

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Kauana Pizzutti

Identificação de *Streptococcus pneumoniae* e vírus respiratórios de amostras de nasofaringe e manifestações respiratórias em coorte de crianças saudáveis

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2023

KAUANA PIZZUTTI

Identificação de *Streptococcus pneumoniae* e vírus respiratórios de amostras de nasofaringe

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

Coorientadora: Dra. Juliana Comerlatto

Porto Alegre, 2023

Catálogo na Publicação

Pizzutti, Kauana
Identificação de Streptococcus pneumoniae e vírus
respiratórios de amostras de nasofaringe e manifestações
respiratórias em coorte de crianças saudáveis / Kauana
Pizzutti. -- 2023.
147 p. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, 2023.

Orientador(a): Cícero Armídio Gomes dias ;
coorientador(a): Juliana Comerlato .

1. Microbiologia. 2. Epidemiologia. 3. Biologia
molecular. 4. Streptococcus pneumoniae. 5. Vírus
respiratórios. I. Título.

Dedico este trabalho ao meu companheiro
Guilherme Teixeira Leal por estar ao meu lado
em todos momentos nessa longa jornada.

Ao meu filho Gustavo Pizzutti Leal, por ser a
razão para seguir em frente.

Meu Pai, por me mostrar que com estudo e
dedicação tudo é possível.

Minha mãe e irmã, pelo apoio incondicional.

Todos os pesquisadores, que de alguma forma,
auxiliam na transformação e evolução para um
mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu companheiro de vida, Guilherme Teixeira Leal, muito obrigado pela paciência e compreensão. Por me ensinar que o respeito, a cumplicidade e o amor transformam, unem e completam.

Ao meu filho, Gustavo Pizzutti Leal mesmo tão pequeno já me ensinou tanto, que nenhum livro será capaz de ensinar. Guilherme e Gustavo, palavras não podem definir o quanto amo vocês.

Aos meus pais Ison Romana Pizzutti e Craudi Maria Steffanello Pizzutti, por sempre priorizarem a educação dos filhos, deixando como legado a honestidade e o cooperativismo. A minha irmã Pollyana por todo carinho e força. Família obrigada por todo o suporte e por acreditarem em mim mesmo quando os meus ideais pareciam distantes e inatingíveis.

Ao professor Cícero A. Dias pela oportunidade e orientação desta tese de doutorado e principalmente pela paciência, compreensão e confiança depositada em mim para conclusão deste trabalho. Muito obrigada pela pessoa que és, paciente, competente, com extrema sabedoria. Sempre será para mim um exemplo inspirador de professor, profissional e pesquisador. Muito obrigada.

À minha coorientadora Juliana Comerlato, pelos grandes ensinamentos como virologista e pesquisadora. Sempre solícita, mostrando os caminhos possíveis, mesmo com a grande demanda de uma mãe pesquisadora. Obrigada por não desistir de mim e pela grande amizade construída.

À pós-doutoranda Daniele Oliveira de Vargas, pela parceria, disponibilidade e amizade construída a partir deste doutorado. Obrigada pelo auxílio nos momentos de dificuldade, gratidão pela nossa amizade.

À Vlademir Vicente Cantarelli pela paciência de me instruir na ciência das técnicas moleculares. Obrigada pela parceria.

Ao PPG Ciências da Saúde, a todos os funcionários, professores e colegas pelos ensinamentos em disciplinas, seminários e cursos dos quais participei.

Ao NUPESQ - Departamento de Núcleo de Apoio ao Pesquisador, em especial Cristiane Bündchen, pelo apoio e paciência com tantas demandas da parte estatística.

A UFCSPA por primar pela excelência e ser essa Universidade de destaque que cativa seus integrantes por meio desse sistema praticamente “familiar” de acolhimento. Tanto o espaço físico quanto todos os departamentos que auxiliam

para que essa e tantas outras pesquisas possam ocorrer. Por proporcionar diferentes cursos e seminários a todos os alunos e funcionários, possibilitando aprendizagens que vão além da vida acadêmica.

Ao Centers for Disease Control and Prevention - CDC pelas análises das amostras coletadas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do RS (FAPERGS) pelo edital de fomento CHAMADA FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017 - PPSUS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo ofertada a mim durante este doutorado

Ao Hospital Comunitário São Peregrino Lazziozi – HCSPL, o Instituto Moriguchi, na pessoa da Dra. Neide Bruscato, responsável pelo recrutamento dos participantes. Obrigada por viabilizar toda a logística em Veranópolis/RS, e fazer de tudo para que a ciência aconteça. Obrigada pela amizade e os maravilhosos cafés da manhã.

Aos queridos amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia. À pós-doc Muriel Barros pela ajuda, apoio e disponibilidade. Ao Tiago Fetzner, à Gabriela Rosa da Cunha, e ao Leonardo Carvalho pelo empenho nas maratonas de coletas mensais. À Mariana Mott por iniciar um projeto tão arrojado e desafiador que produziu vários frutos, um deles, o meu projeto de pesquisa. Ao Pedro Pedrotti pela parceria e disponibilidade. À Amanda Robaina pela dedicação a essa pesquisa, confiança e principalmente pela amizade construída. Obrigada por tudo, vocês foram essenciais para que essa pesquisa ocorresse.

Às queridas amigas Rebeca Nhoque, Jaqueline Elisa Verardo Benedetti e Josiane Trevisol pelo apoio, companheirismo e parceria. Obrigada pela amizade que construí com cada uma de vocês pois vai muito além da pesquisa.

Este trabalho é dedicado a todos que contribuíram para a minha formação e que compartilharam esse objetivo comigo.

E, por fim, agradeço a todas as crianças que participaram do estudo e a seus pais ou responsáveis, que confiaram em nosso trabalho.

Muito obrigada. Sou muito grata a todos.

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria que causa doenças invasivas como meningite, bacteremia e especialmente entre crianças é considerado um dos microrganismos de maior gravidade em pneumonia infantil, sendo considerado um dos maiores contribuintes para a morbidade e mortalidade em todo o mundo. Os vírus respiratórios são os microrganismos mais comuns causadores de doenças respiratórias em crianças. Durante a infância, a taxa de colonização pneumocócica é elevada, e os vírus respiratórios são frequentes na nasofaringe. Neste local parece ocorrer um processo dinâmico de aquisição e eliminação de vários microrganismos, durante o qual eles interagem entre si e com o hospedeiro. Por ser o sítio de origem das infecções do trato respiratório, é de grande importância a investigação sobre as interações na nasofaringe em especial entre pneumococo e os vírus respiratórios em crianças saudáveis. Entender a contribuição da coinfeção viral/bacteriana para a gravidade da doença é altamente complexo, principalmente na população pediátrica, pois podem causar sintomas respiratórios semelhantes. Foram elegíveis 230 crianças de 18-59 meses da cidade de Veranópolis/RS. Destas 63.9% (147/230) transportavam pneumococo na nasofaringe, a prevalência dos vírus respiratórios foi de 49.13% (113/230) e 34.8% (80/230) tinham coocorrência (*S. pneumoniae* + qualquer vírus respiratório) destes microrganismos. A presença de vírus respiratório teve associação positiva com a colonização por pneumococo (54.4% vs 39.7%; $p=0.033$). O rinovírus foi o mais prevalente entre os vírus respiratórios, em 32.6% (75/230) da população do estudo. E teve associação positiva com a colonização por pneumococo (38.8% vs 21.7%; $p=0.012$). Analisamos os prontuários de 14 dias após a coleta da amostra, tivemos uma perda de 6 participantes, totalizando 224 crianças incluídas no estudo de coorte. Destes, 43 tiveram atendimento médico no período. E não encontramos associação entre sintomas clínicos e/ou doenças respiratórias com os microrganismos encontrados na nasofaringe. O nosso estudo contribui para a compreensão da relação entre pneumococo e vírus respiratórios. A investigação em crianças saudáveis ainda é inicial, com poucos estudos que abordam esta questão. Alguns estudos referem que a presença destes microrganismos na nasofaringe são fatores de risco para doenças respiratórias subsequentes. Na população do nosso estudo, não foi possível chegar a esta conclusão.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, vírus respiratórios, nasofaringe, crianças assintomáticas.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a bacterium that causes invasive diseases such as meningitis, bacteremia and especially among children, is considered one of the most serious microorganisms in childhood pneumonia, being considered one of the biggest contributors to morbidity and mortality worldwide. Respiratory viruses are the most common microorganisms that cause respiratory diseases in children. During childhood, the rate of pneumococcal colonization is high, and respiratory viruses are frequent in the nasopharynx. There seems to be a dynamic process of acquisition and elimination of various microorganisms, during which they interact with each other and with the host. As it is the site of origin of respiratory tract infections, it is of great importance to investigate the interactions in the nasopharynx, especially between pneumococcus and respiratory viruses in healthy children. Understanding the contribution of viral/bacterial co-infection to disease severity is highly complex, especially in the pediatric population, as they can cause similar respiratory symptoms. A total of 230 children aged 18-59 months from the city of Veranópolis/RS were eligible. Of these 63.9% (147/230) carried pneumococcus in the nasopharynx, the prevalence of respiratory viruses was 49.13% (113/230) and 34.8% (80/230) had co-occurrence (*S. pneumoniae* + any respiratory virus) of these microorganisms. The presence of respiratory virus was positively associated with pneumococcal colonization (54.4% vs 39.7%; $p=0.033$). Rhinovirus was the most prevalent among respiratory viruses, in 32.6% (75/230) of the study population. And there was a positive association with pneumococcal colonization (38.8% vs 21.7%; $p=0.012$). We analyzed the medical records 14 days after sample collection, we had a loss of 6 participants, totaling 224 children included in the cohort study. Of these, 43 had medical care in the period. And we found no association between clinical symptoms and/or respiratory diseases with the microorganisms found in the nasopharynx. Our study contributes to the understanding of the relationship between pneumococcus and respiratory viruses. Research in healthy children is still in its very beginning, with not many studies addressing this issue. Some studies report that the presence of these microorganisms in the nasopharynx are risk factors for subsequent respiratory diseases. In the population of our study, it was not possible to reach this conclusion.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, respiratory viruses, nasopharyngeal, asymptomatic children.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Flow diagram of children aged 18–59 months, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.....	119
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vírus respiratórios comuns, sua classificação, principais síndromes e principais métodos de detecção.....	28
Table 1 - Demographic characteristics and clinical symptoms of the population (n = 230) according to identified microorganism, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.....	111
Table 2 - Frequency of respiratory viruses in children with pneumococcal carriage (n = 147), Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.....	113
Table 3 - Influence of <i>S. pneumoniae</i> colonization or respiratory virus detection, or co-occurrence combined in medical appointments 14 days after the specimen collection among 224 children in Veranópolis, Brazil, 2018-2019.....	114
Table 4 - Frequency of clinical symptoms and diagnosis in 14 days of medical record analysis according to identified microorganism, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.....	114
Table 1 S1 - Frequency of clinical symptoms and diagnosis in 14 days of medical record analysis according to different respiratory viruses, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.....	121
Table 1 S2 - Frequency of clinical symptoms in children with different respiratory viruses, Veranópolis/RS, Brazil, 2018-2019.....	122
Table 2 S2 - Seasonal distribution of specimens according to the detection of different respiratory viruses , Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.....	123
Tabela 1 A - Identificação dos sorotipos pneumocócicos na codetecção com diferentes vírus respiratórios, crianças de 18-59 meses, Veranópolis/RS,Brazil, 2018-2019.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADV	Adenovírus
Ag	Antígeno
CCL3	Quimiocina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEACAM-1	Molécula de adesão carcinoembrionária - 1
CRIE	Centros de Referências de Imunobiológicos Especiais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doenças pneumocócicas
DPI	Doença pneumocócicas invasiva
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EUA	Estados Unidos da América
Fe	Ferro
GBD	Global Burden of Disease
GO	Goiás
hBOV	Bocavirus
hCoV	Coronavírus
HIB	Vacina Haemophilus influenzae tipo b
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
hMPV	Metapneumovirus
hPIV	Parainfluenza
hRV	Rinovírus
IgA	Imunoglobulinas A

