneumococos, as CDC têm diversas funções na fase inicial do processo de patogênese das doenças pneumocócicas. Elas são citotóxicas, de modo que influenciam na diminuição dos movimentos ciliares das células do epitélio brônquico e na inibição direta da fagocitose. Quando há mutação ou deleção no gene que codifica a Ply nas amostras de pneumococos, é observada uma redução na capacidade de virulência e na carga bacteriana presente no local de colonização (KADIOGLU *et al.*, 2000; JEDRZEJAS *et al.*, 2007; MITCHELL e DALZIEL, 2014; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Embora *S. pneumoniae* tenha sido isolado pela primeira vez por Pasteur, em 1881, um dos principais fatores de virulência dos pneumococos, os pili, só foram descobertos durante o início do século XXI. Os pili são estruturas protéicas de alto peso molecular, presentes na

superfície celular bacteriana, e se assemelham a um “fio de cabelo”. Essas estruturas atuam auxiliando na adesão às células eucarióticas, além de também atuarem na formação de biofilmes e indução na produção de citocinas pró-inflamatórias (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015). Por estarem associadas à adesão de componentes da matriz extracelular, essas estruturas são importantes para uma colonização inicial mais eficaz dos pneumococos. No entanto, apenas algumas amostras possuem os genes codificadores de pili, podendo albergar, inclusive, mais de um gene (BAROCCHI *et al.*, 2006; NELSON *et al.*, 2007). Os genes responsáveis pela produção de pili fazem parte de uma ilha de patogenicidade composta por genes que codificam um regulador transcricional (RlrA), responsável pela expressão dos genes estruturais do pilus; proteínas estruturais (RrgA, RrgB e RrgC de pilus do tipo I e SipA de pilus do tipo II) e as sortases, responsáveis pela ligação covalente do pilus à parede da célula bacteriana (srtB, srtC e srtD, SrtG1 e SrtG2) (HAVA, HEMSLEY e CAMILLI, 2003; BAROCCHI *et al.*, 2006; MARRAFFINI, DEDENT e SCHNEEWIND, 2006). Além das duas variantes de pili expressas por alguns pneumococos, o pilus 1 (PI-1) e o pilus 2 (PI-2), foi descrito, recentemente, um pilus de competência do tipo IV (LAURENCEAU *et al.*, 2013; MUSCHIOL *et al.*, 2019).

Outros fatores de virulência facilitam a adesão dos pneumococos ao epitélio de seus hospedeiros, como é o caso da neuraminidase (NanA e NanB), responsável por clivar as moléculas de ácido siálico ou neuramínico, constituintes da estrutura da mucina que compõe a mucosa, diminuindo assim a sua viscosidade. Por sua vez, a hialuronidase (Hyl) também facilita a aderência porque atua na clivagem do ácido hialurônico, tornando o tecido conjuntivo significativamente mais frouxo e permitindo a invasão da célula bacteriana. Por fim, a produção de IgA protease que é uma enzima capaz de degradar imunoglobulinas, também representa um importantefator de virulência dos pneumococos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

#### **1.4 Diagnóstico e profilaxia das infecções pneumocócicas**

O diagnóstico das doenças pneumocócicas é comumente executado em laboratórios especializados, sendo tradicionalmente iniciado pelo médico ao realizar a avaliação física do paciente que apresente sintomas de infecções (CDC, 2022). Os procedimentos laboratoriais mais conhecidos são: a semeadura de fluidos corpóreos (sangue, urina, escarro e líquido

cefalorraquidiano) em meios de cultura enriquecidos com sangue, a avaliação das características colônias e características morfológicas celulares após coloração pelo método de Gram, seguidos de testes de identificação. Outros métodos como a detecção de antígenos presentes na urina e ensaios de PCR, com marcadores moleculares da espécie, desenvolvidos especificamente para amostras em cultura também são utilizados (MANDELL, *et al.*, 2007; BRADLEY *et al.*, 2011; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

A forma mais difundida de profilaxia contra as doenças pneumocócicas é a vacinação, cujo objetivo é estimular uma resposta imunológica eficaz no hospedeiro e, assim, diminuir a incidência de portadores dos principais sorotipos de pneumococos causadores de infecções e, que estão contemplados na composição das vacinas (CILLÓNIZ *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016). As vacinas pneumocócicas são divididas em duas classes, a polissacarídica 23-valente (PPSV23) e as conjugadas (PCV's). A PPSV23 é constituída por 23 polissacarídeos capsulares de pneumococos purificados e é recomendada para ser administrada em pessoas com mais de 65 anos, devido a sua considerável eficácia na população adulta (50 a 70%). No entanto, a vacina PPSV23 não é indicada para a população infantil, uma vez que é composta por antígenos independentes de células T, ocasionando uma resposta imunológica adaptativa limitada. Por fim, a PPSV23 confere proteção contra os 23 sorotipos de pneumococos a seguir: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F (CILLÓNIZ *et al.*, 2016; MUSER e RODRIGUEZ-BARRADAS, 2022).

As PCV's são compostas por polissacarídeos capsulares pneumocócicos ligados covalentemente (conjugados) a uma proteína transportadora, a CRM197. Outra característica importante das PCV's é que são células T dependentes, proporcionando uma resposta imunológica mais duradoura. Essas vacinas foram desenvolvidas após estudos observarem baixa eficácia e baixa imunogenicidade da PPSV23 em lactentes e crianças pequenas (CILLÓNIZ *et al.*, 2016; MUSER e RODRIGUEZ-BARRADAS, 2022). A primeira vacina conjugada licenciada foi a 7-valente (Prevenar<sup>®</sup>, Wyeth ou PCV7), que confere proteção contra os sorotipos de pneumococos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F. No Brasil seu uso foi restrito às unidades particulares de saúde, entretanto, ainda assim houve uma diminuição dos casos de doenças pneumocócicas causadas por sorotipos contemplados na vacina (BRANDILEONE *et al.*, 2006).

Em 2010, devido a mudanças epidemiológicas, implementou-se no Brasil, por meio do Programa Nacional de Imunizações, o uso da vacina pneumocócica conjugada 10-valente

(Synflorix<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline ou PCV10) que confere proteção contra os seguintes sorotipos de pneumococos: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. A vacina 10-valente foi desenvolvida para cobrir, pelo menos, 80% dos sorotipos mundialmente responsáveis por causar doenças pneumocócicas invasivas (BRANDILEONE *et al.*, 2016; JAROVSKY e BEREZIN, 2023). Por sua vez, a vacina pneumocócica conjugada 13-valente (Prevenar<sup>®</sup>, Wyeth ou PCV13), além de contemplar todos os sorotipos presentes na PCV10, inclui outros três sorotipos considerados emergentes, a saber: 3, 6A e 19A. No Brasil, essa vacina está disponível nas unidades de saúde privadas, sendo de difícil acesso para indivíduos em situação de vulnerabilidade social, impossibilitando assim um maior impacto da prevenção vacinal (LEE *et al.*, 2014; PILISHVILI e BENNETT, 2015; NEVES *et al.*, 2019).

O uso de novos modelos para formulação de vacinas conjugadas (PCV15 e PCV20) e também de novos alvos vacinais (pili, autolisinas, antígenos de superfície, etc) tem sido discutido, uma vez que o impacto da imunização demonstrou eficácia no combate às doenças pneumocócicas e redução na disseminação de amostras resistentes aos antimicrobianos de escolha terapêutica (CRONEY *et al.*, 2012; JANSSENS *et al.*, 2023; MUFIDA *et al.*, 2022). A PCV20, por exemplo, tem sido considerada uma alternativa importante para diminuir o impacto das infecções causadas por sorotipos de *S. pneumoniae* não abrangidos pelas versões dos imunizantes anteriores. No entanto, a PCV20 está sendo destinada apenas aos indivíduos adultos, já que majoritariamente, na literatura, estão disponíveis estudos analíticos e de comparação com outras formulações, que visam direcionar essa alternativa de imunização a esse grupo etário (KOBAYASHI *et al.*, 2022; SHIRLEY, 2022).

## **1.5 Tratamento para as infecções pneumocócicas e susceptibilidade aos antimicrobianos**

O tratamento das infecções pneumocócicas requer a utilização de antibióticos, essenciais na redução da carga bacteriana (KIM *et al.*, 2016). Durante muito tempo, os pneumococos mantiveram sensibilidade à penicilina, antimicrobiano pertencente à classe dos  $\beta$ -lactâmicos, fazendo com que esta se tornasse a principal escolha terapêutica para as infecções causadas por esse patógeno. A penicilina possui em sua composição um anel  $\beta$ -lactâmico que é essencial para a atividade antibacteriana. Além disso, o seu principal mecanismo de ação é bloquear a síntese de peptidoglicano pela inativação simultânea de múltiplas proteínas de ligação à penicilina (PBPs), resultando na estimulação de enzimas

autolíticas e, conseqüentemente, na degradação da parede celular bacteriana. A resistência dos pneumococos à penicilina ocorre quando há mutações, múltiplas e cumulativas nas proteínas que fazem parte da sua constituição e que se ligam à penicilina (PBP's), reduzindo assim a sua afinidade por esse antibiótico (GEORGOPAPADAKOU e LIU, 1980; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015; CHERAZARD *et al.*, 2017). A resistência do *S. pneumoniae* à penicilina emergiu na década de 1970 e, assim como a resistência a outros antimicrobianos de escolha terapêutica, é considerada uma emergência de saúde mundial, sendo tratada como prioridade pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), uma vez que leva milhares de pessoas a óbito todos os anos (CDC, 2019).

Os macrolídeos e lincosamidas são alternativas terapêuticas quando a amostra que provoca a infecção no hospedeiro é resistente à penicilina, ou ainda, quando o paciente é alérgico aos  $\beta$ -lactâmicos. Os macrolídeos são definidos por uma estrutura macrocíclica complexa com um anel de lactona de 14, 15 ou 16 membros substituídos por grupos de açúcares neutros ou amino e atuam inibindo a síntese de proteínas bacterianas quando se ligam à subunidade ribossomal 50S (SCHROEDER e STEPHENS, 2016). As lincosamidas consistem em um aminoácido incomum, *trans-N*-metil-4-*n*-L-prolina (ácido propilhítrico), ligado por uma ligação peptídica com o açúcar 6-amino-6,8-didesoxi-1-tio-*D*-*eritro*- $\alpha$ -*D*-galactopiranosídeo (metiltio-lincosamida) e, assim como os macrolídeos, também agem inibindo a síntese de proteínas bacterianas (SPIZEK e REZANKA, 2017).

O principal mecanismo associado à resistência a níveis elevados de macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B, é a presença, no genoma bacteriano, dos genes da família eritromicina ribossomalmetilase (*erm*) codificadores de N-metiltransferases específicas de adenina que metilam o rRNA 23S, impedindo assim a ligação do antimicrobiano aos ribossomos. Este é determinante do fenótipo MLS<sub>B</sub>. O gene *erm*(B) é o mais frequente entre amostras de *S. pneumoniae* resistentes aos macrolídeos, ao passo que o *erm*(A) é raramente encontrado. Outro mecanismo de resistência, mediado por uma bomba de efluxo, codificado pelo gene *mefA*, confere resistência aos macrolídeos em níveis mais baixos. Este é determinante do fenótipo M (LIÑARES *et al.*, 2010; SCHROEDER e STEPHENS, 2016; POPOVIC *et al.*, 2018).

Outros antimicrobianos, pertencentes às classes das fluorquinolonas e das sulfonamidas, também são utilizados como escolhas terapêuticas para as infecções causadas por pneumococos; no entanto, há relatos de percentuais consideráveis de amostras resistentes

(KARPANOJA *et al.*, 2008; LIÑARES *et al.*, 2010). De outro modo, os glicopeptídeos, representam uma valiosa opção terapêutica em casos de infecções causadas por pneumococos resistentes à penicilina, macrolídeos e lincosamidas, uma vez que a ocorrência de pneumococos resistentes a esses antimicrobianos ainda não foi relatada (ALTUN *et al.*, 2015; MARAKI *et al.*, 2018).

## 1.6 Possível relação com a COVID-19

A COVID-19 é uma doença infecciosa que atinge o trato respiratório do hospedeiro, gerando quadros clínicos de extrema gravidade. É causada pelo vírus SARS-CoV-2, conhecido também pelo codinome de “novo coronavírus”. O SARS-CoV-2 tem sido o responsável por uma pandemia que se iniciou em Wuhan, na China, no ano de 2019 e que levou a óbito aproximadamente 702.000 pessoas no Brasil (GRALINSKI e MENACHERY, 2020; CORONAVÍRUS BRASIL, 2023). Os pacientes diagnosticados com a COVID-19 apresentam manifestações clínicas diversas e que variam em gravidade, sendo a pneumonia a mais comum (HUANG *et al.*, 2020).