IgG	Imunoglobulinas G
INF	Influenza
IRA	Infecção respiratória aguda
IVAI	Infecções das vias aéreas inferiores
IVAS	Infecções das vias aéreas superiores
LACEN - RS	Laboratório Central do Estado do Rio Grande do sul
LP	Líquido pleural
LytA	Autolisina Nacetylmuramoyl - L - alanine - amidase
Mn	Manganês
NA	Neuraminidase
Nan	Enzima neuraminidase
OMA	otite média aguda
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAC	Pneumonias adquiridas da comunidade
PAFr	Fator de ativação de plaquetas receptor
PCV	Vacina pneumocócica conjugada
PCV7	Vacina pneumocócica conjugada heptavalente
PCV10	Vacina pneumocócica conjugada 10 - valente
PCV13	Vacina pneumocócica conjugada 13 - valente
PCV15	Vacina pneumocócica conjugada 15 - valente
PCV20	Vacina pneumocócica conjugada 20 - valente
PgdA	Enzimas peptidoglicano - N - acetilglucosamina deacetilase
<i>piaB</i>	Gene permease de transportador pia ABC
ply	Toxina pneumolisina

PNI	Programa nacional de imunização
PVM	Vírus da pneumonia de camundongos
P5	Fímbrias homólogas
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RSV	Vírus sincicial respiratório
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Risco relativo
RT-PCR	Transcrição reversa-reação em reação em cadeia da polimerase
SARG	Síndrome respiratória aguda grave
SARS	Síndrome respiratória aguda severa
SARS-CoV	Coronavírus associado à síndrome respiratória severa
SG	Síndrome gripal
SUS	Sistema Único de Saúde
TR	Trato respiratório
TRS	Tratos (vias) respiratório superior
TRI	Tratos (vias) respiratório inferior
VPP	Vacinas Polissacarídicas
VPP23	Vacina Polissacarídica 23-valente

SUMÁRIO

1.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1.	Sistema respiratório.....	16
1.1.1.	Microbiota da nasofaringe.....	17
1.2.	Doenças respiratórias infecciosas na pediatria.....	20
1.2.1.	Infecções respiratórias agudas (IRAs)	21
1.2.2.	Síndromes respiratória.....	24
1.3.	Vírus respiratórios.....	25
1.3.1.	Vírus sincicial respiratório (RSV).....	28
1.3.2.	Metapneumovírus humano (hMPV).....	30
1.3.3.	Parainfluenza vírus humano (hPIV).....	31
1.3.4.	Rinovírus humano (hR V).....	32
1.3.5.	Bocavírus (hBoV).....	34
1.3.6.	Adenovírus (ADV).....	35
1.3.7.	Influenza virus (INF).....	36
1.3.8.	Coronavírus (HCoV).....	38
1.4.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	38
1.4.1.	Pneumonia Pneumocócica em crianças.....	40
1.4.2.	Vacinação Pneumocócica.....	41
1.4.3.	Colonização no processo da doença.....	45
1.4.4.	Fatores que influenciam na colonização.....	48
1.5.	Interação pneumococo e vírus respiratórios no trato respiratório (TR)..	51
1.5.1.	Diferenças entre identificação do agente bacteriano e viral.....	53
1.5.2.	Coinfecções no trato respiratório inferior (TR).....	56
1.5.3.	Interações mecanísticas.....	59

1.5.3.1.	Mecanismos de influência viral na colonização e invasão bacteriana.....	60
1.5.3.2.	Disfunção dos componentes do sistema imunológico.....	62
1.5.3.3.	Sinergismo unidirecional ou bidirecional	64
1.5.4.	Relação pneumococo e vírus respiratórios na progressão e gravidade da doença respiratória.....	65
1.5.4.1.	Estudos que analisam quantificação pneumocócica.....	68
1.5.5.	Estudos de colonização.....	72
2.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
3.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	105
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
ANEXO A	- Sorotipos pneumocócicos em amostras de codeteção com diferentes vírus respiratórios	125
ANEXO B	- Questionário CDC Adaptado	126
ANEXO C	- Coleta de informações de prontuários	129
ANEXO D	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	130
ANEXO E	- Parecer Comitê De Ética – CEP.....	132

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Sistema respiratório

O sistema respiratório é dividido nos tratos (vias) respiratório superior (TRS) e respiratório inferior (TRI). O TRS, apresenta como função filtrar, umidificar e aquecer o ar inalado (Watelet and van Cauwenberge 1999) que chega ao TRI, onde acontece a troca de oxigênio e dióxido de carbono (Sender et al. 2021). O TRS consiste em um sistema comunicante, que compreende as narinas anteriores, cavidade nasal, nasofaringe, seios paranasais, trompa de eustáquio, cavidade do ouvido médio, cavidade oral, orofaringe, laringe e traqueia. Em conjunto, representa a interface entre o ambiente externo e o TRI (Jones 2001; Sahin-Yilmaz and Naclerio 2011), o qual é composto por parte inferior da traqueia, brônquios, bronquíolos, alvéolos e pulmões, que são cobertos pela pleura pulmonar (Chaudhry and Bordoni 2021).

Uma pessoa inala em média cerca de 10.000 litros de ar por dia, carregado de poluentes, alérgenos e patógenos, por muito tempo acreditou-se que, o número de microrganismos no TRS era muito baixo e o TRI era estéril, devido às técnicas laboratoriais utilizadas (Johnson 1995; Dodi et al. 2021). Na era pós biologia molecular, foi comprovado que o corpo humano é composto por uma grande variedade de comunidades microbianas, nomeadas microbiota.

A microbiota é um ecossistema composto por microrganismos, que residem ou transitam, por um determinado sítio anatômico. Pode ser composta por uma grande diversidade de bactérias, vírus, fungos, bacteriófagos, arqueias, que colonizam diferentes superfícies do corpo, incluindo a pele (Grice and Segre 2011), cavidade oral, intestino (Ding and Schloss 2014), TRS (Charlson et al. 2010) e TRI (Beck et al. 2012; Marsland and Gollwitzer 2014; Dodi et al. 2021). O mais recente advento de métodos de sequenciamento de nova geração, tornou possível estudar essas comunidades, sua relação com a saúde e as doenças. Ocorreu a mudança de paradigma onde o princípio de "um patógeno / uma doença" postulada por Koch no século XIX, foi gradualmente substituída pela teoria de que a saúde humana é o resultado de uma rede interconectada e complexa de interações, entre os microrganismos e seu hospedeiro (Vayssier-Taussat et al. 2014).

A microbiota respiratória se encontra, principalmente, nas superfícies mucosas que revestem o trato respiratório (TR). Ela é composta por uma grande variedade de bactérias, principalmente membros dos filos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria* (Charlson et al. 2010; Yan et al. 2013; Costalonga and Herzberg 2014). No entanto, há uma expressiva diferença nos perfis das bactérias localizadas em níveis taxonômicos mais baixos do TR, resultantes de variações na umidade, acidez e tipo de célula epitelial. A interação da microbiota com esses componentes, parece seguir os princípios conhecidos na ecologia geral como seleção ambiental, diversificação local, dispersão e deriva (Costello et al. 2012).

Alguns estudos afirmam que, a composição desta microbiota é estabelecida já nos primeiros meses de vida, influenciada por fatores externos, como o ambiente, via de parto e aleitamento infantil. Acredita-se, que os perfis da microbiota respiratória no início da vida, estão associados à suscetibilidade a infecções respiratórias e doenças sibilantes/asma. Interações precoces entre agentes infecciosos, como vírus e bactérias, mostraram modular as respostas imunes do hospedeiro, afetando potencialmente o curso da doença e a saúde respiratória futura, ou seja, doenças respiratórias precocemente adquiridas auxiliariam a prevenir complicações agudas e de longo prazo (Unger and Bogaert 2017). Essa concepção é muito recente e complexa, ainda necessita de mais estudos para o melhor entendimento das relações entre saúde/doença e a microbiota do TR.