Por ambos se tratarem de patógenos responsáveis por infecções respiratórias, SARS-CoV-2 e *Streptococcus pneumoniae* têm recebido especial atenção, incluindo investigações sobre a possibilidade de co-infecções e suas consequências para o paciente (AMIN-CHOWDHURY *et al.*, 2021). Além disso, tem sido discutido se o uso intenso de antimicrobianos durante o período crítico de ocorrência da COVID-19 pode ter influenciado no perfil de resistência de amostras de *S. pneumoniae* (LANGFORD *et al.*, 2021; SEMPERE *et al.*, 2022). Um bom exemplo deste cenário foi a utilização da azitromicina (pertencente à classe dos macrolídeos) de forma acentuada, e muitas vezes, resultado de uma automedicação a partir de informações disponibilizadas nos meios de comunicação. Tais fatores como erros nas indicações médicas, a automedicação da população e a fiscalização ineficaz da venda de antimicrobianos, nas farmácias e drogarias, onde se concentram esses medicamentos, principalmente durante o período da pandemia de COVID-19, contribuem para a multirresistência bacteriana e sugerem essa discussão (FREIRES e RODRIGUES, 2023). Outro fator importante que ocorreu durante a pandemia de COVID-19 foi o *lockdown*, fazendo com que efeitos de aparente redução na incidência de certas infecções, incluindo as



infecções pneumocócicas, fossem documentados (AMIN-CHOWDHURY *et al.*, 2021; CHOI e MILLER, 2021).

## 2. JUSTIFICATIVA

*Streptococcus pneumoniae* é um dos principais agentes associados à otite média, pneumonia adquirida na comunidade, bacteremia e meningite. A população mais acometida por este patógeno são as crianças menores de cinco anos, idosos e indivíduos imunocomprometidos, embora adultos saudáveis também possam desenvolver pneumococcias.

Mesmo com o desenvolvimento e o uso das vacinas pneumocócicas como método de prevenção, a incidência das infecções causadas por *S. pneumoniae* ainda é altamente preocupante, uma vez que casos de infecções graves continuam sendo comuns nas diferentes regiões do mundo, frequentemente associados a amostras resistentes a múltiplos antimicrobianos. Como fator agravante, é discutido o fenômeno de substituição dos tipos capsulares, não contemplados nas formulações vacinais e que são responsáveis por quadros de infecções invasivas.

Assim, estudos sobre a ocorrência dos diferentes tipos capsulares e a susceptibilidade a antimicrobianos contribuirão para um melhor entedimento do perfil epidemiológico de *S. pneumoniae* durante a pandemia de COVID-19, um período atípico da humanidade, no qual houve uso acentuado de antimicrobianos e de medidas de proteção individual (como isolamento social e uso de máscaras, que diminuem o contato direto entre os indivíduos), que podem influenciar na circulação e características dos microrganismos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar fenotípica e genotipicamente amostras de *Streptococcus pneumoniae* isoladas de pacientes diagnosticados com infecções pneumocócicas durante o período da pandemia causada por COVID-19 e fornecer informações sobre os perfis de virulência e resistência.

#### **Objetivos específicos**

- Confirmar a identificação das amostras bacterianas empregando metodologias fenotípicas e genotípicas;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- Determinar a concentração mínima inibitória de penicilina entre amostras que apresentarem o fenótipo de resistência, observado em testes de disco-difusão;
- Pesquisar, por meio de testes baseados em PCR, os genes relacionados à resistência aos macrolídeos e às lincosamidas nas amostras que apresentarem o fenótipo de resistência à eritromicina e à clindamicina;
- Pesquisar, por meio de testes baseados em PCR, os genes de virulência que são associados à produção de pili (pilus do tipo I e tipo II).
- Determinar o tipo capsular das amostras por meio da metodologia de PCR *multiplex*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Amostras bacterianas**

Neste estudo, foram incluídas 60 amostras de *S. pneumoniae* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico, localizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. As amostras foram isoladas de pacientes atendidos em diferentes instituições de saúde no estado do Rio de Janeiro, durante 2021 e 2022, a partir de materiais clínicos indicativos de infecções, conforme a seguir: sangue, 50 amostras; secreções do trato respiratório e anexos, 5 amostras; secreções de ferida de pele, 2 amostras; líquido ascítico, 1 amostra; abscesso anorretal, 1 amostra; não informado, 1 amostra). A idade dos pacientes variou de 1 mês até 102 anos. Outras informações sobre as amostras, consideradas relevantes, encontram-se reunidas no **Anexo A**. Após o recebimento, todas as amostras foram mantidas sob a forma de suspensão bacteriana em criotubos contendo solução preparada com *Skim-Milk* a 10% e glicerol a 10% e, estocadas em tanques contendo nitrogênio líquido.

### **4.2 Ativação das amostras bacterianas**

Para a realização dos experimentos no laboratório, sejam eles fenotípicos ou genotípicos, foi necessário que as amostras de *S. pneumoniae* estivessem metabolicamente ativas e viáveis. Sendo assim, a ativação das mesmas foi realizada por meio da semeadura de uma alíquota da suspensão bacteriana em estoque, com auxílio de alça bacteriológica, em placas contendo meio de ágar Columbia adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (AS, PlastLabor), as quais foram incubadas em estufa com atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante um período de 18-20h.

### **4.3 Identificação das amostras bacterianas**

Após o crescimento em placa, foram realizados testes fenotípicos e genotípicos para fins de confirmação da identificação e caracterização das amostras. Os testes realizados estão descritos a seguir.

### **4.4 Testes fenotípicos**

A caracterização fenotípica das amostras foi realizada por meio da análise de características morfológicas das colônias e morfo-tintoriais das células bacterianas, e da atividade hemolítica, além de aspectos relacionados ao seu metabolismo. As colônias sugestivas

de pneumococos são caracterizadas por serem pequenas, redondas, brilhantes, lisas ou mucoides, além de apresentarem  $\alpha$ -hemólise no meio de AS (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015). Em seguida, foram realizados, concomitantemente, os testes de susceptibilidade à optoquina (cloridrato de etil-hidrocupreína), bile solubilidade e a análise pela técnica de MALDI-TOF MS.

Para o teste de susceptibilidade à optoquina, a partir do crescimento bacteriano em placa de AS (PlastLabor), foi preparada uma suspensão, em solução salina distribuída em tubos, com turvação equivalente à da escala 0,5 de McFarland. Semeou-se essa suspensão de forma confluenta em meio de AS (PlastLabor), com a utilização de um *swab*. Em seguida, para cada amostra, foi adicionado, sob a superfície do meio, um disco impregnado com 5 $\mu$ g de optoquina (Becton Dickinson). Após essa etapa, as placas foram incubadas em estufa com atmosfera enriquecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante um período de 18-24h. Por fim, a zona (halo) de inibição formada ao redor dos discos foi medida com uma régua milimetrada. As amostras que apresentaram halos de inibição maiores ou iguais a 14mm foram consideradas susceptíveis à optoquina, enquanto aquelas que apresentaram halos de inibição menores que 14mm foram consideradas resistentes (SPELLERBERG; BRANDT, 2011). As amostras ATCC 49619 (*S. pneumoniae*) e SS-429 (*S. mitis*) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Para o teste da bile solubilidade, uma suspensão bacteriana densa, com turvação equivalente a da escala 2 de McFarland, foi preparada em 01 mL de solução salina. Após o preparo da suspensão, distribuiu-se, igualmente, 500 $\mu$ L da suspensão em dois tubos de vidro; um contendo 500 $\mu$ L de salina (C, controle) e outro contendo 500 $\mu$ L de desoxicolato de sódio (T, teste). Os tubos foram incubados em estufa com atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante 2h. A leitura foi realizada observando a turvação do tubo T em relação a do tubo C. A ocorrência de clareamento da suspensão no tubo T, acompanhada da manutenção da turvação da suspensão no tubo C, foi considerada como resultado positivo para o teste, indicando a identificação presuntiva da amostra bacteriana como pertencente a espécie *S. pneumoniae* (SPELLERBERG; BRANDT, 2011). As amostras ATCC49619 (*S. pneumoniae*) e SS 429 (*S. mitis*) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

A identificação das amostras, aplicando-se a metodologia baseada em espectrometria de massas por MALDI-TOF, foi realizada por meio da aplicação de uma

alíquota de uma colônia de cada amostra, a partir de crescimento recente, recolhida com o auxílio de um palito e depositada em um dos pontos delimitados na superfície de uma placa de aço inoxidável polido (MSP 96 *target polished steel* BC, Bruker Daltonics). Em seguida, foi aplicado 1µL de matriz polimérica HCCA [constituída por uma solução de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico a 10mg/ml (Bruker Daltonics) em acetonitrila a 50% e ácido tricloroacético a 2,5% (Sigma) ]. Como resultados, foram gerados espectros por meio do espectrômetro de massa *Microflex* LT (Bruker Daltonics) e auxílio do *software Flex Control* no intervalo de 2.000 a 20.000 *m/z*. A calibração do aparelho foi realizada de acordo com as recomendações estabelecidas pelo fabricante, assim como os critérios de interpretação dos resultados. Ou seja, foram utilizados os valores dos escores para classificação: (i) entre 1.700 e 1.999 como provável identificação para gênero; (ii) entre 2.000 e 2.299 como segura a identificação para gênero e provável identificação de espécie e, (iii) entre 2.300 e 3.000 como identificação altamente provável da espécie.

## 4.5 Testes genotípicos

### 4.5.1 Obtenção do DNA bacteriano

Para a obtenção do DNA bacteriano das amostras foi utilizada a resina Chelex-100<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories) acrescida de Proteinase K (20mg/ml) (Sigma Co). O protocolo foi realizado de acordo com instruções previamente descritas (PINTO *et al.*, 2013). Com o auxílio de uma alça de 1µL, o crescimento bacteriano foi recolhido da superfície de meio de AS e depositado em um microtubo que continha a solução de resina e proteinase K. Após incubação por um período de 1h a 50°C e agitação em *Vortex* durante 10 segundos, a suspensão foi aquecida a 95°C por 10 minutos, seguida de nova agitação em *Vortex* para sua homogeneização. Por fim, os tubos foram centrifugados a 1200 *rpm* por 3 min e os extratos de DNA bacterianos armazenados em freezer -20°C para serem utilizados nas reações de PCR.

### 4.5.2 Detecção do gene *lytA*

A detecção do gene *lytA*, que é específico da espécie, foi realizada, por meio da técnica de PCR uniplex, em todas as amostras estudadas, utilizando os iniciadores descritos por Andrade *et al.* (2010) (**Anexo B**). As reações de amplificação ocorreram em termociclador Veriti, *96-Well ThermalCycler* (AppliedBiosystems). Cada mistura de reação teve um volume final de 30µL, sendo composto por 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen) acrescido de 3,0mM de cloreto de magnésio [(50mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen)],

0,2mM de dNTP mix (100mM de cada um) (Invitrogen), 10 $\mu$ M do iniciador, 0,5U de *platinum*<sup>®</sup>Taq polimerase (Invitrogen). A programação da reação utilizada foi de 94°C por 10 minutos para a desnaturação inicial das fitas de DNA, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 2 minutos para a extensão final das fitas de DNA. Como controle positivo foi utilizado o DNA obtido da amostra de *S. pneumoniae* ATCC 49619.

#### 4.6 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado utilizando-se a metodologia de disco-difusão em ágar, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Para este teste, foi necessário obter um crescimento bacteriano recente, em meio de AS, para o preparo de uma suspensão em salina a 0,85% esterilizada, com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland. A partir desta, foi feita uma semeadura em três direções distintas (semeadura para crescimento confluyente), utilizando um *swab*, em placas contendo ágar Mueller Hinton (PlastLabor) acrescido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Em seguida, com o auxílio de uma pinça de metal esterilizada, foram depositados à superfície do ágar os discos impregnados (Oxoid) com os respectivos antimicrobianos: clindamicina (2 $\mu$ g); cloranfenicol (30 $\mu$ g); eritromicina (15 $\mu$ g); levofloxacina (5 $\mu$ g); oxacilina (1 $\mu$ g); rifampicina (5 $\mu$ g); sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 $\mu$ g); tetracilina (30 $\mu$ g) e vancomicina (30 $\mu$ g). As placas contendo os discos depositados foram incubadas por um período de 18 a 20 horas, em estufa com atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e, em seguida, os halos de inibição foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada. As amostras resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos, foram consideradas multirresistentes (MDR) (SIIRA *et al.*, 2012). Foram avaliadas nove classes de antimicrobianos: glicopeptídeos (vancomicina); macrolídeos (eritromicina); tetraciclinas (tetraciclina); fluorquinolonas (levofloxacina); inibidores da via metabólica do folato [sulfomanidas e trimetoprim (sulfametoxazol-trimetoprim)], fenicois (cloranfenicol), ansamicinas (rifampicina); lincosamidas (clindamicina) e  $\beta$ -lactâmicos (penicilina).