1.1.1. Microbiota da nasofaringe

Localizada no TRS na parte posterior à cavidade nasal, a nasofaringe é revestida por muco que tem como função reter e eliminar partículas externas através da ação ciliar em direção à cavidade oral. Além disso, as glicoproteínas do muco permitem a adesão dos microrganismos residentes. A microbiota da nasofaringe é muito diversa, em crianças é caracterizada pela predominância de espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Dolosigranulum*, *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* spp. (Biesbroek et al. 2014b). A composição, pode estar relacionada à dispersão de espécies bacterianas derivadas da microbiota vaginal (*Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Dolosigranulum* spp.), ou pele materna

(*Staphylococcus* e *Corynebacterium* spp.) durante o período perinatal. Ademais, a alimentação infantil parece ter uma influência importante, tanto no estabelecimento da microbiota quanto no desenvolvimento subsequente. O aleitamento materno exclusivo durante as primeiras seis semanas de vida foi associado ao aumento dos perfis *Corynebacterium / Dolosigranulum*, enquanto o predomínio de *S. aureus* foi observado em bebês alimentados exclusivamente por fórmula infantil (Biesbroek et al. 2014a). A nasofaringe é conhecida por ser o local de colonização de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo), *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus*, em especial em crianças, sendo que até 93% das crianças com menos de 2 anos de idade são colonizadas por pelo menos um patógeno potencial identificado por cultura convencional (van den Bergh et al. 2012). Pneumococos, podem ser identificados em cerca de 60% das crianças menores de 5 anos (CDC 2020); portanto, esses microrganismos com potencial de causar doenças respiratórias graves, são considerados colonizadores da nasofaringe, fazendo parte da microbiota residente em crianças.

A colonização dessas espécies bacterianas, pode ter um papel ambíguo no desenvolvimento de doenças respiratórias: por um lado, o transporte é um pré-requisito para o desenvolvimento de doenças (Bogaert et al. 2004), sendo a nasofaringe conhecida como a porta de entrada de doenças do TR; como a nasofaringe fica entre o nariz, os seios da face, as orelhas, a laringe e o TRI, os patógenos residentes da nasofaringe podem ser a fonte de infecções do TRS e TRI (De Lencastre and Tomasz 2002; García-Rodríguez and Fresnadillo Martínez 2002); por outro lado, essa colonização não leva necessariamente à infecção, ao contrário, sua presença tem sido relacionada com a resistência contra a aquisição de novas cepas patogênicas (Gray et al. 1980). Um estado de simbiose bacteriana, mesmo incluindo patógenos potenciais, pode ser protetor contra infecção e inflamação de curto prazo (Gray et al. 1980; Faden et al. 1997; García-Rodríguez and Fresnadillo Martínez 2002). No entanto, o transporte pode evoluir para doença respiratória em uma fração dos casos, um processo que pode ser desencadeado por vários estímulos exo ou endógenos (Faden et al. 1990; Bogaert et al. 2004; Sleeman et al. 2005). Especialmente, esse fato apoia a hipótese de que o crescimento excessivo de um patógeno potencial não é um evento aleatório, mas sim, uma ocorrência de

múltiplos fatores, que levam à falta de contenção do patógeno potencial pelos comensais residentes e imunidade local. Ambos, parecem mais propensos a falhar após uma aquisição recente de uma nova bactéria, sorotipo, ou coinfeção viral, induzindo um estado combinado de disbiose temporária na ausência de imunidade adaptativa.

Assim, como para as bactérias, no período após biologia molecular, em especial o advento de técnicas de sequenciamento de alto rendimento de última geração, os estudos permitem afirmar, que existe uma comunidade de vírus e bacteriófagos residentes e transitórios no TR, conhecido como viroma. O viroma, é a parte mais mutável do ecossistema microbiano, essa constante mudança na composição está relacionada ao tipo de ambiente, dieta e código genético do hospedeiro, entre outros fatores da relação vírus-hospedeiro (Dodi et al. 2021).

Para o melhor entendimento do viroma do TR, foram relatadas análises de amostras de aspirado e swab nasofaríngeo, escarro, e aspirado broncoalveolar. Entre os vírus do DNA humano, a família Anelloviridae tem sido relatada como a mais prevalente (Lysholm et al. 2012; Young et al. 2015; Dodi et al. 2021), seguida por Redondoviridae (Abbas et al. 2019; Spezia et al. 2020). Também são frequentes as famílias Adenoviridae, Herpesviridae e Papillomaviridae, e os bacteriófagos: Caudovirales, Microviridae e Inoviridae (Willner et al. 2009; Wylie et al. 2012; Young et al. 2015; Abbas et al. 2017). Os vírus de RNA têm sido pouco estudados, pois as amostras de RNA são menos estáveis, degradando-se facilmente, de modo que os vírus de RNA podem ser subestimados por limitações técnicas.

Os vírus RNA estão entre os principais patógenos respiratórios humanos, incluindo aqui influenza (INF), parainfluenza (hPIV), rinovírus (hRV), vírus sincicial respiratório (RSV), metapneumovirus (hMPV) e o coronavírus (hCoV). Dentre os vírus DNA, podem ser aqui destacados o bocavirus (hBOV) e adenovírus (ADV). Esses vírus são capazes de habitar transitoriamente o viroma respiratório (Singanayagam et al. 2012; Dodi et al. 2021), causando ou não sintomas no hospedeiro.

Alguns estudos têm relatado a frequência desses vírus respiratórios em indivíduos caracterizados como assintomáticos (sem diagnóstico de doença respiratória). Em um estudo realizado somente em adultos recrutados aleatoriamente em um ponto turístico da cidade de Nova York - Estados Unidos da América (EUA), durante o

verão (2016) e inverno (2017), foram coletados 2.685 swabs nasofaríngeos. Foi utilizada a técnica de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), para detecção dos vírus: ADV, hCoV, hMPV, RV, INF, RSV e PIV. Em síntese, foi detectado pelo menos um vírus respiratório em 6.2% (168 indivíduos) das amostras; desses 62% dos indivíduos foram caracterizados como assintomáticos (Birger et al. 2018).

Em um estudo no Brasil, com crianças de 4 a 14 anos, realizado durante um ano na cidade de Goiânia - Goiás (GO), foram coletados 225 aspirados e/ou swab nasofaríngeos. A qPCR, foi utilizada para detecção dos vírus: INF (A, B e C), RSV (A e B), hMPV (A e B), HCoV (229E e OC43), ADV, hRV, PIV, e Enterovírus (hEV). A taxa de detecção viral foi de 14.8%, em indivíduos caracterizados como assintomáticos, sendo mais frequente em crianças com menos de 7 anos (Castro et al. 2020).

Esses vírus respiratórios, são frequentemente associados a doenças em crianças menores de 5 anos. Desse modo, alguns estudos com foco nas infecções virais, incluíram um grupo de comparação, caracterizados como assintomáticos, e nesse grupo a taxa de detecção viral varia de 27% a 43% (Chonmaitree et al. 2008; Jansen et al. 2011; Howard et al. 2015; Birger et al. 2018; Lopes et al. 2020; Moriyama et al. 2020). Ao analisar os estudos com infecções sintomáticas e assintomáticas do TR, os vírus respiratórios patogênicos parecem ser frequentemente, se não continuamente, presentes nas superfícies mucosas do TR (Foxman and Iwasaki 2011).

A microbiota da nasofaringe é muito diversificada, composta por uma rede de correlações entre microrganismos residentes e transitórios. Desse modo, para um microrganismo tornar-se patológico, há a dependência de muitos fatores do hospedeiro e do próprio microrganismo, sendo esta relação ainda pouco compreendida (Vannella and Moore 2008; Singanayagam et al. 2012; Virgin 2014).

1.2. Doenças respiratórias infecciosas na pediatria

Embora a anatomia básica do TR pediátrico e adultos seja a mesma, existem algumas diferenças importantes, que aumentam a frequência e a gravidade de

problemas respiratórios e doenças pulmonares em crianças: No TRS, os bebês e crianças tendem a ter a língua proporcionalmente maior em relação ao espaço na boca, crianças menores normalmente respiram pelo nariz, em geral, as vias aéreas pediátricas são menores, menos rígidas e mais propensas à obstrução. As taxas respiratórias são mais altas, tornando-as mais suscetíveis a agentes transmissíveis pelo ar, do que os adultos. Já no TRI, as costelas dos bebês e crianças pequenas são mais horizontais, diminuindo o movimento do tórax e a cartilagem da costela é mais elástica, tornando a menos rígida. Isso pode permitir que a parede torácica se retraia durante episódios de desconforto respiratório, e diminua o volume corrente em comparação com os adultos e crianças maiores (Schochet 2015).

Quanto menor a criança, mais vulnerável é o epitélio do TR, pois possui menos anticorpos, e as células imunológicas são menos eficientes e em menor quantidade. As imunoglobulinas A (IgA) e G (IgG), atingem níveis adequados somente a partir de 3 anos de idade (Perales et al. 2016; Ruane et al. 2016). Além dos fatores fisiológicos, outros fatores externos também estão envolvidos na frequência e gravidade das doenças respiratórias, dentre eles estão: o clima, os agentes poluidores atmosféricos, os agentes poluidores domésticos como o tabagismo, as aglomerações, e, a desigualdade em saúde entre as populações e os grupos socioeconômicos diferentes (Duarte et al. 2002; CNDSS 2008; GBD 2020).

Todos esses fatores influenciam para que as doenças respiratórias sejam o motivo mais frequente de consultas pediátricas e hospitalização, representando assim, um fardo considerável à saúde pública mundial (Pereira et al. 2011; WHO 2017; Sultana et al. 2019).

1.2.1. Infecções respiratórias agudas (IRAs)

Infecções respiratórias agudas (IRAs), são classificadas como infecções das vias aéreas superiores (IVAS), sendo elas: sinusite, amigdalite, faringite, otite média aguda (OMA), ou infecções das vias aéreas inferiores (IVAI); bronquite, bronquiolite e pneumonia. O sufixo grego "-ite", designa **inflamação** do órgão ou da estrutura anatômica indicada (Infopédia), como por exemplo, a amigdalite: inflamação das amígdalas..

As IRAs, são comumente relacionadas a cuidados intensivos, avaliação contínua, além de intervenções rápidas e resolutivas (Silva Filho et al. 2017). Apesar da natureza geralmente benigna da infecção, a IRA é um enorme ônus econômico para a sociedade em termos de consultas à médicos e outros profissionais de saúde, alto investimento com medicamentos, e faltas ao trabalho, escola e/ou creche (Heikkinen and Järvinen 2003; Veronesi and Focaccia 2004). Muitas vezes constitui uma emergência médica, pois pode afetar diretamente a oxigenação dos tecidos, levando a complicações em crianças, com aumento da morbidade e mortalidade.