A identificação dos fenótipos de resistência à eritromicina e à clindamicina foi realizada de forma concomitante ao teste de disco-difusão descrito anteriormente. Para tal, foi instituído um intervalo de distância de 12 milímetros entre os discos impregnados com os antimicrobianos eritromicina e clindamicina. Para a interpretação dos testes, foram utilizadas

as recomendações propostas pelo CLSI (2021), que atribui o fenótipo M às amostras resistentes à eritromicina e susceptíveis à clindamicina e o fenótipo MLS<sub>B</sub> às amostras resistentes a ambos antimicrobianos. O fenótipo MLS<sub>B</sub> induzido foi associado às amostras que apresentaram um halo em forma da letra “D”, indicando resistência cruzada.

Para as amostras não susceptíveis à penicilina (disco de oxacilina) durante o teste de disco-difusão, de acordo com as orientações estabelecidas pelo CLSI (2021), foi realizado o teste para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para este antimicrobiano, utilizando o teste de difusão em gradiente a partir de fitas [E-test<sup>®</sup> (BioMérieux)]. A metodologia foi a mesma empregada para o teste de disco-difusão descrito anteriormente, exceto pela substituição dos discos impregnados com os antimicrobianos pela fita de E-test<sup>®</sup> de penicilina. Após um período de incubação de 18 a 20 horas, em estufa com atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, foram realizadas a leitura e a interpretação. As amostras que apresentaram CMI ≥ 0,12 µg/mL foram consideradas não-susceptíveis à penicilina.

#### 4.7 Pesquisa dos genes de resistência aos macrolídeos e lincosamidas

As amostras que apresentaram o fenótipo de resistência à eritromicina e à clindamicina, nos testes de disco-difusão, foram submetidas à metodologia de PCR *uniplex* para a identificação dos genes (*ermA*, *ermB* e *mefA*) que codificam mecanismos de resistência aos macrolídeos e lincosamidas. As reações foram realizadas em termociclador Veriti, 96-Well *ThermalCycler* (AppliedBiosystems), em um volume final de 30µL para cada reação. As sequências iniciadoras e as referências usadas como base estão listadas no **Anexo B**.

O *mix* de cada reação foi composto por 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen), 2,0mM [para detecção dos genes *ermA* e *ermB*] ou 4,0mM [para detecção do gene *mefA*] de cloreto de magnésio [(50mM MgCl<sub>2</sub>), Invitrogen], 0,25mM de dNTP mix (100 mM de cada) (Invitrogen), 0,5µM de cada iniciador, 0,5U de *Platinum*<sup>®</sup> Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2µL de DNA amostral. Os ciclos de amplificação programados no termociclador foram de 95°C por 3 minutos para a desnaturação inicial, 35 ciclos de a 93°C por 1 minuto para a desnaturação, 52°C por 1 minuto (específico para os genes *ermA* e *ermB*) ou 54°C por 1 minuto (específico para o gene *mefA*) para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e 72°C por 5 minutos para a extensão final das fitas de DNA. Como controles positivos foram utilizados os DNAs obtidos das seguintes amostras: *Streptococcus* do grupo C



53157 (*ermA*), *Streptococcus* do grupo G 015195 (*ermB*) e *Streptococcus* do grupo G 06196 (*mefA*).

#### 4.8 Pesquisa de genes de virulência (codificadores de pili dos tipos I e II)

Para a pesquisa por genes de virulência, especificamente os que codificam a produção de pilus do tipo I (*rrgC*) e pilus do tipo II (*sipA*), foi empregada a metodologia de PCR *uniplex*, seguindo protocolos descritos previamente por Regev-Yochay *et al.* (2010) e Zähler *et al.*, (2010), respectivamente. As sequências dos iniciadores e referências usadas como base estão no **Anexo B**.

Para a pesquisa dos genes envolvidos na produção de pilus tipo I, o *mix* da reação, com volume final de 25µL, foi composto por 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen), 2,5mM de cloreto de magnésio [(50mM MgCl<sub>2</sub>), Invitrogen], 0,2mM de dNTP mix (100 mM de cada) (Invitrogen), 1U de *Platinum*<sup>®</sup> TaqDNA polimerase (Invitrogen), 0,3mM de cada iniciador e 1,5µL de DNA. A programação utilizada no termociclador Veriti 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems) foi de 94°C por 10 minutos para a desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 15 minutos para a desnaturação, 60°C por 15 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e 72°C por 5 minutos para a extensão final das fitas de DNA. Os controles positivo e negativo utilizados nessa reação foram os materiais genéticos de *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (ATCC BAA-334) e *Streptococcus pneumoniae* R6 (ATCC BAA-255), respectivamente.

Por sua vez, o *mix* da reação para a pesquisa dos genes referentes ao pilus do tipo II, também contendo volume final de 25µL, foi composto por 1x PCR buffer (10mM Tris, 50mM KCl [pH 8.3]) (Invitrogen), 2,5mM de cloreto de magnésio [(50mM MgCl<sub>2</sub>), Invitrogen], 0,2mM de dNTP mix (100 mM de cada) (Invitrogen), 1U de *Platinum*<sup>®</sup> TaqDNA polimerase (Invitrogen, EUA), 0,3mM de cada iniciador e 1,5µL de DNA. A programação utilizada no termociclador Veriti96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) foi de 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 53°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e 72°C por 5 minutos para a extensão final. Os controles positivo e negativo utilizados nessa reação foram os materiais genéticos de *Streptococcus pneumoniae* Sp1945 e *Streptococcus pneumoniae* R6 (ATCC BAA-255).

#### 4.9 Determinação dos tipos capsulares por reação de PCR

A determinação dos tipos capsulares das amostras foi realizada por meio da metodologia de PCR *multiplex*, com base em protocolos descritos previamente (PAI *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007; PIMENTA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010; MENEZES *et al.*, 2013) e atualizações (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>). As sequências iniciadoras das 8 reações distintas, acrescidas de uma reação para diferenciação dos tipos capsulares do grupo 6, estão no **Anexo B**.

O *mix* das reações, com volume final de 25µL, foi composto por 1x PCR buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl [pH 8.3]), 2mM de cloreto de magnésio [(50mM MgCl<sub>2</sub>), Invitrogen], 0,2 mM de dNTP mix (100 mM de cada) (Invitrogen), iniciadores que variaram de concentração de acordo com cada reação, 0,5U *Platinum*<sup>®</sup>Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5µL de DNA bacteriano. A programação utilizada no termociclador, para todas as reações, foi de 94°C por 15 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 54°C por 90 segundos para o anelamento, 72°C por 60 segundos para a extensão e 72°C por 10 minutos para a extensão final das fitas de DNA. Cada reação, exceto a de diferenciação dos sorotipos do grupo 6, buscou 5 sorotipos/sorogrupos capsulares distintos, totalizando, ao final, 40 alvos investigados. Além disso, foram utilizados controles positivos diversos e o iniciador *cpsA* em todas elas como indicador da presença de cápsula polissacarídica bacteriana.

#### 4.10 Eletroforese em gel de agarose

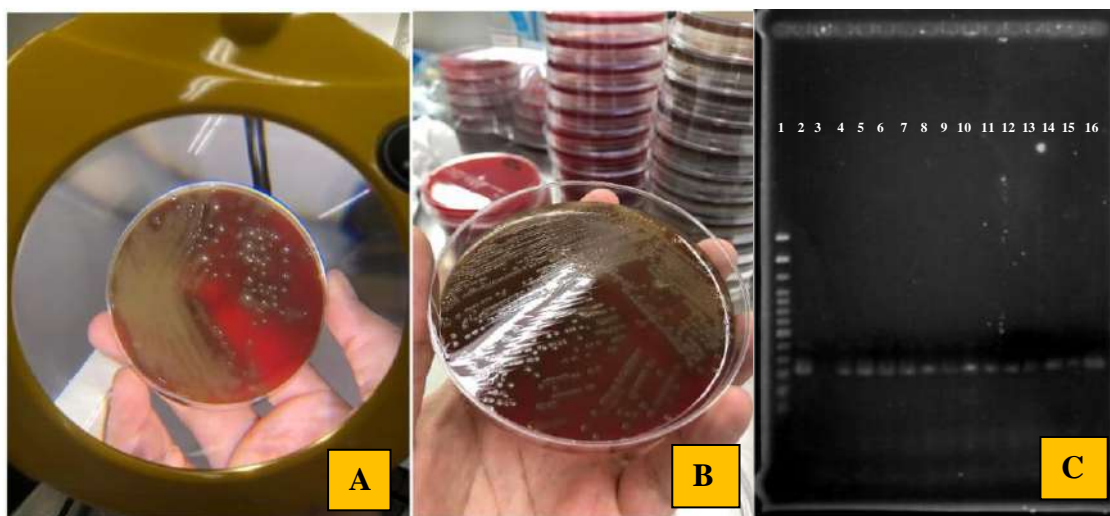
Para análise de todos os resultados das amplificações genéticas realizadas por meio das metodologias de PCR descritas anteriormente, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose (p/v) (UltraPure Agarose; Invitrogen). Os géis foram preparados com a solução de TBE 0,5X (Tris base 44mM, ácido bórico 44mM) e diferentes concentrações de agarose em pó, as quais foram a 1% para as reações de *lytA*, pilus 1, pilus 2, *ermA*, *ermB*, *mefA* e a 2% para as reações de detecção dos sorotipos capsulares. O procedimento ocorreu em cuba horizontal sob corrente elétrica constante de 100V, utilizando o tampão TBE 0,5X (Tris base 44mM, ácido bórico 44mM), e padrão de 100 pares de base (DNA ladder, Invitrogen) para identificação dos tamanhos dos segmentos gênicos amplificados em cada reação. Por fim, os géis foram submetidos a tratamento com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por um período de 15 a 20 minutos e visualizados sob luz UV com o auxílio do sistema MiniBis Pro

(DNR *Bio-Imagins Systems*), sendo as imagens armazenadas digitalmente pelo sistema de *software Gel Capture* (DNR *Bio-Imagins Systems*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação das amostras de *Streptococcus pneumoniae*

Todas as 60 amostras incluídas neste estudo tiveram a sua identificação confirmada como pertencentes à espécie *S. pneumoniae*, uma vez que, além das características coloniais e celulares e dos seus aspectos de atividade hemolítica em meio de AS, mostraram-se susceptíveis à optoquina, bile solúveis, positivas para o gene *lytA* e identificadas pela metodologia de MALDI-TOF-MS como *S. pneumoniae* (com escores confiáveis, ou seja, acima de  $\geq 2,0$ ). Na **Figura 1** constam imagens autorais representativas de alguns resultados obtidos neste trabalho.

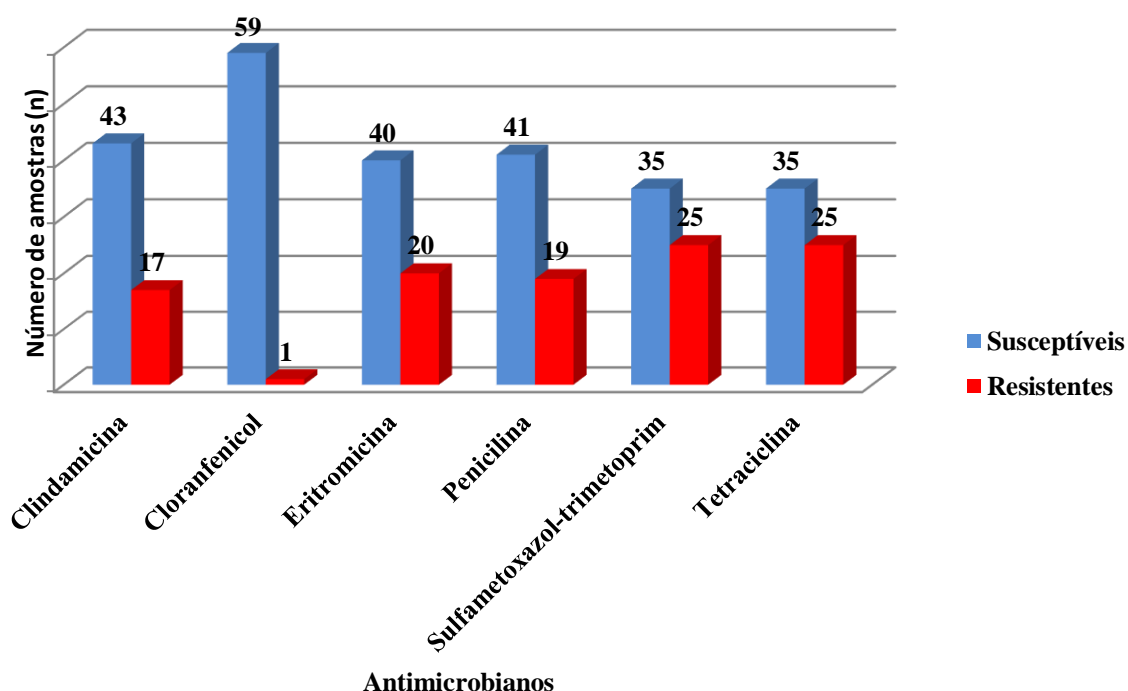


**Figura 1:** A e B, Imagens do crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em placas contendo AS para observação das características morfológicas coloniais e atividade hemolítica. C, Imagem representativa de gel de agarose após eletroforese demonstrando a presença do gene *lytA* (319pb) utilizado para confirmação da espécie *S. pneumoniae*. **Linha 1:** marcador molecular (100pb). **Linha 2:** controle +, *S. pneumoniae* ATCC 49619; **Linha 3:** controle dos reagentes (ausência de DNA); **Linhas 4 a 16:** amostras *lytA* +.

### 5.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Todas as 60 amostras incluídas no estudo foram submetidas ao teste de disco-difusão em ágar, sendo as interpretações realizadas de acordo com orientações do CLSI (2021). Um total de 19 amostras (31,7%) foi resistente à penicilina, enquanto 20 (33,3%) e 17 (28,3%)

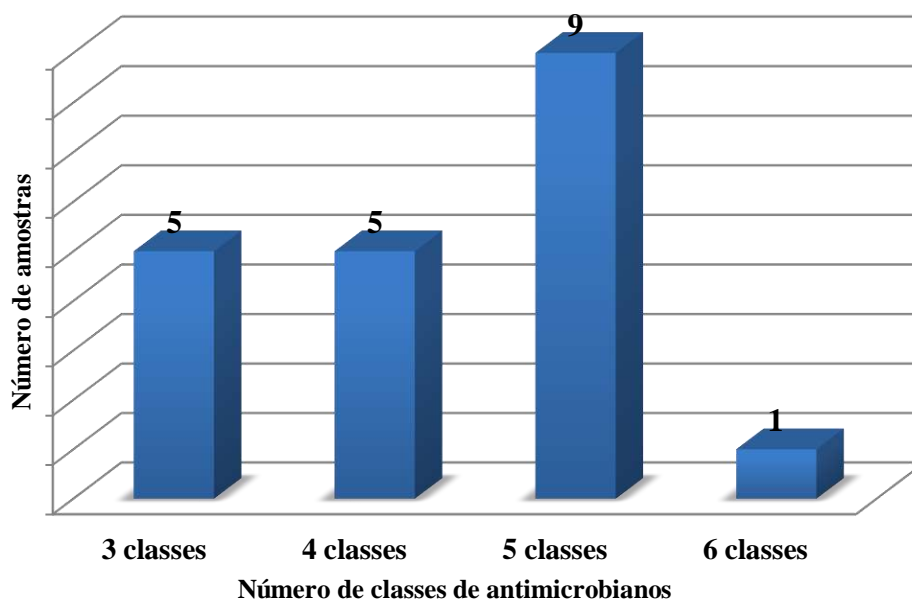
amostras foram resistentes à eritromicina e à clindamicina, respectivamente. Todas as amostras resistentes à clindamicina (n=17/28,3%) foram também resistentes à eritromicina, sendo portanto consideradas como pertencentes ao fenótipo MLS<sub>B</sub>. Outras três amostras apresentaram susceptibilidade à clindamicina aliada à resistência à eritromicina, possuindo assim, o fenótipo M. Todas as amostras se apresentaram susceptíveis à levofloxacina, à rifampicina e à vancomicina. Os resultados, representados pelo número de amostras susceptíveis e resistentes aos demais 6 antimicrobianos testados, estão ilustrados na **Figura 2**.



**Figura 2:** Susceptibilidade ao antimicrobianos entre as 60 amostras de *Streptococcus pneumoniae* estudadas

### 5.3 Perfis de multirresistência entre amostras de *Streptococcus pneumoniae*

As amostras resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos foram consideradas MDR, de acordo com critérios descritos por Siira *et al.* (2012), como observado na **Figura 3**. Neste estudo, 20 amostras (33,3%) foram classificadas como MDR. Destas, nove (45%) foram resistentes a cinco classes de antimicrobianos. Vale destacar que 16 (80%) amostras foram isoladas de infecções da corrente sanguínea. Além disso, foi possível observar que grande parte dos perfis de multirresistência das amostras (50%) englobava concomitantemente os seguintes antimicrobianos: penicilina, eritromicina, clindamicina e sulfametoxazol-trimetoprim. Estes perfis podem ser observados na **Tabela 1**.



**Figura 3.** Distribuição das amostras de *Streptococcus pneumoniae* apresentando multirresistência aos antimicrobianos, de acordo com o número de classes de antimicrobianos envolvidos.

**Tabela 1:** Perfis de resistência a antimicrobianos observados entre as 20 amostras de *Streptococcus pneumoniae* multirresistentes, de acordo com os tipos capsulares

Número de classes de antibióticos	Total das amostras	Perfis de resistência (Número de amostras)	Tipos capsulares (Número de amostras)
3	5	ERI; PEN; SXT (1) ERI; PEN; TET (1) CLI; ERI; TET (2) CLI; ERI; SXT (1)	19A (1) 19A (1) 23A, 6A/6B (1 cada) 10A (1)
4	5	CLI; ERI; PEN; TET (3) CLI; ERI; SXT; TET (1) ERI; PEN; SXT; TET (1)	23A, 6C/6D, NT (1 cada) 6A/B (1) 19A (1)
5	9	CLI; ERI; PEN; SXT; TET (9)	19A (9)
6	1	CLI; CLO; ERI; PEN; SXT; TET (1)	15B/C (1)

CLI, clindamicina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; LEV, levofloxacina; PEN, penicilina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; TET, tetraciclina. NT, amostra considerada como não tipável pela metodologia aplicada.

#### 5.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) para amostras resistentes à penicilina

Para o teste de disco-difusão, foram utilizados discos contendo oxacilina como forma de rastreamento da resistência à penicilina, conforme recomendado pelo CLSI (2021). Sendo assim, para as amostras que demonstraram o fenótipo de não susceptibilidade à penicilina, ou seja, halos inferiores a 20mm, foi realizado, posteriormente, o teste para determinação da concentração mínima inibitória por meio da técnica de difusão em gradiente (Etest<sup>®</sup>), empregando fitas contendo diferentes concentrações de penicilina. Ao todo, foram determinadas as CMIs para as 19 (31,6%) amostras de *S. pneumoniae* que evidências resistência à penicilina, de acordo como os resultados de testes de disco-difusão. Observamos que apenas duas amostras não confirmaram a classificação como resistentes, uma vez que apresentaram concentrações inferiores a 0,12µg/mL. Além disso, foi constatado que 15 (78,9%) amostras não susceptíveis à penicilina foram isoladas de sangue e os valores de CMI encontrados foram variados, inclusive duas amostras apresentaram valores considerados elevados para pneumococos (32 µg/mL) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de penicilina observadas entre as amostras de *Streptococcus pneumoniae* e sua classificação definitiva quanto a susceptibilidade à penicilina

CMI	Número de amostras	Classificação definitiva
0,047µg/mL	1	Susceptível
0,064µg/mL	1	Susceptível
0,19µg/mL	1	Resistente
0,25µg/mL	3	Resistente
2µg/mL	7	Resistente
4µg/mL	3	Resistente
16µg/mL	1	Resistente
32µg/mL	2	Resistente

#### 5.5 Presença dos genes associados à resistência aos macrolídeos e às lincosamidas

A partir do fenótipo de resistência aos macrolídeos e às lincosamidas, observado no teste de disco-difusão para 20 (33,35%) amostras, foi realizada a pesquisa dos genes (*ermA*, *ermB* e *mefA*) associados a essas resistências. O gene *ermB* foi o mais frequente, sendo

detectado em 17 (85%) das 20 amostras fenotipicamente resistentes, compreendendo 9 (45%) amostras que albergavam somente o gene *ermB* e 8 (40%) que também albergavam *mefA*. O gene *mefA* foi observado em 11 (55%) amostras, incluindo 3 (15%) que carregavam somente *mefA* e as 8 (40%) que também possuíam o gene *ermB*. Nenhuma amostra albergava o gene *ermA*.

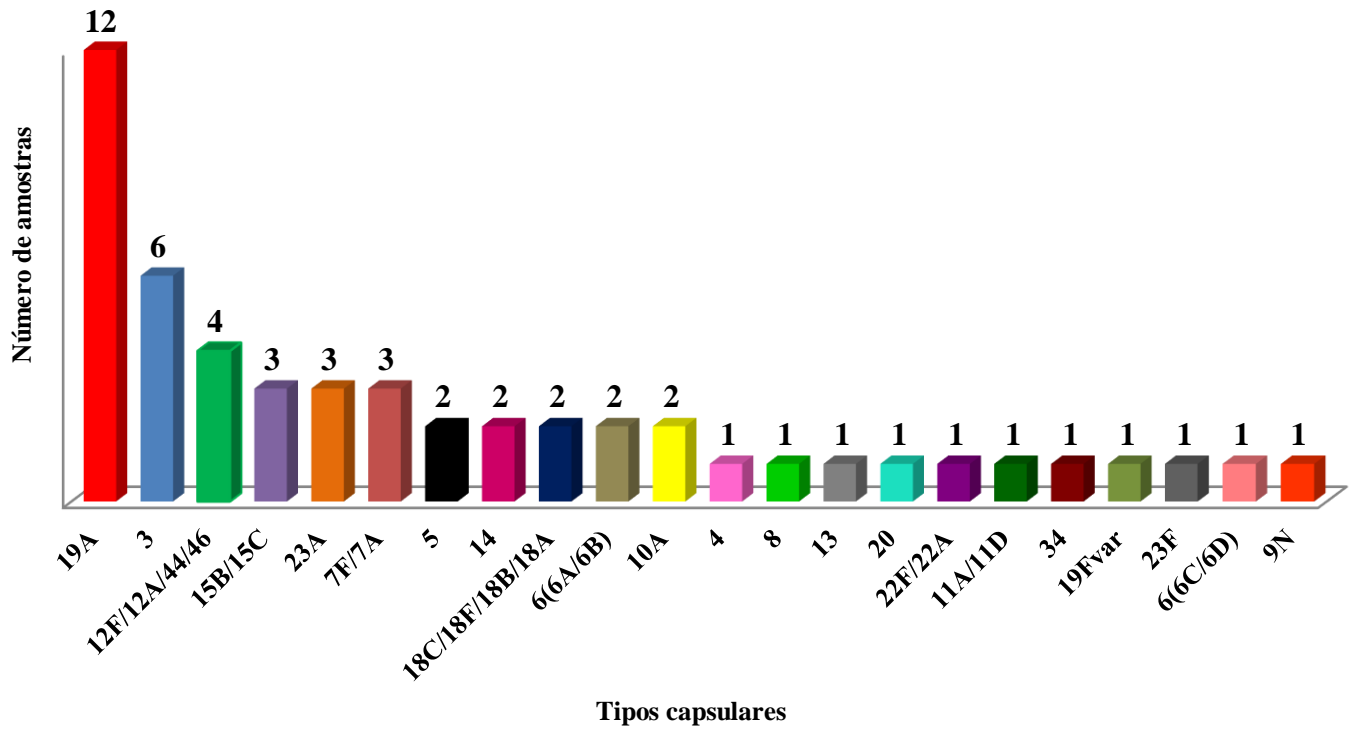
### **5.6 Presença de genes de virulência associados à produção de pili**

A presença de genes de virulência codificadores de pili (pilus tipo I e pilus tipo II), foi pesquisada nas 60 amostras incluídas no estudo. Desse total, a presença isolada ou simultânea desses dois genes foi constatada em 17 (28,35%) amostras, enquanto que nenhum dos dois genes pesquisados foi detectado em 43 (71,65%). O gene codificador de pilus I foi observado que 13 (21,6%) amostras, compreendendo 5 amostras que o albergavam isoladamente e 8 amostras que também possuíam o gene codificador de pilus II. A presença deste foi detectada em 12 (20%) amostras, englobando 4 amostras que o carregavam isoladamente e as 8 que possuíam o gene codificador de pilus I concomitantemente. As 8 (13,3%) amostras que albergavam ambos os genes simultaneamente foram isoladas de diferentes sítios clínicos, sendo sete (87,5%) delas resistentes à penicilina e seis (75%) carreadoras dos genes de resistência aos macrolídeos e lincosamidas (*ermB* e *mefA*).

### **5.7 Determinação dos tipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae***

Empregando a metodologia de PCR *multiplex*, foi possível determinar o tipo capsular de 52 (86,65%) amostras de *S. pneumoniae* incluídas no estudo. Para as demais 8 (13,35%) amostras, o sorotipo não foi identificado. Vinte e dois tipos capsulares distintos foram detectados e o mais frequentemente encontrado foi o 19A (12/20% amostras). Dentre as 12 amostras do sorotipo 19A, todas amplificaram genes de resistência aos macrolídeos, 11 (91,6%) amostras foram consideradas MDR, ou seja, apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos e a maioria (9/83,4%) possuía genes de virulência codificadores de pili. Vale destacar ainda que 6 (50%) destas amostras albergavam os genes de resistência aos macrolídeos e lincosamidas (*ermB* e *mefA*) e os genes codificadores de pilus do tipo I e II simultaneamente. Em seguida, mas em menor frequência, os tipos capsulares encontrados foram: 3 (n= 6; 10%), 12F/12A/44/46 (n=4; 6,6%), 15B/15C (n=3; 5%), 23A (n=3, 5%) e

7F/7A (n=3; 5%). Na **Figura 4** pode-se observar a distribuição e frequência (número de amostras) dos diferentes tipos capsulares.