Exceto, durante o período neonatal, as IRAs são as causas mais comuns de doença e mortalidade em crianças menores de cinco anos, que têm uma média de 4 a 8 episódios de IRA anualmente, ao frequentar escola/creches esse número aumenta em até 10 ao ano (Sofia; WHO 2019; GBD 2020). Dentro destas, as causas mais frequentes são infecções virais sintomáticas, estimadas em mais de 5 episódios por ano em crianças menores de três anos causando morbidade significativa (Chonmaitree et al. 2008). Em menor frequência, porém maior gravidade, as IRAs bacterianas, são responsáveis pela grande maioria dos óbitos das IRA em crianças.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, foram notificados 2.6 milhões de óbitos por infecção respiratória aguda, tornando-se a 4ª causa de morte no mundo (WHO 2019). Em 2017, infecções respiratórias causaram 808.920 mortes, entre crianças menores de 5 anos em todo o mundo (GBD 2020). Em especial, a pneumonia, que em 2015 foi responsável pela principal causa de morte em crianças de 1 a 58 meses, aproximadamente 5.441 por 1000 nascidos vivos em todo o mundo (Liu et al. 2016). Mais de 95% dos episódios, e 99% das mortes por pneumonia em crianças menores de 5 anos em todo o mundo ocorrem em países de média e baixa renda (Unger and Bogaert 2017).

Dentro das IRAs, uma das patologias de maior relevância na saúde pública mundial são as pneumonias adquiridas da comunidade (PAC) (WHO 2019), que acometem crianças previamente híginas, colonizadas por microrganismos adquiridos do meio escolar, domiciliar ou comunidade (March and Galvão 2018). Vários sinais e sintomas agudos são descritos como: tosse, mal estar, dor torácica, febre, hipoxemia, taquipneia e sintomas sistêmicos associados. A sintomatologia e curso da doença varia de acordo com a idade da criança, da extensão do acometimento, momento que foi procurado assistência médica, entre outros (SBP 2018).

Para o diagnóstico de pneumonia é utilizado um conjunto de sintomas, assim como auxílio de exames radiológicos, e em casos mais graves, testes laboratoriais de identificação do agente infeccioso. Contudo, a identificação do agente etiológico das PACs, não é uma tarefa fácil (Prina et al. 2015). O tratamento por sua vez acaba por ser empírico, com uso de antimicrobianos de amplo espectro, antes mesmo da coleta de amostras para cultura bacteriana, também dificultando a identificação do agente (Resti et al. 2009; Prina et al. 2015; Yun et al. 2019, 2022). Sobretudo, dentro dos quadros bacterianos, o *S. pneumoniae* é o agente mais frequente (Yun et al. 2022), na metade dos casos de pneumonias não é identificado o agente infeccioso (Mandell et al. 2007); em contrapartida, há indícios grande parcela das PACs culturas negativas, sejam causadas pelo pneumococo (Yun et al. 2022) , principalmente casos mais graves (Tarragó et al. 2008; Srinivasan et al. 2011; Perez et al. 2016; Wiese et al. 2016; Pizzutti et al. 2020).

Em relação às PAC virais e coinfeções virais-bacterianas, houve um aumento na identificação após implementação de testes de imunofluorescência e moleculares (Bartlett 2011). Na pediatria, os vírus respiratórios têm sido descritos como a causa mais comum de PAC em crianças, e o pneumococo em seguida. Nos EUA, estudos de vigilância têm relatado a detecção de vírus respiratórios em cerca de 50-66% dos casos de PAC infantil que requer hospitalização (Jain et al. 2015; Yun et al. 2022), como mais frequente RSV de 16-37% e hRV 18-22%, seguido do MPV, ADV, BOV, PIV. O pneumococo vem logo em seguida, como principal bactéria envolvida. A coinfeção (vírus/bactéria) foi identificada em até 34,6% dos casos (Jain et al. 2015; Jiang et al. 2017; Yun et al. 2022).

No Brasil, não é comum a utilização de testes moleculares na rotina laboratorial para PAC, pois não é uma doença de notificação compulsória, levando a uma subestimativa de dados. Contudo, estima-se que os vírus respiratórios são os agentes etiológicos mais frequentes identificados em PAC (Nascimento-Carvalho et al. 2008, 2010; Ferreira et al. 2019). No Brasil o pneumococo também é a bactéria mais frequente e o microrganismo mais letal (GBD 2018; OPAS 2020).

Devido à implementação mundial de vacinas para os principais agentes causadores das IRAs graves, como vacina da gripe (INF), PCV (vacina pneumocócica conjugada), HIB (Vacina *Haemophilus influenzae* tipo b); ocorreu uma grande diminuição das doenças invasivas causadas por esses agentes (Wahl et al. 2018).

Porém, esse ainda é um problema de saúde pública para as crianças em todo o mundo, em particular nos países de baixa e média renda, onde a morbidade e a mortalidade apresentam índices mais altos, por diversos fatores: falta de atendimento médico disponível, baixa cobertura vacinal, desnutrição, questões sanitárias e ambientais, altas taxas de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Simoes et al. 2011; Wormer et al. 2021).

1.2.2. Síndromes respiratória

As síndromes respiratórias, são as IRAs mais frequentes na pediatria. É composta por um conjunto de sintomas próprios, de uma determinada doença como síndrome gripal (SG) - quadro respiratório agudo caracterizado por indivíduo com pelo menos dois dos seguintes sinais e sintomas: febre (mesmo que referida), calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, distúrbios olfativos ou distúrbios gustativos, e, sintomas gastrointestinais. Em crianças, além dos itens anteriores, considera-se também obstrução nasal, na ausência de outro diagnóstico específico. A síndrome respiratória aguda grave (SARG) ou severa (SARS), é caracterizada em indivíduos com SG que apresentem: dispneia/desconforto respiratório ou pressão ou dor persistente no tórax e/ou saturação de O₂ menor que 95% em ar ambiente e/ou coloração azulada (cianose) dos lábios ou rosto. Em crianças, acrescentam-se os seguintes sintomas: batimentos de asa de nariz, cianose, tiragem intercostal, desidratação e inapetência (NVEH/SCMG 2017; MS 2021).

As SG e SRAG, são geralmente causadas por vírus respiratórios, historicamente relacionada às pandemias do INF e atualmente SARS-cov-2. A Organização Mundial da Saúde monitora doenças com capacidade de se alastrar rapidamente de um país para outro, incluindo infecções que possam resultar em SRAG. No Brasil, existe a notificação compulsória desde 2000, além do objetivo de detectar os casos de SRAG, reduzir a ocorrência de formas graves e de óbitos, além de monitorar as complicações da doença e a ocorrência de surtos. Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2019 foram notificados 40.259 casos, destes 12,6% (5.089/40.294) foram a óbitos, a grande maioria foram crianças menores de 5 anos e adultos maiores de 60 anos. As regiões Sudeste e Sul apresentam respectivamente as maiores quantidades de casos notificados. Ainda em 2019, no Rio Grande do Sul foram notificados até novembro 3381 casos (CEVS/RS 2020).

1.3. Vírus respiratórios

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios. Sua estrutura básica é composta de ácidos nucléicos - Ácido desoxirribonucleico (DNA) ou Ácido ribonucleico (RNA) e um envoltório feito de proteínas, chamado de capsídeo. Alguns vírus apresentam um envoltório mais externo de natureza fosfolipídica, chamado de envelope (Pellett et al. 2014).

A via de transmissão dos vírus respiratórios é o TR. Em síntese, rompem a camada mucosa que reveste as células epiteliais das vias aéreas, as invadem e replicam-se, provocando a ativação da cascata imunológica do hospedeiro (Heinonen et al. 2019). A maioria dos vírus são eliminados e transmitidos por três vias diferentes: contato (direto ou indireto), transmissão por gotículas e aerossóis (Kutter et al. 2018).

As infecções do TR podem variar de assintomáticas à doenças agudas com risco de vida (Jansen et al. 2011; Chonmaitree et al. 2015; Howard et al. 2015; Furuya-Kanamori et al. 2016). Todas as idades são suscetíveis, no entanto, em média, as crianças são infectadas duas a três vezes mais frequentemente do que os adultos. Um dos motivos é o sistema imunológico das crianças pequenas, que ainda está em desenvolvimento e os vários fatores contribuem para o aumento da suscetibilidade a infecções virais. Esses fatores incluem diferenças na detecção de patógenos, respostas de interferon mais fracas, falta de memória imunológica em relação ao patógeno invasor, e respostas de células T que são equilibradas para promover tolerância e conter a inflamação (Heinonen et al. 2019).

Esses vírus estão bem adaptados à transmissão eficiente de pessoa para pessoa e circulam em escala global. Os vírus que infectam principalmente o TR, e circulam em escala global tanto como agentes endêmicos ou epidêmicos, incluem: INF, ADV, hPIV, RSV, hCoV, SARS-coV, hMPV, hRV, hBOV; (tabela 1). (Kesson 2007; Boncristiani et al. 2009). São os agentes etiológicos predominantes de IRAs e SARG (Boncristiani et al. 2009; Simoes et al. 2011; NVEH/SCMG 2017; Stein et al. 2017). Sobretudo, provocam considerável morbidade, mortalidade e gasto significativo de recursos públicos, por essas razões, são considerados um dos grandes problemas de saúde pública (GBD 2018; Moriyama et al. 2020). Em especial, durante

epidemias e pandemias, como por exemplo do INF no século XX (1918, 1957 e 1968) e XXI (2009), assim como na atual causada pelo SARS-CoV-2, milhões de pessoas morreram, causando inúmeros danos emocionais e financeiros à população mundial (Petersdorf et al. 1959; Schwarzmann et al. 1971a; van Kerkhove et al. 2011; Schuck-Paim et al. 2013; CDC 2022a). Mas, no restante dos períodos os vírus respiratórios são endêmicos causando surtos de infecções por todo o mundo. A frequência e ocorrência destes surtos variam conforme a sazonalidade de cada vírus, como por exemplo, o INF e RSV são bem característicos do inverno, e o hRV é circulante o ano todo com taxas de infecção com pico na primavera e no outono, e doenças mais graves aumentam no inverno (Moriyama et al. 2020).