**Figura 4.** Distribuição dos tipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* identificados por meio da metodologia de PCR multiplex

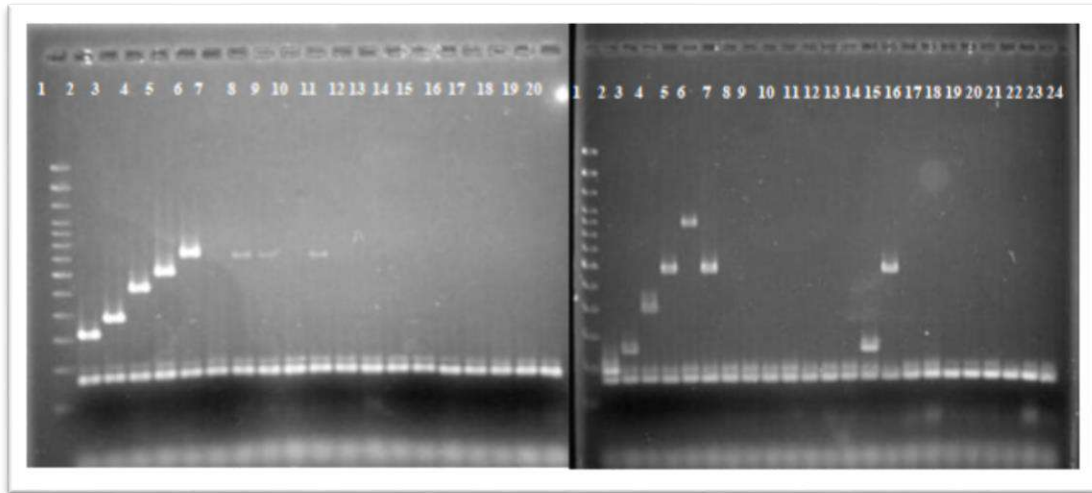
Na **Tabela 3** são listados todos os tipos capsulares encontrados neste trabalho e informações sobre a sua inclusão ou não nos esquemas de imunização disponíveis atualmente, enquanto que a **Figura 5** apresenta uma ilustração representativa de geis de agarose com resultados de testes de PCR multiplex para determinação de tipos capsulares.



**Tabela 3.** Distribuição dos sorotipos capsulares *de Streptococcus pneumoniae* encontrados neste trabalho, de acordo com os esquemas vacinais utilizados atualmente

Sorotipo	PCV10	PCV13	PCV15	PCV20
3				
4				
5				
6 (6A/6B)	6B	6A/6B	6A/6B	6A/6B
6 (6C/6D)				
7F/7A	7F	7F	7F	7F
8				
9N				
10A				
11A/11D				11A
12F/12A/44/46				12F
13				
14				
15B/15C				15B
18C/18F/18B/18A	18C	18C	18C	18C
19A				
19Fvar				
20				
22F/22A			22F	22F
23A				
23F				
34				

	Sorotipo ausente no esquema vacinal
	Sorotipo presente no esquema vacinal



**Figura 5.** Géis de agarose representativos dos resultados de ampliações de genes codificadores dos tipos capsulares de *S. pneumoniae* através da metodologia de PCR *multiplex*.

## 6. DISCUSSÃO

*Streptococcus pneumoniae*, comumente conhecido como pneumococo, é considerado um patógeno causador de infecções graves, frequentemente invasivas (pneumonia, meningite e bacteremia) e que está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade distribuídas pelo mundo. A colonização do trato respiratório superior humano por *S. pneumoniae* é vista como um pré-requisito para o desenvolvimento de doenças pneumocócicas invasivas (DPI) e crianças pequenas são consideradas seus principais reservatórios (HARBOE *et al.*, 2014; NAVNE *et al.*, 2016). No entanto, não somente as crianças desenvolvem infecções causadas por pneumococos, os indivíduos imunocomprometidos, idosos e até adultos considerados saudáveis, também podem desenvolver infecções pneumocócicas (MANYAHI *et al.*, 2020; KAIDASHEV *et al.*, 2022).

A resistência dos pneumococos aos antimicrobianos, especialmente à penicilina, tem sido motivo de alerta nos últimos anos, devido ao seu aumento progressivo. No entanto, os perfis de resistência têm diminuído em algumas regiões devido à redução de infecções invasivas causadas pelo sorotipo 19A, que é considerado um dos sorotipos mais associados à resistência aos antimicrobianos e está contemplado na formulação da PCV13. Todavia, amostras de tipos capsulares não pertencentes às formulações vacinais se mostraram menos susceptíveis não só à penicilina, mas também às cefalosporinas de terceira geração, macrolídeos, lincosamidas, fluorquinolonas e carbapenêmicos, destoando assim das características da era pré-vacinal (GAVIRIA-AGUDERO *et al.*, 2017; KAUR *et al.*, 2021).

No presente estudo, todas as amostras isoladas de pacientes com infecções causadas por *S. pneumoniae* apresentaram susceptibilidade à levofloxacina, à rifampicina e à vancomicina. Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com dados disponíveis na literatura para a susceptibilidade e eficácia no tratamento de infecções pneumocócicas com o antimicrobiano levofloxacina (PETERSON *et al.*, 2009). Em relação à rifampicina, outros estudos relataram percentuais de resistência, ainda que considerados discretos (BRETONNIÈRE *et al.*, 2015). Para a vancomicina, há relatos de percentuais baixos de tolerância, mas que são considerados preocupantes, uma vez que os glicopeptídeos representam uma valiosa opção terapêutica (SUNG *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2021).

A resistência dos pneumococos à penicilina foi primeiramente descrita em 1965 (KISLAK *et al.*, 1965). A partir de então, a resistência à penicilina tem sido relatada em diversas regiões do mundo (LATORRE *et al.*, 1985; BAQUERO *et al.*, 1995; HORTAL *et*

*al.*, 2001). Neste estudo, 31,7% das amostras de *S. pneumoniae* foram consideradas resistentes à penicilina, o que demonstra percentuais mais elevados do que aqueles observados em outros estudos realizados no Brasil. À título de exemplo, Pinto *et al.*, (2019) identificaram 20% das amostras de pneumococos resistentes à penicilina, apresentando CMIs entre 0,12 e 8 µg/mL (PINTO *et al.*, 2019). Outro estudo brasileiro realizado por Santos *et al.* (2015) também identificou um percentual de cerca de 20% das amostras de pneumococos resistentes à penicilina. Recentemente, nos Estados Unidos foi observada uma diminuição dos percentuais de resistência à penicilina de 26% para 22%, entre 2020 (PLUMB *et al.*, 2020) e 2022 (MOHANTY *et al.*, 2022), respectivamente. Em conjunto, esses dados sugerem que houve uma diminuição da incidência de amostras de pneumococos resistentes à penicilina após da introdução das PCVs. No entanto, ratificam que também houve um aumento a partir de um determinado período devido à prevalência de tipos capsulares não pertencentes ao esquema vacinal (PINTO *et al.*, 2019; PLUMB *et al.*, 2020; MOHANTY *et al.*, 2022).

No presente estudo, foi constatado que 33,3% das amostras de pneumococos foram consideradas resistentes aos macrolídeos (eritromicina). No entanto, 40% destas amostras albergavam concomitantemente os genes *ermB* e *mefA*, além de possuírem resistência à lincosamidas (clindamicina), sugerindo, assim, a possibilidade de resistência cruzada entre as classes de antimicrobianos. Um trabalho realizado na Espanha, relatou que quase 22% de suas amostras eram resistentes aos macrolídeos (CILLONIZ *et al.*, 2015). Felmingham *et al.*, (2007) demonstraram que o mecanismo de resistência aos macrolídeos mais comum, em regiões da Europa, é a presença do gene *ermB*, enquanto nos Estados Unidos e Canadá há a predominância da resistência mediada pelo gene *mefA*. No Brasil, de acordo com Mott *et al.* (2014), a resistência aos macrolídeos ocorreu em 8,2% das amostras isoladas no ano de 2014, sendo que o gene *mefA* foi o mais encontrado. Entretanto, Cardoso *et al.* (2018) relataram percentuais mais elevados (27,5%) de resistência aos macrolídeos entre amostras de *S. pneumoniae* isoladas de crianças e predominância (72,2%) do gene *ermB*.

Neste estudo, 33,3% das amostras de pneumococos foram consideradas MDR, possuindo, a maioria, não só as resistências já discutidas (à penicilina, macrolídeos e lincosamidas), mas também ao sulfametoxazol-trimetoprim (65%) e à tetraciclina (90%). Dentre as amostras MDR, 5% foram resistentes ao cloranfenicol. A resistência à tetraciclina permanece bastante frequente, e de acordo com resultados obtidos por Yamaguchi *et al.*, (2021) ela ocorre por meio da aquisição dos genes *tet*. No entanto, um estudo realizado na

Nigéria por Ousmane *et al.*, (2018) associou este perfil de resistência a outro elemento genético que não o gene *tet*. Lo e *et al.*, (2020), em contrapartida, demonstraram com dados genômicos, o declínio das infecções causadas pelo clone responsável pela disseminação da resistência à tetraciclina. Referente à resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, Cabral *et al.* (2021) relataram, em seu estudo realizado no Brasil, um percentual de 49,2% no período pré-vacinal e 29% no período pós-vacinal, havendo assim uma redução. Em relação à resistência ao cloranfenicol, um estudo realizado na Oceania revelou que metade das amostras apresentava resistência intermediária ao cloranfenicol, sugerindo que a utilização do mesmo, como terapia, seria ineficaz contra as infecções pneumocócicas (MANNING *et al.*, 2011).

Em relação aos genes de virulência codificadores de pili, o presente estudo observou percentuais de 28,35% (n=17) entre as amostras de pneumococos que apresentaram tais genes, sendo 21,6% (n=13) para pilus do tipo I e 20% (n=12) para pilus do tipo II. Além disso, 13,3% (n=8) das amostras apresentaram ambos os genes e 11,6% (n=7) foram identificadas como pertencentes ao tipo capsular predominante 19A. Um estudo realizado por Zemlickova *et al.* (2020) determinou que o principal clone circulante e responsável por infecções pneumocócicas após a introdução das vacinas, pertencia ao sorotipo 19A, carregava genes codificadores de pili e genes de resistência aos antimicrobianos. Em outro trabalho, foi também demonstrado que genes codificadores de pili, além dos perfis de multirresistência aos principais antimicrobianos, estão associados aos clones dos tipos capsulares 19A (ALEXANDROVA *et al.*, 2022). Por sua vez, Iovino *et al.* (2016), associaram a colonização por pneumococos à presença dos genes codificadores de pili. Os autores sugerem ainda que os pili foram responsáveis pelo transporte deste patógeno da corrente sanguínea até a barreira hematoencefálica, ocasionando, assim, quadros de meningite (IOVINO *et al.*, 2016). Mufida *et al.*, (2022) discutiram a possibilidade de usar a proteína formadora de pili como um componente vacinal, aumentando assim os meios existentes de imunização contra as infecções pneumocócicas (MUFIDA *et al.*, 2022).

Embora as infecções pneumocócicas ainda sejam consideradas uma questão de saúde mundial, é importante ressaltar que há métodos de prevenção. Sendo assim, aconselha-se a vacinação, que é a estratégia mais eficaz para a prevenção das doenças pneumocócicas. No Brasil, a disponibilidade das vacinas pneumocócicas conjugadas (PCVs) é gerenciada pelo Programa Nacional de Imunização (PNI) e seu uso tem reduzido a ocorrência de doenças pneumocócicas (BRANDILEONE *et al.*, 2018).

Com a introdução mundial da vacina pneumocócica 7-valente (PCV7) no esquema vacinal, os tipos capsulares responsáveis por infecções e que estão contemplados na formulação da mesma, reduziram consideravelmente. Um estudo realizado no Japão demonstrou que após crianças menores de 5 anos serem vacinadas com a PCV7, durante o período de 2010 até 2013, houve uma redução de taxas consideráveis nos casos de doenças pneumocócicas invasivas causadas pelos tipos capsulares 6B, 14, 19F e 23F (CHIBA *et al.*, 2014). No entanto, entre os casos de infecções, percebeu-se um fenômeno de substituição dos tipos capsulares não contemplados na PCV7 (15A, 15B, 15C, 19A, 22F, 24 e 35B). Como consequência, foi visto que, no Japão, ano após ano, a cobertura da PCV7 caiu drasticamente, de 73,3% em 2010 para 14,7% em 2012. Dessa forma, demonstrou-se a necessidade de desenvolver e implementar novas vacinas pneumocócicas nos esquemas de imunização, a PCV10 e posteriormente a PCV13 (CHIBA *et al.*, 2014).

No Brasil, a vacina conjugada pneumocócica 10-valente (PCV10) foi introduzida no esquema vacinal de crianças menores de 2 anos no ano de 2010. Estudos realizados após a implementação da PCV10 demonstraram a sua eficácia na redução da mortalidade por DPI, principalmente de crianças. Em Santa Catarina houve uma diminuição de 11% nos primeiros quatro anos de implementação. Além disso, foi relatada uma possível proteção imunológica contra o tipo capsular 19A, que embora não faça parte da formulação da PCV10, está relacionado ao sorotipo 19F, presente na mesma (DOMINGUES *et al.*, 2014; KUPEK *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2016). Ainda no Brasil, nos últimos anos, foi percebido aumento dos casos de infecções pneumocócicas causadas pelos tipos capsulares 3, 6A e 19A, que são cobertos apenas pela vacina pneumocócica conjugada 13-valente (PCV13), disponível somente em redes privadas de saúde. Sendo assim, outros estudos também relatam a importância da disponibilidade da PCV13 para a população geral, no entanto, alertam para uma maior incidência de infecções invasivas causadas por pneumococos de tipos capsulares não contemplados nas alternativas de imunização existentes (BRANDILEONE *et al.*, 2018; DULLIUS *et al.*, 2018; PERDRIZET *et al.*, 2020).

Nos Estados Unidos, com a adição das PCVs no esquema vacinal, também se observou redução dos percentuais, principalmente de mortalidade, relacionados às infecções invasivas causadas pneumococos. Porém, duas décadas após a utilização dos imunizantes no país, ainda há importantes relatos de infecções pneumocócicas, as quais são oriundas de tipos capsulares ainda não contemplados na formulação das vacinas disponíveis. Esses tipos capsulares têm

sido associados às doenças pneumocócicas pediátricas e adultas em diversas áreas geográficas, aumento da gravidade da doença, potencial invasivo e resistência aos antibióticos de escolhas terapêuticas. No entanto, para oferecer uma melhor e mais ampla proteção, novas PCVs estão sendo desenvolvidas e aprovadas pelos órgãos responsáveis, como é o caso da PCV15 e PCV20 (BALSELLS *et al.*, 2017; PILISHVILI *et al.*, 2020; JOON-YOUNG *et al.*, 2021; NICOLA *et al.*, 2021; KOBAYASHI *et al.*, 2022).

Levando em consideração os resultados obtidos no presente estudo, podemos observar que os mesmos estão de acordo com aqueles disponíveis na literatura em relação à incidência mais elevada de DPIs causadas por tipos capsulares de pneumococos não contemplados nas vacinas existentes ou não contemplados nas vacinas disponíveis nos sistemas de saúde pública. Neste trabalho foram identificados 13,3% (n=8) de sorotipos não contemplados nas formulações vacinais disponíveis contra doenças pneumocócicas. Em contrapartida, 20% estão presentes em todas as formulações vacinais atualmente em uso. O sorotipo 19A, o mais frequente neste estudo, corresponde a 20% das amostras e está presente apenas na formulação das vacinas pneumocócicas disponíveis nas redes de imunização privada. Estes achados sinalizam a necessidade de melhorias no esquema vacinal.

## 7. CONCLUSÃO

Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo relatando as características de amostras de pneumococos circulando durante o período da pandemia de COVID-19, no Rio de Janeiro.

Os resultados obtidos mostram que *S. pneumoniae* permaneceu um importante patógeno associado às infecções graves, em indivíduos dentro de uma ampla faixa etária.

Foram observados percentuais elevados de resistência a antimicrobianos, incluindo à penicilina, eritromicina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina.

O presente estudo contribui com dados atuais sobre a resistência a antimicrobianos e os perfis de multirresistência dos pneumococos circulantes em nossa região, assim como da presença de fatores de virulência que facilitam a colonização no hospedeiro e que podem se tornar alvos vacinais no futuro e, sobretudo, da distribuição dos tipos capsulares que foram responsáveis pelos casos de infecções pneumocócicas ocorridos no período de investigação.

Por fim, é importante destacar que os tipos capsulares mais frequentemente encontrados neste estudo não participam da formulação da vacina mais utilizada no sistema de saúde público brasileiro, ressaltando a necessidade de ajustes nas alternativas de prevenção vacinal para as doenças pneumocócicas, em nosso meio.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBOLA, R *et al.*, Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, v. 9, n. 8, Ago. 2014.

ALEXANDROVA, A *et al.*, “Association of pili with wide spread multidrug-resistant eneticline ages of non-invasive pediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates.” **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. 2022.

ALTUN, H. U. *et al.*, Invasive pneumococci before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in turkey: Antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and molecular identification of macrolide resistance. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 2, p. 73–79, Fev. 2015.

AMIN-CHOWDHURY, Z. *et al.*, Impact of the COVID-19 Pandemic on Invasive Pneumococcal Disease and Risk of Pneumococcal Coinfection with SARS-CoV-2: prospective national cohort study, England. **Clinical Infectious iseases**, v. 72, n. 5, Mar. 2020.

BALSELLS, E. *et al.*, Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, Mai. 2017.

BAQUERO, F. Pneumococcal Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics: A Global Geographic Overview. **Microbial Drug Resistance**, v. 1, n. 2, p. 115-20. 1995.

BERTRAN, Marta *et al.* “Increased Incidence of Invasive Pneumococcal Disease among Children after COVID-19 Pandemic, England.” **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 8, p. 1669-1672, Ago. 2022.

BRADLEY, J. S. *et al.*, The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the pediatric infectious diseases society and the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 7, Out. 2011.

BRANDILEONE, M. C. C. *et al.* Increase in numbers of  $\beta$ -lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 567–574, Mai. 2006.

BRANDILEONE, M. C. DE C. *et al.* Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among children in São Paulo, Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 46, p. 5604–5611, Nov. 2016.

BRANDILEONE, M. C. C. *et al.* Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**, v. 36, n. 19, p. 2559–2566, Mai, 2018.

BRETONNIÈRE, C. *et al.*, Rifampin use in acute community-acquired meningitis in intensive care units: The French retrospective cohort ACAM-ICU study. **Critical Care**, v. 19, n. 1, Ago. 2015.

BROOKS, L. R. K.; MIAS, G. I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., Jun. 2018.

BURGHOUT, P. *et al.*, Carbonic anhydrase is essential for *Streptococcus pneumoniae* growth in environmental ambient air. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 15, p. 4054–4062, Ago. 2010.

CABRAL, A *et al.*, “Resistência a antimicrobianos em *Streptococcus pneumoniae* nos períodos pré e pós-introdução das vacinas conjugadas no Brasil: Uma revisão de literatura.” Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2021.

CARDOSO, N., “Impacto das vacinais pneumocócicas conjugadas na colonização por *Streptococcus pneumoniae* em crianças e adultos assistidos em instituições de saúde em Niterói/RJ”. **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas**. Instituto Biomédico (UFF). 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, “Pneumococcal Disease”. <https://www.cdc.gov/pneumococcal/index.htm>. 2022.

CHERAZARD, R. *et al.*, Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. **American journal of therapeutics**, v. 24, n. 3, Mai, 2017.

CHIBA, N. *et al.*, Changes in capsule and drug resistance of pneumococci after introduction of PCV7, Japan, 2010-2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1132–1139, Jul. 2014.

CHOI, Y. H.; MILLER, E. Impact of COVID-19 social distancing measures on future incidence of invasive pneumococcal disease in England and Wales: A mathematical modelling study. **BMJ Open**, v. 11, n. 9, 28 Set. 2021.

CILLONIZ, C. *et al.*, The effect of macrolide resistance on the presentation and outcome of patients hospitalized for *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 11, p. 1265–1272, Jun. 2015.

CILLÓNIZ, C.; AMARO, R.; TORRES, A. Pneumococcal vaccination. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p.187-916, Abr. 2016.

CRAIN, M. J. *et al.*, Pneumococcal Surface Protein A (PspA) Is Serologically Highly Variable and Is Expressed by All Clinically Important Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 58, n. 10, p.3293-3299, Out. 1990.

CRONEY, C. M. *et al.*, PspA family distribution, unlike capsular serotype, remains unaltered following introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 891–896, Jun. 2012.

DAVIDSON, M. *et al.*, The epidemiology of invasive pneumococcal disease in Alaska, 1986-1990—ethnic differences and opportunities for prevention. **The Journal of Infectious Diseases**, v.170, n.2, p.368-376, Ago. 1994.

DOMINGUES, C. M. A. S. *et al.*, Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: A matched case-control study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 2, n. 6, p. 464–471, Jun. 2014.

DOS SANTOS, M. S. *et al.*, Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 30 Jul. 2015.

DULLIUS, C. R.; ZANI, L.; CHATKIN, J. M. Theoretical pneumococcal vaccine coverage: Analysis of serotypes isolated from inpatients at a tertiary care hospital. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 5, p. 361-366, 1 Set. 2018.

DUNAIS, B. *et al.*, Influence of child care on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **Pediatric infectious disease journal**. 2003. v. 22, n.7, p. 589-592, Jul. 2003.

FEDSON, DS, MUSHER, DM and ESKOLA, J., “Pneumococcal vaccine In Plotkin SA, Ordenstein WA”. **Vaccines**. 3rd Ed. 1998.

FELMINGHAM, D.; CANTÓN, R.; JENKINS, S. G. Regional trends in  $\beta$ -lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. **Journal of Infection**, v. 55, n. 2, p. 111–118, Ago. 2007.

FREIRES, M. S. .; RODRIGUES JUNIOR, O. M. . Bacterial resistance to indiscriminate use of azithromycin versus Covid-19: an integrative review . **Research, Society and Development**. Jul. 2023.

GAVIRIA-AGUDELO, C. L. *et al.*, The effect of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on the serotype distribution and antibiotic resistance profiles in children with invasive pneumococcal disease. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. 253–259, Set. 2017.

GORBALENYA, A. E. *et al.*, The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v.5, n.4, p.536-544, Abr. 2020.

GRALINSKI, L. E.; MENACHERY, V. D. **Return of the coronavirus: 2019-nCoV**. **Viruses**, v.24, n.12, p.135, Jan. 2020.

GRAY, B. M.; III, G. M. C.; DILLON, H. C. Epidemiologic Studies of *Streptococcus pneumoniae* in Infants: Acquisition, Carriage, and Infection during the First 24 Months of Life. **Journal of Infectious Diseases**, v.142, n.6, p. 923-33, Dez. 1980.

GRAY *et al.*, “Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants. The effects of season and age on pneumococcal acquisition and carriage in the first 24 months of life.” **American journal of epidemiology**, v. 116, n.4, p.692-703, Out. 1982.

HACKEL, M. *et al.*, Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. **Vaccine**, v. 31, n. 42, p. 4881–4887, Out. 2013.

HARBOE, Z. B. *et al.*, Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in invasive pneumococcal disease incidence and mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 8, p. 1066–1073, Out. 2014.

HAVA, D. L.; HEMSLEY, C. J.; CAMILLI, A. Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae* rlrA pathogenicity islet by RlrA. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 2, p. 413–421, Jan. 2003.

HÖGBERG, L. *et al.*, Age- and serogroup-related differences in observed durations of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant pneumococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 948–952, Mar. 2007.

HORTAL, M. *et al.*, Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Six Latin American Countries: 1993-1999 Surveillance. **Microbial Drug Resistance**.2001.

HUANG, C. *et al.*, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, Fev. 2020.

HUANG, S. S. *et al.*, Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. **Vaccine**, v. 29, n. 18, p. 3398–3412, Abr. 2011.

IMAI, K. *et al.* Rapid and Accurate Species Identification of Mitis Group Streptococci Using the MinION Nanopore Sequencer. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n.11, Jan. 2020.

IOVINO, F. Pneumococcal meningitis is promoted by single cocci expressing pilus adhesin RrgA. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 8, p. 2821-6, Ago. 2016.

JANSSENS, E *et al.*, “The 20-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV20): expected added value.” **Acta clinica Belgica** v. 78, n.1, p.78-86, Feb. 2023.

JAROVSKY, D and BEREZIN, E., “Impact of PCV10 on pediatric pneumococcal disease burden in Brazil: time for new recommendations?.” **Jornal de Pediatria**, v.99, Mar-Abr. 2023.

JEDRZEJAS, M. J. Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 21, p.2799-822, Nov. 2007.

KADIOGLU, A. *et al.*, .Host Cellular Immune Response to Pneumococcal Lung Infection in Mice. **Infection and Immunity**. v.68, n. 2, p. 492-501, Fev. 2000.

KAIDASHEV, I. *et al.*, Etiology and efficacy of anti-microbial treatment for community-acquired pneumonia in adults requiring hospital admission in Ukraine. **Acta Biomedica**, v. 93, n. 2, p. e2022238, Mai. 2022.

KÄRPÄNOJA, P. *et al.*, Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2480–2485, Jul. 2008.