A SARG tem notificação compulsória no Brasil. No período pré-pandemia, segundo dados do Ministério da saúde em 2020, compreendendo casos com início de sintomas de 30/12/2018 a 28/12/2019: foram notificados 40.259 casos, sendo 32.963 amostras processadas com vistas à definição laboratorial do vírus causador, a grande maioria crianças menores de 5 anos e adultos maiores de 60 anos. Foi observado, que 40% destes casos foram causados por vírus respiratórios, o restante sem identificação do agente (Ministério da Saúde, 2020). Em um estudo realizado entre 1990 até 2017, no Laboratório Central do Estado do Rio Grande do sul (LACEN - RS), com 20.475 amostras da nasofaringe de pacientes com SARG, os vírus respiratórios foram detectados em 33,6% (11.606) casos (Gregianini et al. 2019). Em 2019, no Rio Grande do Sul foram notificados até novembro 3.381 casos, destes o agente mais frequente foi RSV com 14,2%, seguido por 13,7% INF, 2,3% ADV, 2% hPIV e 63,7% sem identificação do agente (CEVS/RS 2020).

Tabela 1 - Vírus respiratórios comuns, sua classificação, principais síndromes e principais métodos de detecção

Vírus	Classificação ^a	Principal doenças	Métodos de identificação
RSV	Grupos A e B	IVAS, SRAG, bronquiolite, crupe, bronquite, pneumonia	Cultura, detecção de Ag, RT-PCR
hPIV	Tipos 1, 2, 3, 4	IVAS, SRAG, crupe, bronquiolite, bronquite, pneumonia	Cultura, detecção de Ag, RT-PCR
hRV	Espécies A, B e C com 100 sorotipos	IVAS; exacerbação de asma e DPOC, bronquiolite.	Cultura, RT-PCR
ADV	Espécies A-G com 54 sorotipos	IVAS, SRAG, febre faringoconjuntival, bronquite, pneumonia, GEA	Cultura, detecção de Ag, qPCR
hCoV	Tipos OC43, 229E, NL(NH), HKU1	IVAS, bronquite, pneumonia, GEA	Cultura, RT-PCR
SARS-CoV	tipo 1 e 2	SARG	Cultura, detecção de Ag, RT-PCR
hMPV	Grupos A e B	IVAS, exacerbação de asma, bronquite, pneumonia	Cultura, RT-PCR
hBoV	2 linhagens	IVAS, bronquiolite, exacerbação da asma, bronquite, pneumonia, GEA	qPCR
INF	tipo A e B	IVAS, SRAG	Cultura, detecção de Ag, RT-PCR

ADV, adenovírus; Ag, antígeno; hBoV, bocavírus humano; hCoV, coronavírus humano; crupe, laringotraqueobronquite; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; INF, influenza virus; IVAS, infecção respiratória das vias aéreas superior; HMPV, metapneumovírus humano; hPIV, parainfluenza vírus humano; hRV, rinovírus humano; RSV, vírus sincicial respiratório humano; SRAG síndrome respiratória aguda grave; SARS-CoV, Coronavírus associado à síndrome respiratória severa; RT-PCR, transcrição reversa-reação em reação em cadeia da polimerase, que inclui métodos convencionais e em tempo real.

^a Classificação em espécies, subgrupos, sorotipos ou linhagens.

(Kesson 2007; Boncristiani et al. 2009)

1.3.1. Vírus sincicial respiratório (RSV)

O RSV é envelopado, com genoma de RNA de fita simples de sentido negativo não segmentado, pertencente à família *Paramyxoviridae*. É o mais importante vírus

causador de doença respiratória pediátrica grave no mundo, altamente contagioso, transmitido pelas vias aéreas superiores através de aerossóis e sua replicação ocorre principalmente em células epiteliais do TR (Griffiths et al. 2017). A infecção por RSV surge após um período de incubação curto de quatro à cinco dias, com sintomas nas vias respiratórias superiores como rinite, faringite e tosse. A nível de infecções do aparelho respiratório inferior, o RSV é responsável por infecções graves (bronquiolites e pneumonias), que podem conduzir à morte, e as reinfecções por este vírus são bastante frequentes (Kesson 2007). No Brasil, a sazonalidade varia de região para região. Na região sul do país, o período de sazonalidade da circulação do RSV se estende durante os meses de abril a setembro de cada ano. Sobretudo, com pico nos meses de inverno, concomitantemente com a estação do INF (Straliotto et al. 2002; MS 2017).

As coinfeções com outros microrganismos são bastante frequentes, e aumentam o risco de desenvolver doenças respiratórias, tem influência no curso da doença podendo aumentar a gravidade e piorar o desfecho do indivíduo (Griffiths et al. 2017; Pacheco et al. 2021). Essa coinfeção pode ser vírus - vírus, os mais comumente descritos com RSV são o hRV, o hPIV3 (Yoshida et al. 2013) e MPV (Greensill et al. 2003; McNamara et al. 2007; Li et al. 2020; Geiser et al. 2021). As coinfeções bacterianas também são comuns, estima-se que 17,5% à 44% dos pacientes também são positivos para alguma bactéria no TRI, os mais comuns são pneumococo e *H. influenzae* (Korppi et al. 1989; Duttweiler et al. 2004; Thorburn et al. 2006).

Esse vírus infecta aproximadamente 50% das crianças durante o primeiro ano de vida, e praticamente todas até os dois anos de idade (ANVISA 2013). É o microrganismo mais frequente em IRAs na infância, IVAI em lactentes e uma das principais causas de hospitalização como resultado de IRA grave em menores de 5 anos. A grande maioria dos casos ocorre em países de baixa e média renda (Fischer et al. 2002; Nair et al. 2010; Stein et al. 2017).

O estudo Global Burden of Disease (GBD), em 2016 com dados mundiais das infecções do TRI, o RSV foi responsável por 10,74 milhões de episódios e 6,5 óbitos por 100.000 indivíduos na faixa etária de menores de 5 anos (GBD 2018). Em crianças menores de 6 meses, calcula-se, que em 2015 causou 1,4 milhões de internações hospitalares e 27.300 óbitos em todo o mundo. No Brasil, estima-se que

a taxa de incidência anual seja de 14 por 100.000 indivíduos menores de 5 anos (Shi et al. 2017).

Um estudo realizado na região norte do Brasil, foram incluídas crianças de 3 meses até 10 anos hospitalizadas com PAC confirmado por radiografia. Amostras de swab nasofaríngeo e aspirado traqueal foram coletadas, e utilizaram qPCR para detecção dos vírus respiratórios. Demonstraram que em 43% das crianças apresentavam pelo menos um vírus, destes, 14% foram detectados RSV associado a casos graves, o segundo vírus mais frequente (Ferreira et al. 2019).

(Arruda et al. 2014)), realizaram um estudo prospectivo de coorte com prematuros de diferentes locais do Brasil, durante os anos 2008-2010. Foram incluídos no estudo 303 pacientes, os quais foram acompanhados por 1 ano após a inscrição. Sobretudo, 176 (58,1%) apresentaram IVAI. Entre esses, 162 foram coletadas lavagens nasais para detecção por qPCR dos vírus respiratórios. O RSV foi o vírus mais frequente com 33,1%. Concluíram que 27,8% (45/162) apresentaram IVAI grave. Destes, o RSV foi o vírus mais frequente associado com 66,7% (30/45) dos casos graves. Sendo 50% dos casos de infecção única por RSV e 50% coinfeções. Eminências hospitalares significativamente mais longas foram associadas a eventos envolvendo coinfeções em comparação com infecções únicas por RSV.

(Stralio et al. 2002) ((Stralio et al. 2002)), foi o primeiro estudo epidemiológico com vírus respiratórios do estado do Rio Grande do Sul. Esta pesquisa envolveu três unidades de atendimento de Porto Alegre – RS, durante os anos de 1990 à 1992. Foram incluídas 862 amostras de secreção da nasofaringe de crianças menores de 5 anos com IRA, e utilizaram teste sorológico para identificação de RSV, ADV, INF A e B e PIV3. Os autores concluíram que, 36,6% das IRAs foi detectada a presença de vírus, sendo RSV o mais frequente com 26,2%, a grande maioria, crianças menores de 1 ano e o mais prevalente em menores de 6 meses. Esse estudo, também mostrou a ocorrência anual de infecções respiratórias por RSV nos meses frios. Em 2019 no Rio Grande do Sul, os casos notificados de SRAG, o vírus mais frequente detectado foi RSV com 14,2% dos casos (CEVS/RS 2020). Os dados demonstram que o RSV é um dos agentes mais importante na infância, em especial no sul do Brasil, por ser a região mais fria do país.

1.3.2. Metapneumovírus humano (hMPV)

O hMPV é envelopado, com genoma de RNA de fita simples de sentido negativo não segmentado, também pertencente à família Paramyxoviridae. Este microrganismo circula durante o ano todo com pico de infecção no inverno e primavera, geralmente ocorrendo em conjunto com surtos de RSV (Panda et al. 2014; Haynes et al. 2016; Moriyama et al. 2020). A infecção por hMPV causa sintomas semelhantes aos do RSV, variando de resfriado com acometimento apenas do TRS até bronquiolite e pneumonia. O hMPV tem sido relatado como causa frequente de sibilância aguda em crianças. Cerca de 47% das crianças com este vírus apresentam sibilância, e até 31% com tiragem torácica (Boncristiani et al. 2009). Em geral, a infecção por esse vírus é responsável por aproximadamente 2% à 12% das doenças respiratórias inferiores pediátricas (Alto 2004), e estima-se, que todas as crianças até os 5 anos já tiveram contato com hMPV (ANVISA 2013). Crianças menores de dois anos apresentam evolução clínica mais preocupante, e aproximadamente 10% dos casos requerem internação hospitalar (Boivin et al. 2002; da Silva et al. 2009; Panda et al. 2014). A coinfeção com RSV é frequente, e associada a casos mais graves de doenças respiratórias (Greensill et al. 2003; McNamara et al. 2007; Li et al. 2020; Geiser et al. 2021).

Em um estudo americano (Utah, EUA) prospectivo, foram incluídos 1.024 pacientes com PAC e 759 controles. Amostras de nasofaringe e orofaringe foram utilizadas para detecção viral por qPCR. O Hmpv, foram substancialmente mais comuns em pacientes com PAC de todas as idades do que em controles (Self et al. 2016).