KAUR, R. *et al.*, Rising Pneumococcal Antibiotic Resistance in the Post 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Era in Pediatric Isolates from a Primary Care Setting. **Clin Infect Dis**, v.72, n.5, p. 797-805, Mar. 2021.

KILIAN, M.; TETTELIN, H. Identification of virulence-associated properties by comparative genome analysis of *Streptococcus pneumoniae*, *S. Pseudopneumoniae*, *S. mitis*, three *S. oralis* subspecies, and *S. infantis*. **mBio**, v. 10, n. 5, p. e01985-19, Set. 2019.

KIM, L. *et al.*, Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: A United States perspective. Clinical Microbiology Reviews. **American Society for Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 525-52, Jul. 2016.

KISLAK, JW *et al.*, “Suscetibilidade de Pneumococos a Nove Antibióticos.” **American Journal of Medical Sciences**. vol 250. 1965.

KLEIN, N. P. *et al.*, A phase 3, randomized, double-blind study to evaluate the immunogenicity and safety of 3 lots of 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults 18 through 49 years of age. **Vaccine**, v. 39, n. 38, p. 5428–5435, Set. 2021.

KOBAYASHI, M. *et al.*, Morbidity and Mortality Weekly Report Use of 15-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 20-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Among

U.S. Adults: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2022.

KUPEK, E.; VIEIRA, I. L. V. O impacto da vacina pneumocócica PCV10 na redução da mortalidade por pneumonia em crianças menores de um ano em Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 32, n. 3, Mar. 2016.

LOPEZ, R. *et al.*, Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage. **FEMS Microbiology Letters**. v.100, n. 1-3, p. 439-47, Dez. 1992.

LANGFORD, B. J. *et al.*, Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 27, n. 4, p. 520-531, Abr. 2021.

LAURENCEAU, R. *et al.*, A Type IV Pilus Mediates DNA Binding during Natural Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003473, Jun. 2013.

LEE, G. M. *et al.*, Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on *Streptococcus pneumoniae* carriage in young children in Massachusetts. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 1, p. 23–32, Mar. 2014.

LEITE, C. R. *et al.*, Clinical and bacteriological characteristics of invasive pneumococcal disease after pneumococcal 10-valent conjugate vaccine implementation in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 56–60, Jan. 2016.

LEWNARD, Joseph *et al.* “Prevention of Coronavirus Disease 2019 Among Older Adults Receiving Pneumococcal Conjugate Vaccine Suggests Interactions Between *Streptococcus pneumoniae* and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in the Respiratory Tract.” **The Journal of infectious diseases**. v. 225, n. 10, p. 1710-1720, Mai. 2022.

LIÑARES, J *et al.*, “Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period.” **Clinical Microbiology and Infection**. v.16, n. 5, p. 402-10, Mai. 2010.

- LO, S. W. *et al.*, A mosaic tetracycline resistance gene *tet(S/M)* detected in an MDR pneumococcal CC230 lineage that underwent capsular switching in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 512–520, Mar. 2020.
- LUND, E.; HENRICHSEN, J. CHAPTER X I Laboratory Diagnosis, Serology and Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. Copenhagen, Denmark. **Methods in Microbiology**. 1978.
- LUNDBO, L. F.; BENFIELD, T. Risk factors for community-acquired bacterial meningitis. **Infectious Diseases**. v. 49, n. 6, p. 433-444, Jun. 2017.
- MANDELL, L. A. *et al.*, American Thoracic Society Consensus Guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. **Clinical Infectious Diseases**. 1 Mar, 2007.
- MANNING, L. *et al.*, Increasing chloramphenicol resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Papua New Guinean Children with acute bacterial meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4454–4456, Set. 2011.
- MANYAHI, J. *et al.*, High rate of antimicrobial resistance and multiple mutations in the dihydrofolate reductase gene among *Streptococcus pneumoniae* isolated from HIV-infected adults in a community setting in Tanzania. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 749–753, Set. 2020.
- MARAKI, S. *et al.*, The evolving epidemiology of serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from adults in Crete, Greece, 2009–2016. **Infection and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 328–339, Dez. 2018.
- MARRAFFINI, L. A.; DEDENT, A. C.; SCHNEEWIND, O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 1, p. 192–221, Mar. 2006.
- MCDANIEL, L. S. *et al.*, “Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA).” **The Journal of Experimental Medicine**. v.165, n. 2, p. 381-94, Fev. 1987.



- MELEGARO, A.; GAY, N. J.; MEDLEY, G. F. Estimating the transmission parameters of pneumococcal carriage in households. **Epidemiology and Infection**, v. 132, n. 3, p. 433–441, Jun. 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, “Informe técnico da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada). **Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis**. Brasília. 2010.
- MITCHELL, T. J.; DALZIEL, C. E. The biology of pneumolysin. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 80, p. 145–160, Jan. 2014.
- MITSI, Elena *et al.* “Streptococcus pneumoniae colonization associates with impaired adaptive immune responses against SARS-CoV-2.” **The Journal of clinical investigation**. v. 132, n. 7, p. e157124, Abr. 2022.
- MOHANTY, S. *et al.*, A Multicenter Evaluation of Trends in Antimicrobial Resistance Among *Streptococcus pneumoniae* Isolates From Adults in the United States. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. ofac420, Set. 2022.
- MOTT, M. *et al.*, Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 47–51, Mar. 2014.
- MUFIDA, D *et al.*, “Characterization of Pili Protein 67 kDa *Streptococcus pneumoniae*: New Candidate for Virulence Factor-Based Pneumococcal Antigen Vaccine.” **Protein and peptide letters**. v. 29, n. 8, p. 702-710, Ago. 2022.
- MUNDY, L. S. *et al.*, “Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe tests.” **American journal of clinical pathology**. v. 109, n. 1, p. 55-61, Jan. 1998.
- MURRAY, P; ROSENTHAL, K; PFALLER, M. **Microbiologia Médica**. 7ª edição. Elsevier. 2014.
- MURRAY, P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1626–1630, Nov. 2010.
- MUSCHIOL, S. *et al.*, Gram-Positive Type IV Pili and Competence . **Microbiology Spectrum**. v.7, n. 1, Fev. 2019.

MUSHER, D and RODRIGUEZ-BARRADAS, M., “Pneumococcal vaccination in adults”. **Wolters Kluwer**. 2022.

NAVNE, J. E. *et al.*, Nasopharyngeal bacterial carriage in young children in Greenland: A population at high risk of respiratory infections. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 15, p. 3226–3236, Nov. 2016.

NELSON, A. L. *et al.*, RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 329–340, Out. 2007.

NEVES, F. P. G. *et al.*, Direct effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine use on pneumococcal colonization among children in Brazil. **Vaccine**, v. 37, n. 36, p. 5265–5269, Ago. 2019.

OUSMANE, S.; DIALLO, B. A.; OUEDRAOGO, R. Genetic determinants of tetracycline resistance in clinical *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates from niger. **Antibiotics**, v. 7, n. 1, Mar. 2018.

PARK, S. S.; LEE, S.; RHEE, D. K. Crystal structure of the pneumococcal vancomycin-resistance response regulator dna-binding domain. **Molecules and Cells**, v. 44, n. 3, p. 179–185, Mar. 2021.

PERDRIZET, J. *et al.* Cost-effectiveness analysis of replacing the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in Brazil infants. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 17, n. 4, p. 1162–1172, Abr. 2021.

PETERSON, J.; YEKTASHENAS, B.; FISHER, A. C. Levofloxacin for the treatment of pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* including multidrug-resistant strains: Pooled analysis. **Current Medical Research and Opinion**, v. 25, n. 3, p. 559–568, Mar. 2009.

PILISHVILI, T.; BENNETT, N. M. Pneumococcal disease prevention among adults: Strategies for the use of pneumococcal vaccines. **Vaccine**. v. 27, n. 33, Nov. 2015.

PILISHVILI, T *et al.*, “Epidemiologia da Doença Pneumocócica Invasiva (IPD) Após 18 anos de Uso da Vacina Pneumocócica Conjugada (PCV) nos Estados Unidos”. **Fórum Aberto de Doenças Infecciosas**. 2020.

PINTO, T. C. A. *et al.*, Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3242–3249, Out. 2013.

PINTO, T. C. A. *et al.*, Evolution of penicillin non-susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered from asymptomatic carriage and invasive disease over 25 years in Brazil, 1990–2014. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, Mar. 2019.

PLUMB, I. D. *et al.*, Increasing non-susceptibility to antibiotics within carried pneumococcal serotypes -Alaska, 2008–2015. **Vaccine**, v. 38, n. 27, p. 4273–4280, Jun. 2020.

POPOVIC, S. *et al.*, Characterization of macrolide-resistant non-invasive pneumococci in the pre-vaccine era in Serbia. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 65, n. 4, p. 477–488, Dez. 2018.

REN, B. *et al.*, Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 114–122, Jan. 2004.

SADOWY, E. *et al.*, Relationships among streptococci from the mitis group, misidentified as *Streptococcus pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1865–1878, Out. 2020.

SANTOS *et al.*, Caracterização das estirpes de *Streptococcus pneumoniae* responsáveis por infecção não invasiva no adulto entre 2016 e 2018. **Universidade de Lisboa**. 2022.

SATZKE, C. *et al.*, Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: Updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. **Vaccine**, v. 32, n. 1, p. 165–179, Dez. 2013.

SCHROEDER, M. R.; STEPHENS, D. S. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 21 Set. 2016.

SEMPERE, J. *et al.*, Effect of pneumococcal conjugate vaccines and SARS-CoV-2 on antimicrobial resistance and the emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes with reduced susceptibility in Spain, 2004–20: a national surveillance study. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 10, p. e744–e752, 1 Out. 2022.

SHIRLEY, M. 20-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine: A Review of Its Use in Adults. **Adis Drugs Evaluation**. v. 82, n. 9, p. 989–999, Jun. 2022.

SIIRA, L *et al.*, “Clonality behind the increase of multidrug-resistance among non-invasive pneumococci in Southern Finland.” **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**: official publication of the European Society of Clinical Microbiology vol. 31,5. 2012.

SMITH, T. *et al.*, Acquisition and invasiveness of different serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in young children. **Epidemiology and infection**. v. 111, n.1, p. 27-39, Ago. 1993.

SMITH-VAUGHAN, H. *et al.*, Age-specific cluster of cases of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* carriage in remote indigenous communities in Australia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 2, p. 218–221, Fev. 2009.

SPELLERBERG, B., and BRANDT, C. (2019). “*Streptococcus*,” in **Manual of Clinical Microbiology**, eds J. Versalovic, K. Carroll, G. Funke, J. Jorgensen, M. Landry, and D. Warnock (Washington, DC: ASM Press), 331–349.

SPÍŽEK, J.; ŘEZANKA, T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. **Biochemical Pharmacology**. v. 133, p. 20-28, Jun. 2017.

SUNG, H. *et al.*, Vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3524–3528, Out. 2006.

TELES, C. *et al.*, Identification of clinically relevant viridans group streptococci by phenotypic and genotypic analysis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 2, p. 243–250, Fev. 2011.

TOMASZ, A *et al.*, “Building and breaking of bonds in the cell wall of bacteria—the role for autolysin.” **Elsevier Science Publishers**. 1984.

TRABULSI, L; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª edição. São Paulo, Brasil. Atheneu. 2015.

TUOMANEN, E. *et al.*, The Induction of Meningeal Inflammation by Components of the Pneumococcal Cell Wall. **The Journal of infectious diseases**. v.151, n.5, p. 859-68, Mai. 1985.

WYLLIE, A. L. *et al.*, Molecular surveillance of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children vaccinated with conjugated polysaccharide pneumococcal vaccines. **Scientific Reports**, v. 6, n. 5, Abr. 2016.

YAMAGUCHI, M *et al.*, “Análise epidemiológica de cepas pneumocócicas isoladas no Hospital Infantil de Yangon, em Mianmar, por meio de métodos baseados em sequenciamento de genoma completo. **Genoma de micróbios**. 2021.

ZEMLICKOVA, H. *et al.*, The association of pili with the emergence and replacement of the major antibiotic resistant pneumococcal clones. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 5, p. 690–695, 1 Out. 2020.