(Gregianini et al. 2018) realizaram um estudo durante o período 2009-2011, com amostras provenientes do LACEN-RS. Incluíram, 545 amostras da nasofaringe de pacientes com SRAG, utilizaram teste imunofluorescência direta ou qPCR para identificação viral. Todas as amostras foram negativas para os vírus: RSV, ADV, INF A e B, e, PIV1-3. A identificação do MPV foi constatada em 20% das amostras. A faixa etária predominante foi a dos menores de 1 ano com 45,7% dos casos.

Em um estudo na região metropolitana de Porto Alegre - RS, foram incluídos 455 aspirados nasofaríngeos, provenientes de crianças com suspeita de IRA. Com teste de qPCR fizeram a detecção dos vírus respiratórios, o hMPV foi positivo em 14,5% das amostras, destes, 84,8% foram observados coinfeção com outros vírus (Pilger et al. 2011).

1.3.3. Parainfluenza vírus humano (hPIV)

hPIV é envelopado, com genoma RNA de fita simples de sentido negativo, não segmentado, pertencente à família Paramyxoviridae e possui muitas características em comum com RSV. Após um período de incubação de 2 a 4 dias, começam os sintomas respiratórios, sendo este vírus o principal causador de laringotraqueobronquite (crupe) em crianças (ANVISA 2013). Aproximadamente, dois terços de todas as infecções por hPIV em crianças resultam em IVAS febril e com otite média associada em 10 a 34% dos casos, o terço restante das infecções por hPIV causa crupe, bronquiolite ou pneumonia. Esse vírus, infecta praticamente todas as crianças até os cinco anos de idade (Boncristiani et al. 2009). Normalmente causando sintomas, a frequência em pessoas assintomáticas é menos de 3% (Howard et al. 2015; DeMuri et al. 2018).

Estima-se, que no EUA os gastos anuais em hospitalizações associadas ao hPIV foram de aproximadamente: bronquiolite = US\$ 43 milhões, crupe = US\$ 58 milhões e pneumonia = US\$ 158 milhões (Abedi et al. 2016).

Alguns estudos realizados no Brasil em crianças com IRA, a frequência variou cerca de 19,9%, para o HPIV-3 de 8,3% até 83,76%, HPIV-1 de 0,6% até 11,96% e HPIV-2 cerca de 4,27%, (Thomazelli et al. 2007; Fé et al. 2008; Pecchini et al. 2015). Esse vírus varia a sua frequência ao longo dos anos, e é distinto entre as regiões do Brasil.

Em um estudo realizado entre 1990 até 2017 no LACEN - RS, com 20.475 amostras de nasofaríngeas de pacientes com SARG, 781 foram positivos para hPIV. Ao longo do tempo, a prevalência desse vírus variou de 2,14% a 27% das infecções respiratórias virais. O hPIV1 circula principalmente durante o outono, o hPIV3, inicia no outono e atinge o pico durante a primavera; e casos de hPIV2 foi relatado o ano todo, com picos no outono e início da primavera. A faixa etária mais acometida foi a infantil, com prevalência de hPIV de até 74,23% em pacientes com menos de 1 ano (Gregianini et al. 2019).

1.3.4. Rinovírus humano (hRV)

O hRV é não envelopado, com genoma de RNA de fita simples de sentido positivo, pertencente à família *Picornaviridae*. Conhecido por ser o vírus respiratório mais frequente detectado em IVAS, sendo a coinfeção com outros microrganismos é

bastante comum, o que dificulta o entendimento da função de cada microrganismo na doença (Greenberg 2016).

Este vírus tem um período de incubação curto de dois à três dias, após esse período inicia-se o processo inflamatório local, com edema e infiltração celular, levando à obstrução e rinorreia sendo comumente associado a dor de garganta (Harris and Gwaltney 1996; Kenealy 2014). A relevância da hRV na saúde humana foi subestimada por muito tempo na era pré biologia molecular, atualmente além do resfriado comum (Heikkinen and Järvinen 2003; Jacobs et al. 2013), tem sido relatado em faringite, crupe, OMA, também IVAI como bronquite, bronquiolite e pneumonia (Renwick et al. 2007; Chonmaitree et al. 2008; McErlean et al. 2008; Miller et al. 2009). Essas infecções não são somente relatadas em crianças e adultos previamente saudáveis, é comum em indivíduos asmáticos, com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística e imunocomprometidos, o hRV nesses grupos apresentam sintomas e gravidade variáveis, e está associado à alta morbidade e mortalidade (Kesson 2007; ANVISA 2013; To et al. 2016; Cox et al. 2018; Fisher et al. 2018; Lopes et al. 2020; Kan-O et al. 2022).

Dentro dos vírus respiratórios patogênicos, o hRV é o mais frequente em pessoas híginas (Jansen et al. 2011; Chonmaitree et al. 2015; Howard et al. 2015; Self et al. 2016). E ainda não se tem um consenso da grande diferença do hRV na saúde/doença, mas acredita-se que alguns fatores estão envolvidos como as diferentes espécies (A-C), algumas mais frequentemente associadas a IVAI que outras (McErlean et al. 2008; Miller et al. 2009), a carga viral é mais alta em indivíduos doentes (Jansen et al. 2011; Chonmaitree et al. 2015; Baillie et al. 2020), a detecção prolongada pós-infecção também é relatada, normalmente até 2 semanas, mas há relatos que o RNA do hRV pode demorar de 5-6 semanas para desaparecer do muco nasal (Jartti et al. 2004). Em especial, indivíduos que vivem com crianças, têm até 3 semanas adicionais de detecção do vírus (Byington et al. 2015).

Jansen e col. em 2011 realizaram um estudo prospectivo de caso-controle, em que foram incluídas amostras da nasofaringe de crianças menores de 6 anos, 157 assintomáticas e 141 sintomáticas. Concluíram, que pelo menos um vírus foi detectado em 72% dos sintomáticos e 28% dos assintomáticos. O hRV foi o mais frequente tanto nos casos como controles, mas, ao quantificar a carga viral em

amostras positivas somente para o hRV puderam observar diferenças entre os grupos. Concluíram, que em amostras com carga viral acima ou igual a $10^{4,5}$ cópias/ml, é muito provável que esse vírus seja a causa da doença apresentada (Jansen et al. 2011).

O hRV é circulante durante todo o ano, principalmente na primavera e outono, casos de infecções graves são comuns no inverno (Moriyama et al. 2020). Estima-se, que o hRV cause até 80% de todos os resfriados de outono em adultos nos Estados Unidos, e cerca de 50% de todas as infecções respiratórias em crianças ambulatoriais em áreas tropicais (Boncristiani et al. 2009).

Em um estudo realizado no centro-oeste brasileiro, foram incluídas 225 crianças de 4-14 anos de idade, com IRA e assintomáticas. O vírus mais frequente detectado foi o hRV (28,6%), a grande maioria em sintomáticos, mas não teve significância estatística entre os grupos (Castro et al. 2020).

Ambientes hospitalares, também merecem atenção pois surtos nosocomiais do hRV são descritos, e estão associados ao aumento da morbidade em pacientes de alto risco (Van Piggelen et al. 2010; Steiner et al. 2012). Alguns estudos brasileiros com crianças hospitalizadas com PAC, pelo menos um vírus respiratório foi detectado em 42-43% dos pacientes, o mais frequente foi hRV com 68% das amostras positivas para vírus e 21% de todas as PAC, apresentando associação com pneumonia leve (Nascimento-Carvalho et al. 2008; Ferreira et al. 2019).

Em estudos realizados no Brasil, com crianças menores de dois anos hospitalizadas com bronquiolite aguda, o hRV foi identificado como agente crítico na bronquiolite grave em lactentes, cerca de um quarto de todas as amostras com vírus respiratório detectado foram positivas para hRV, o segundo mais frequente, seguido apenas do RSV (Pitrez et al. 2005; Bastos et al. 2021).

Uma pesquisa realizada no sul do Brasil, com 775 pacientes hospitalares com suspeita ou diagnosticados com SARG, 444 foram positivas para vírus respiratório, na grande maioria crianças menores de 2 anos, sendo hRV (36,4%) e RSV (36,3%) os vírus mais frequentes (Faggion et al. 2019).

1.3.5. Bocavírus (hBoV)

O hBoV é não envelopado, com genoma de DNA de fita simples, pertencente à família *Parvoviridae*. Este vírus foi descoberto somente na era pós biologia

molecular, e devido a isso não tem sua patogenicidade bem definida, a falta de cultura viral e modelos animais, até mesmo dos critérios de causalidade molecular levam a subjetividade quanto a sua relevância clínica. Sendo bastante comum em pacientes com hBoV detectável também serem positivos para outros vírus respiratórios (Boncristiani et al. 2009; Chonmaitree et al. 2015; Malta et al. 2020). Acredita-se, que esse vírus circule durante o ano todo, mas há indícios de sazonalidade mais caracterizada em países de clima temperado, ocorrendo principalmente durante o fim do outono, inverno e começo da primavera (ANVISA 2013). Esse vírus tem um período de latência de 1 à 2 semanas, e os sintomas clínicos são semelhantes à observada para infecções por RSV. A otite média aguda pode estar presente em cerca de 40%, e sintomas gastrointestinais são relatados em até 25% dos pacientes (Boncristiani et al. 2009). No Brasil, (Campos et al. 2016) encontraram 42% de amostras de fezes positivas para hBOV em crianças com gastroenterite aguda (GEA) em um estudo realizado em Salvador, Bahia. Contudo, outra pesquisa foi realizada com crianças de até 2 anos de idade, durante 2016 e 2017. Foram incluídos dez estados brasileiros, com 886 amostras de fezes de GEA, e o hBoV foi detectado em 12,4% (110) das amostras. Desses, coinfeções foram observadas em 79,1% sem diferenças significativas entre a carga viral de hBoV em infecções únicas ou coinfeções (Malta et al. 2020). O monitoramento contínuo do hBoV é necessário para esclarecer a sua função na GEA, principalmente na ausência de vírus gastroentéricos clássicos, como rotavírus e norovírus.

Também existem relatos de PAC, em um estudo realizado em Salvador no Brasil, com 820 crianças diagnosticadas com PAC, em 20,9% (159) dos casos foi detectado o hBoV1, desses a infecção aguda foi confirmada com sorologia em 38 casos (23,9%) (Nascimento-Carvalho et al. 2018).

Em um estudo no Rio Grande do Sul, em crianças de até 2 anos de idade com suspeita de IRA, com 455 aspirados nasofaríngeos testados para vírus respiratórios, o hBoV foi detectado em 13,2% das amostras, sendo 98,3% destes com coinfeção com outros vírus (Pilger et al. 2011).

Já em um estudo realizado na cidade de Porto Alegre, RS/Brasil, foi avaliada a frequência de hBoV em crianças menores de 2 anos com episódios de IVAI, foram incluídas 455 amostras de secreção nasal coletadas durante um período de 14 meses (2007/2008). Desses, 13,2% foram positivos para hBoV, sendo 98,3% destes

com coinfeccção com outros vírus. A maioria da população do estudo tinha menos de 6 meses de idade (Pilger et al. 2011). O principal sintoma relatado foi a sibilância em 51,7% dos casos e 18% tiveram diarreia. Nesse estudo a distribuição do hBoV foi sazonal nos meses de inverno e foi influenciada pela temperatura, umidade relativa e precipitação (do Amaral de Leon et al. 2013).

1.3.6. Adenovírus (ADV)

O ADV é não envelopado, com genoma de DNA fita dupla, pertencente ao gênero *Mastadenovirus*, família *Adenoviridae* (Kesson 2007). Até 50% das infecções adenovirais não epidêmicas são assintomáticas. As infecções sintomáticas geralmente se iniciam no epitélio respiratório superior, e podem causar doenças em todo o TR e sintomas gastrointestinais. A infecção por esse vírus resulta em necrose das células do epitélio das vias aéreas, e pode causar viremia por disseminação sistêmica do vírus em pessoas imunocomprometidas. O período de latência tem uma média de 10 dias, e os sintomas habituais são os de um resfriado febril, já em crianças a febre pode ser alta e duradoura. São também comuns os quadros de faringite semelhante à causada por *Streptococcus pyogenes*, febre faringoconjuntival, conjuntivite frequentemente unilateral, adenopatia pré-auricular, tosse e rinite. A complicação mais frequente, dos resfriados adenovirais é a otite média aguda (Boncristiani et al. 2009; Lynch and Kajon 2016). Esse vírus causa IVAI como bronquite e pneumonia, as taxas de mortalidade para pneumonia grave por ADV não tratada ou doença disseminada podem exceder 50% (Lynch and Kajon 2016). Há indícios de ser o vírus mais frequente em pós-infecções por bronquiolite obliterante (Fischer et al. 2002; Colom Aj. 2018). Esse vírus é circulante durante o ano todo, e alguns sorotipos são mais detectados em crianças menores de 5 anos (Boncristiani et al. 2009; ANVISA 2013).

Em um estudo retrospectivo durante 2006-2011, foram incluídas 5.035 amostras fecais de diferentes regiões do Brasil, utilizando qPCR para detecção de ADV. Foram detectados 198 casos (3,9%), com maior taxa em crianças ≤ 5 anos (Souza et al. 2021).

Em um estudo de vigilância realizado no nordeste brasileiro com crianças menores de 5 anos com síndrome gripal durante 3 anos consecutivos, o ADV foi o segundo mais frequente, variando de 8 a 15% durante os anos. Um estudo brasileiro recente demonstrou que em crianças hospitalizadas com PAC confirmado por radiografia,

43% apresentavam pelo menos um vírus, em 14% foi detectado ADV (Ferreira et al. 2019).

(Pscheidt et al. 2021) investigaram o ADV em pacientes com infecção respiratória, em 5 cidades de regiões diferentes do Rio Grande do Sul, entre 2004 e 2018. Foram analisados 43.514 casos de infecção respiratória, sendo 20,5% IRA ambulatorial e 79,5% internados por SARG. Os vírus respiratórios foram identificados por teste de imunofluorescência. Foram 35,8% dos casos positivos para algum vírus respiratório, desses 2,8% para ADV. Destaca-se, que 30,8% dos pacientes ambulatoriais eram crianças de 1 à 5 anos. Dos casos de SRAG, 88,2% eram pacientes pediátricos, 3% foram a óbito, e a maioria apresentava pelo menos uma condição de base, como cardiopatia e imunossupressão. Ao analisar a sazonalidade do ADV, foi observado que circulou durante todo o ano, com maior frequência durante o inverno e início da primavera; aumentos na temperatura média mensal foram associados a diminuições nas infecções por ADV.

1.3.7. Influenza virus (INF)

Conhecido como vírus da gripe, o INF é envelopado, com genoma de RNA de polaridade negativa, pertencentes à família *Orthomyxoviridae*. Esse vírus ocorre no mundo todo, causando infecções respiratórias altamente contagiosas, com alta morbidade e mortalidade. Conhecido pelas pandemias de 1918, 1957, 1968 e 2009, causando a morte de milhões de pessoas por todo o mundo (Peteranderl et al. 2016).

As infecções causadas por esse vírus podem ser prevenidas por vacina. Por ser um vírus altamente mutável é necessário adequar a vacina anualmente, para isso, é realizada uma monitoração do vírus circulante em todo mundo para a modificação da vacina. Para entender a composição da vacina e o monitoramento, é preciso entender os dois principais mecanismos de mutação do INF. "Antigenic Drift" são mutações nos genes do INF que podem levar a alterações nas proteínas de superfície do vírus: HA (hemaglutinina) e NA (neuraminidase). Essas proteínas são "antígenos (Ag)" reconhecidos pelo sistema imunológico e capazes de desencadear uma resposta imune, incluindo a produção de anticorpos (Ac) contra a infecção. A grande maioria das vacinas são projetadas para atingir as proteínas/antígenos de

superfície HA dos vírus da gripe, porém as mutações acontecem continuamente ao longo do tempo à medida que o vírus da gripe se replica. Essa é a principal razão pela qual a composição da vacina necessita de modificação anual. Menos frequente mas abrupta a "Antigenic Shift" é um rearranjo genético, que pode resultar em um novo subtipo. Foi o que aconteceu em 2009, que surgiu o H1N1, e as pessoas não tinham imunidade a essa nova combinação do INFA, se espalhando rapidamente, causando uma pandemia (CDC 2021a).

No Brasil, o monitoramento de INF com finalidade de obter informações para composição vacinal é feito por uma rede de postos sentinela comandada pelo Ministério da Saúde, com participação de laboratórios de várias regiões do país. A campanha de imunização contra a gripe ocorre anualmente, iniciando em abril (ANVISA 2013; CDC 2022b). A gripe clássica causada por influenza começa abruptamente depois de um período de incubação de 1 à 2 dias. Podendo vir a causar uma variedade de complicações, incluindo otite média, sinusite, traqueobronquite e pneumonia. Infecções bacterianas secundárias são muito comum, devido a sua fácil disseminação, esse vírus tem causado surtos de infecções nosocomiais no mundo todo (Zhou et al. 2012; Sumitomo et al. 2021). Outras complicações graves podem incluir inflamação do coração (miocardite), tecidos musculares (miosite, rabdomiólise), cérebro (encefalite), sepse e falência de múltiplos órgãos (por exemplo, insuficiência respiratória e renal) (CDC 2021b).

No sul do Brasil os surtos sazonais de INF-A ocorrem anualmente de maio a agosto, em associação com o frio. INF-B tende a ocorrer junto com A, mas menos frequentemente, enquanto influenza C ocorre de maneira não sazonal. No último boletim epidemiológico brasileiro de INF do período pré-pandemia da SARS-Cov-2, segundo o Ministério da Saúde de 2020, foram confirmados para influenza 17,6% (5.800) do total de 32.963 de casos notificados de SARG. Entre as notificações dos óbitos por SRAG, 22,0% (1.122/5.089) foram confirmados para influenza. As regiões Sudeste (14923 dos casos e 472 óbitos) e Sul (10223 casos e 270 óbitos) representaram a grande maioria das notificações (Ministério da Saúde, 2020). Outro estudo brasileiro demonstrou que em crianças hospitalizadas com PAC, 43% apresentavam pelo menos um vírus, desses apenas em 5% foi detectado INF e associado a casos graves (Ferreira et al. 2019).

1.3.8. Coronavírus (HCoVs)

A família *Coronaviridae* não será o foco da presente tese. Contudo, devido ao atual cenário de pandemia causada pelo SARS-CoV-2, é oportuno uma breve síntese desta família de vírus respiratórios. São vírus de genoma de RNA, atualmente sete HCoVs foram identificados, conhecidos por causar epidemias como o coronavírus da síndrome respiratória aguda severa (SARS-CoV), síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) que ocorreram em 2002 à 2003 e 2012, respectivamente, e a SARS-CoV-2, que se iniciou em 2019 (Liu et al. 2021), e persiste até a escrita da atual tese. E os endêmicos que são: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1. Com foco nesses vírus endêmicos, um estudo realizado no Rio Grande do Sul entre os anos 2013 e 2017, com amostras de aspirados/swabs nasofaríngeos provenientes do LACEN-RS. Foram incluídos 273 pacientes que morreram por SARG, sem comorbidade e não tiveram identificação por INF A/B, RSV, hADV, e hPIV. Foi detectado por qPCR, 9 casos de HCoV endêmicos, e todos provenientes de pacientes adultos (Veiga et al. 2021).

1.4. *Streptococcus pneumoniae*

O microrganismo *Streptococcus pneumoniae* (informalmente conhecido como pneumococo) pertence ao Reino Monera, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales, Família Streptococcaceae e Gênero *Streptococcus*, atualmente são reconhecidas 117 espécies pertencentes a este gênero (LPSN).

O pneumococo é um coco Gram-positivo, no presente, 48 sorogrupos são catalogados com base em diferenças na constituição antigênica da cápsula polissacarídica (Geno et al. 2015) e, em 2020, foi identificado o 100º sorotipo, o 10D (Ganaie et al. 2020). Apresenta condições de crescimento especiais, pois além de ser anaeróbio facultativo, necessita meio de cultura rico e acrescido de 5% de sangue de carneiro, cavalo ou coelho, sua temperatura de crescimento é de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. As características morfológicas celulares e coloniais como determinação do tipo de hemólise, susceptibilidade à optoquina e bile solubilidade diferenciam o *S. pneumoniae* dos demais integrantes do grupo *viridans*, que inclui diferentes espécies de estreptococos (Spellerberg & Brandt, 2011).