**ANEXO A** - Informações sobre as amostras de *Streptococcus pneumoniae* incluídas no presente estudo.

<b>Amostras</b>	<b>Idade do paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Origem</b>	<b>Material clínico</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Tipo capsular</b>
Sp2554	82	M	DASA	Sangue	2021	19A
Sp2555	39	F	DASA	Sangue	2021	23A
Sp2556	49	M	DASA	Sangue	2021	7F/7A
Sp2557	40	F	HU-UFRJ	Secreção de ouvido	2021	19A
Sp2559	67	F	DASA	Sangue	2021	18C/18F/18B/18A
Sp2560	45	M	DASA	Sangue	2021	12F/12A/44/46
Sp2561	89	F	DASA	Sangue	2021	Não tipado
Sp2562	29	F	HU-UFRJ	Sangue	2021	19A
Sp2563	72	M	HU-UFRJ	Sangue	2021	Não tipado
Sp2564	67	F	HU-UFRJ	Sangue	2021	6(6C/6D)
Sp2568	59	F	HU-UFRJ	Líquido ascítico	2021	3
Sp2570	22	F	DASA	Sangue	2021	19Fvar
Sp2572	59	M	HU-UFRJ	Sangue	2021	Não tipado
Sp2573	102	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2021	Não tipado
Sp2574	70	F	HU-UFRJ	Sangue	2021	20

**ANEXO A** - Continuação.

<b>Amostras</b>	<b>Idade do paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Origem</b>	<b>Material clínico</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Tipo capsular</b>
Sp2575	90	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2021	23A
Sp2576	82	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2021	23A
Sp2577	93	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2021	3
Sp2578	43	F	HU-UFRJ	Sangue	2021	10A
Sp2579	35	M	HU-UFRJ	Sangue	2021	9N
Sp2580	53	M	HU-UFRJ	Sangue	2021	3
Sp2581	62	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2021	10A
Sp2582	89	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2021	19A
Sp2583	38	M	HU-UFRJ	Sangue	2021	Não tipado
Sp2585	24	F	HU-UFRJ	Sangue	2021	Não tipado
Sp2586	64	M	HU-UFRJ	Sangue	2021	15B/15C
Sp2588	56	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2021	Não tipado
Sp2590	62	F	HU-UFRJ	Sangue	2021	3
Sp2591	48	M	HU-UFRJ	Sangue	2021	Não tipado
Sp2592	Não informado	F	Richet	Secreção de ombro	2022	12F/12A/44/46
Sp2593	Não informado	F	Richet	Swab de ombro	2022	12F/12A/44/46
Sp2594	65	M	INCA	Sangue	2022	13
Sp2595	64	F	HU-UFRJ	Sangue	2022	8
Sp2596	79	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Aspirado traqueal	2022	18C/18F/18B/18A
Sp2597	6	M	INCA	Sangue	2022	19A
Sp2598	87	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	23F
Sp2599	68	F	HU-UFRJ	Sangue	2022	15B/15C

**ANEXO A** - Continuação.

<b>Amostras</b>	<b>Idade do paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Origem</b>	<b>Material clínico</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Tipo capsular</b>
Sp2601	Não informado	Não informado	Richet	Sangue	2022	12F/12A/44/46
Sp2602	Não informado	M	Richet	Secreção de abscesso anorretal	2022	3
Sp2603	2	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Líquido pleural	2022	19A
Sp2604	39	F	HU-UFRJ	Sangue	2022	19A
Sp2605	20 dias (0,08 anos)	Não informado	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	19A
Sp2606	Não informado	M	Richet	Sangue	2022	5
Sp2607	Não informado	M	DASA	Líquido pleural	2022	19A
Sp2608	70	M	HU-UFRJ	Sangue	2022	5
Sp2609	Não informado	F	Richet	Sangue	2022	6(6A/6B)
Sp2610	2	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Líquido pleural	2022	19A
Sp2611	85	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	7F/7A
Sp2612	39	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	7F/7A
Sp2613	87	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	15B/15C
Sp2614	Não informado	M	Richet	Sangue	2022	14
Sp2615	Não informado	F	Richet	Sangue	2022	14
Sp2616	80	M	HU-UFRJ	Sangue	2022	3
Sp2617	90	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	19A
Sp2618	66	M	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	19A



**ANEXO A - Continuação.**

<b>Amostras</b>	<b>Idade do paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Origem</b>	<b>Material clínico</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Tipo capsular</b>
Sp2619	95	F	Lab. Coutinho e Pinheiro	Sangue	2022	22F/22A
Sp2620	Não informado	M	Richet	Sangue	2022	6(6A/6B)
Sp2622	Não informado	F	Richet	Sangue	2022	4
Sp2623	Não informado	M	Richet	Sangue	2022	11A/11D
Sp2624	74	F	INCA	Sangue	2022	34

**ANEXO B - Relação das sequências iniciadoras utilizadas nos testes baseados em PCR.**

Reação	Gene alvo	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto <sup>a</sup>	Referência	
Produção de autolisina	<i>lytA</i>	CAACCGTACAGAATGAAGCGG TTATTCGTGCAATACTCGTGCG	319	Andrade <i>et al.</i> ,(2010)	
Macrolídeos e lincosamidas	<i>ermA</i>	GCATGACATAAACCTTCAAGG TTATAATGAAACAGA	206	Seppala <i>et al.</i> ,(1998)	
	<i>ermB</i>	GAAAAGGTAAGTCAACCAAATAAGTAACGGTACTTAAATT GTTTAC	639	Sutcliffe, Tait-KamradteWond rack,(1996)	
	<i>mefA</i>	AGTATCATTAACTACTAGTGCTT CTTCTGGTACTAAAAGTGG	348		
Pilus tipo I(PI-1)	<i>rrgC</i>	GCTCTGTGTTTTCTCTTGTATGGATCAATCCGTGGTGCCT TGTTATTTTA	1056	Regev-Yochay <i>et al.</i> , (2010)	
pilus tipo II(PI-2)	<i>sipA</i>	CTCTAGGAGGGATCTTCTTTATCATCTACAGCCGTGTTC GATTGTCC	507	Zähler, Gudlavalletie Stephens,(2010)	
Cápsula polissacarídica	<i>wzG</i>	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACCGAATATTTTCATT ATCAGTCCCAGTC	160	Paietal., (2006)	
Primeira reação de tipagem molecular	14	<i>wzy</i>	GAAATGTTACTTGGCGCAGGTGTCAGAATTGCCAATACTTC TTAGTCTCTCAGATGAAT	189	Dias <i>et al.</i> ,(2007)
	6A/6B/ 6C/6D	<i>weiP</i>	AATTTGATTTTATTCATGCCTATATCTGG TTAGCGGAGATAAATTTAAAATGATGACTA	250	Paietal., (2006)
	23F	<i>wzy</i>	GTAACAGTTGCTGTAGAGGGAATTGGCTTTTCCACAACA CCTAACACTCGATGGCTATATGATTC	384	
	19A	<i>wzy</i>	GAGAGATTCATAATCTTGCACTTAGCCACATAATAGCTAC AAATGACTCATCGCC	566	Pimenta <i>et al.</i> ,(2009)
	9V/9A	<i>wzy</i>	GGGTTCAAAGTCAGACAGTGAATCTTAACCATGAATGAA ATCAACATTGTCAGTAGC	816	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)
Segunda reação de tipagem molecular	19F	<i>wzy</i>	GTTAAGATTGCTGATCGATTAAATGATATCCGTAATATGT CTTTAGGGCGTTTATGGCGATAG	304	Paietal., (2006)
	3	<i>galU</i>	ATGGTGTGATTTCTCTAGATTGGAAAAGTAGC TTCTCCAATTGCTTACCAAGTGCAATAACG	371	
	15B/15C	<i>wzy</i>	TTGGAATTTTTAATTAGTGGCTTACCTACATCCGCTTAT TAATTGAAGTAATCTGAACC	496	
	18C/18F/1 8B/18A	<i>wzy</i>	CTTAATAGCTCTCATTATTCTTTTTTAAAGCC TTATCTGTAAACCATATCAGCATCTGAAAC	693	
	17F	<i>weiP</i>	TTCGTGATGATAAATCCAATGATCAAACAAGAGGATGTAA CAAATTTGTAGCGACTAAGGTCTGC	693	
Terceira reação de tipagem molecular	1	<i>wzy</i>	CTCTATAGAATGGAGTATATAAACTATGGTTACCAAAGA AAATACTAACATTATCACAATATTGGC	280	Paietal., (2006)
	5	<i>wzy</i>	ATACCTACACAACCTTCTGATTATGCCTTTGTGGCTCGATA AACATAATCAATATTGAAAAAGTATG	362	
	9N/9L	<i>wzy</i>	GAACTGAATAAGTCAGATTTAATCAGCACCAAGATCTGA CGGGCTAATCAAT	516	Dias <i>et al.</i> ,(2007)
	7F/7A	<i>wzy</i>	TCCAACTATTACAGTGGGAATTACGGATAGGAATTGAGA TTGCCAAAGCGAC	201	Carvalho <i>et al.</i> ,2010
	16F	<i>wzy</i>	GAATTTTTCAGGCGTGGGTGTTAAAAGCAGCATATAGCAC CGTAAGCAAATA	717	

ANEXO B - Continuação.

Reação		Gene alvo	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto <sup>a</sup>	Referência
Quarta reação de tipagem molecular	8	wzy	GAAGAAACGAAACTGTCAGAGCATTACATCTATAGAT ACTAGTAGAGCTGTTCTAGTCT	201	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)
	2	wzy	TATCCCAGTTCAATATTTCTCCACTACACCACACAAAA TATAGGCAGAGAGAGACTACT	290	
	4	wzy	CTGTACTTGTCTGGACTCTCGATAAATTGGGCCCACTC CTGTAAAATCTACCCGCATTG	430	Paietal., (2006)
	20	weiL	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA GCTAAATTCCTGT AAT TTAGCT AAAACT CTTATC	514	
	22F/22A	wewV	GAGTATAGCCAGATTATGGCAGTTTTATTGTCCTCCAG CACTTGCCTGGAAACAACAGACAAC	643	
Quinta reação de tipagem molecular	7C/7B/40	wewL	CTATCTCAGTCATCTATTGTTAAAGTTTACGACGGGAGA ACATAGATGTTGAGACATCTTTGTAATTTT	260	Paietal.,(2006)
	12F/12A/ 44/46	wzx	GCAACAAACGGCGTGAAAGTAGTTGCAAGATGAATAT CACTACCAATAACAAAAAC	376	
	11A/11D	wzy	GGACATGTTCAAGTGTATTCCCAATATAGTGGATTATG AGTGTAATTTATTCCAATTCTCCC	463	
	10A	werR	GGTGTAGATTTACCATTAGTGTCCGGCAG ACGAATTTCTTCTTAAAGATTCGGATATTT CTC	628	
	23A	wzy	TATTCTAGCAAGTGACGAAGATGCGCCAACATGCTTAA AAACGCTGCTTTAC	722	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)
Sexta reação de tipagem molecular	21	wzx	CTATGGTTATTTCAACTCAATCGTCACCGGCAAACTCAGA CATAGTATAGCATAG	192	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)
	33F/33A/ 37	wzy	GAAGGCAATCAATGTGATTGTGTCGCGCTTCAAAATGA AGATTATAGTACCCCTTCTAC	338	Paietal.,(2006)
	15A/15F	wzy	ATTAGTACAGCTGCTGGAATATCTCTTCGATCTAGTGAA CGTACTATTCCAAAC	434	
	35F/47F	wzy	GAACATAGTCGCTATTGTATTTTATTTAAAGCAAGACTA GGAGCATTATTCTAGAGCGAGTAAACC	517	
	13	wzx	TACTAAGGTAATCTCTGGAATCGAAAGGCTCATGCATT TTATTAACCGCTTTTGTTC	655	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)
Sétima reação de tipagem molecular	39	wzy	TCATTGTATTAACCCTATGCTTTATTGGTGGAGTATCTC CATTGTATTGAAATCTACCAA	98	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)
	23B	wzx	CCACAATTAGCGCTATATTCATTCAATCGGTCCACGCTG AATAAAATGAAGCTCCG	199	
	35A/35C/ 42	wzx	CGTCTTTTATCTCACTGTATAGTATCTTTATGATGTTG AATTAAGCTAACGTAACAATCC	280	Paietal.,(2006)
	38/25F/ 25A	wzy	CGTCTTTTATCTCACTGTATAGTATCTTTATGATGTTG AATTAAGCTAACGTAACAATCC	574	
	35B	werH	GATAAGTCTGTTGTGGAGACTTAAAAAGAATGCTTTCC AGATAATTACAGGTATCTCTGAAGCAAG	677	

**ANEXO B - Continuação.**

Oitava reação de tipagem molecular	24F/24/2 4B	wzy	GCTCCCTGCTATTGTAATCTTAAAGAGGTGCTTTTATT GACTTTATCATAGGTCGG	99	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)
	10F/10C/ 33C	wzy	GGAGTTTATCGGTAGTGCTCATTTTAGCTAACAATTCG CAACACGAGGCAACA	248	
	34	wzy	GCTTTTGAAGAGGAGATTATTTACCCAACCAATCCG ACTAAGTCTTCAGTAAAAAATTAC	408	Paietal.,(2006)
	19Fvar	wzy	GACAATTCTGGTTGACTTGTGATTTGCTACCAAATACCT CACCAGCTTCC	585	Menezes <i>et al.</i> ,(2013)
	31	wzy	GGAAGTTTCAAGGATATGATAGTGGTGGCCGAATAA TATATTCAATATATTCCTACTC	701	Paietal.,(2006)
subgrupo6	6C/6D	wci Nbeta	CATTTTAGTGAAGTTGGC GGTGGAGTTAGCTTCGAAGCCCATACTCTTCAATTA	727	Carvalho <i>et al.</i> ,(2010)