O espectro clínico das infecções por pneumococo varia de doença pneumocócicas invasiva (DPI) que atinge locais normalmente estéreis, incluindo osteomielite, bacteremias, pneumonia com bacteremia, artrite séptica e meningite à infecções não invasivas, como pneumonia sem bacteremia, otite média aguda (OMA) e sinusite (Gierke et al. 2021). É reconhecido como principal agente de sinusite, OMA, e pneumonia, especialmente em crianças e idosos (Simell et al. 2012; Geno et al. 2015). Na pediatria, as doenças pneumocócicas (DP) são comuns em crianças menores de 5 anos: a meningite e OMA geralmente ocorrem entre 6-18 meses, bacteremia entre 6-36 meses, infecções ósseas ocorre entre 3-34 meses e a pneumonia entre 3 meses e 5 anos (Pineda Solas et al. 2002). O pneumococo é a principal causa de meningite bacteriana em crianças menores de 5 anos (OPAS 2020; Gierke et al. 2021). A meningite pneumocócica tem carga expressiva de sequelas e complicações, cerca de 40% das crianças brasileiras que tiveram meningite evoluíram com sequela neurológica como hidrocefalia, déficit intelectual, perda visual, déficit psicomotor e até 60% pode vir a ter perda auditiva (Berezin et al. 2002).

As estimativas da OMS em 2005 revelaram que 1,6 milhão de crianças morriam a cada ano pelas DP, sendo 0,7 a 1 milhão delas menores de 5 anos de idade; a alta mortalidade foi a principal preocupação para o desenvolvimento da vacina pneumocócica (WHO 2007). Devido à implementação mundial das vacinas pneumocócicas, está ocorrendo uma diminuição significativa da mortalidade por DP ao longo do tempo. Ainda, o microrganismo ainda causa cerca de 294.000 a 341 029 mortes anuais em crianças menores de 5 anos (GBD 2018; Wahl et al. 2018). Em um estudo de dados globais e regionais de DP em 2015, concluíram que na faixa etária de menores de 5 anos, a taxa global de mortalidade por DP foi de 45 mortes por 100.000 casos. Ademais, na região das Américas foram relatados 5.700 mortes, e a taxa de mortalidade foi estimada em 8 mortes a cada 100.000 (Wahl et al. 2018).

Dentro das DPI no Brasil, a incidência em 2018 em crianças menores de 2 anos foi 21,0 por 100.000 habitantes; 2-4 anos foi 9,9/100.000 (Perdrizet et al. 2021). Segundo o Ministério da Saúde em 2020 no Brasil, em crianças menores de 5 anos as DPIs mais prevalentes foram bacteremias com 61,0% dos casos, seguido de meningite com 20,3%, já a pneumonia teve apenas 16,9% dos casos e 1,7% outras

DP (SIREVA 2020). Porém, a pneumonia bacteriana não é uma doença de notificação compulsória no Brasil, como os casos de meningite e bacteremias, sendo possível que os dados disponíveis estejam subestimados para as pneumonias. Segundo dados mundiais, a PAC é a doença grave mais frequente em crianças, causando 81% e a meningite 12% de todas as mortes relacionadas com a infecção pneumocócica (Wahl et al. 2018; OPAS 2020).

1.4.1. Pneumonia Pneumocócica em crianças

A pneumonia é caracterizada como uma IRA que afeta os pulmões, é o acúmulo de líquido exsudativo no parênquima pulmonar, que compromete a função respiratória. A complicação mais comum é o derrame parapneumônico, caracterizado pelo acúmulo de líquido pleural (LP), que excede a capacidade de drenagem linfática da pleura parietal (Hooven and Polin 2017; Quinton et al. 2018; WHO 2021). Em casos mais graves, quando se configura empiema, o LPI torna-se purulento (Smith et al. 1991). Por fim, pode ocorrer a exacerbação para uma infecção sistêmica, sendo a pneumonia uma das causas de sepse (Rigatto et al. 2011; Mayr et al. 2014).

De acordo com o Global Burden of Disease (GBD) de 2016, a pneumonia pneumocócica foi a principal causa de doença e óbitos, responsável por 1.189.937 mortes e 197 milhões de episódios, causando mais mortes do que todas as outras etiologias combinadas. A doença pneumocócica acomete principalmente a faixa etária de maiores de 60 anos e menores de 5 anos, e mais de 90% das mortes ocorrem em países de baixa e média renda (GBD 2018; McAllister et al. 2019). Na região das Américas, dentro das PAC bacterianas, o pneumococo é o agente etiológico mais frequente, identificado cerca de 26% dos casos (OPAS 2020).

Estima-se, que a pneumonia é responsável por 14% de todas as mortes de crianças menores de 5 anos, levando à morte de 740.180 crianças em 2019 (WHO 2021). De acordo com dados mundiais de 2016, o pneumococo foi responsável por 52% dos casos fatais de pneumonia em crianças (GBD 2018). Nos estudos que analisam crianças com PAC grave, com derrame parapneumônico, o pneumococo ainda é o microrganismo mais prevalente, cerca de 50 à 59% dos casos em crianças (Feris-Iglesias et al. 2014; Masters et al. 2017; Ahmed et al. 2021; Ebruke et al. 2021). O pneumococo é o principal agente de pneumonia bacteriana nessa faixa

etária, levando a cuidados intensivos, altas taxas de hospitalização e mortalidade (Jain et al. 2015; GBD 2018).

Estima-se, que no Brasil a ocorrência de pneumonia em crianças com diagnóstico clínico é cerca de 315.954 casos anuais, e 196.398 casos de pneumonia confirmada radiologicamente (Vespa et al. 2009). A taxa de hospitalização anual por pneumonia é elevada, principalmente entre crianças no primeiro ano de vida (aproximadamente 3.433/100.000) (Andrade et al. 2017). Contudo, segundo dados globais de pneumonia, a mortalidade no Brasil vem diminuindo consideravelmente no grupo etário menor de 5 anos. A organização *JustActions*, descreve um declínio de 87% da mortalidade no período de 1990 à 2017 (JustActions 2018), passando de 35.810 para 4.490 óbitos, sendo que a taxa de mortalidade em 2017 foi de 29,24 a cada 100.000, ainda para o ano de 2017 (GBD 2018; McAllister et al. 2019). Embora a significativa queda das taxas de mortalidade no Brasil, a quantidade de hospitalizações e o tratamento de alto custo são um desafio para a saúde pública. Em suma, dados do Ministério da Saúde em 2018, indicam a ocorrência de 417.924 casos de hospitalização por pneumonia, totalizando gastos com serviços hospitalares acima de R\$ 378 milhões, somente no período de janeiro a agosto (Ministério da Saúde, 2019a).

1.4.2. Vacinação Pneumocócica

Na saúde pública a prevenção ainda é a melhor maneira de controlar infecções de alta frequência, e mortalidade como as DP. Sendo assim, a imunização por vacinação é considerada uma das mais eficientes estratégias de intervenção na saúde mundial. A vacinação pneumocócica, protege o indivíduo concomitantemente contra a colonização e a doença, tendo assim uma ação imunizante de grande relevância (Simell et al. 2012; Briles et al. 2019).

No caso de infecções pneumocócicas, o principal alvo para o desenvolvimento de imunizantes é a cápsula, por desempenhar um papel fundamental na patogênese (Brooks and Mias 2018; Weiser et al. 2018). Apenas alguns dos sorotipos estão incluídos nas diferentes formulações das vacinas desenvolvidas até o momento. Atualmente, existem duas classes de vacinas antipneumocócicas, as polissacarídicas (VPP) e as vacinas conjugadas com carreadores protéicos as PCVs (CDC 2022c).

A primeira vacina pneumocócica implementada foi a VPP23, constituída por polissacarídeos pneumocócicos purificados. Foi criada para a imunização e prevenção da doença pneumocócica causada por 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F). A VPP23, é eficaz na prevenção de 50% à 70% das DPIs causadas pelos sorotipos vacinais. Não há consenso sobre a capacidade de prevenir a pneumonia pneumocócica não bacterêmica (Mangtani et al. 2003; Thadchanamoorthy and Dayasiri 2021). Ademais, não induz uma boa proteção em menores de dois anos de idade, e em crianças acima de 2 anos de idade, a resposta a antígenos polissacarídeos é de curta duração, sendo heterogênea em relação aos vários sorotipos. Cabe destacar, que esse tipo de vacina não induz memória imunológica (Brooks and Mias 2018). O Centers for Disease Control and Prevention (CDC), indica para um grupo específico: crianças de 2 à 18 anos com certas condições médicas, como imunodeprimidos e adultos maiores de 19 anos (CDC 2022c).

As PCVs, surgiram para reduzir o problema de imunogenicidade reduzida em lactentes e crianças da VPP. A conjugação da PCVs proporciona ao sistema imunológico de crianças menores de 2 anos identificar a proteína, possibilitando a soroconversão de anticorpos, com uma resposta mais duradoura devido à resposta humoral secundária. Portanto, as vacinas conjugadas contém polissacarídeos capsulares do pneumococo e antígenos protéicos, combinados quimicamente por meio de uma ligação covalente dos polissacarídeos com proteínas carreadoras (toxóide diftérico, toxóide tetânico, proteína D do *Haemophilus influenzae* tipo b, ou a proteína CRM197) (Rubin 2000; Kimaro Mlacha et al. 2018). Esse foi o principal fator contribuinte de resposta imune a essas vacinas. Desse modo, a PCV induz a memória T-dependente (altamente imunogênica), levam a resposta anamnésica e a proteção de longa duração (Brooks and Mias 2018).

As vacinas conjugadas promovem proteção indireta, com redução da colonização da nasofaringe por sorotipos vacinais e conseqüentemente a transmissão da doença por contactantes, impactando outras faixas etárias (que não receberam a vacina) (Hicks et al. 2007; Millar et al. 2008; Davis et al. 2013; Andrade et al. 2017; Brandileone et al. 2018; Milucky et al. 2019).

Entretanto, o pneumococo tem uma alta diversidade genética, incluindo número considerável de genótipos de sorotipos, e alguns fenômenos como *replacement* e

switching, contribuem para as modificações na distribuição de pneumococos nas populações (Weiser et al. 2018).

O *replacement*, é a substituição dos sorotipos, acontece a diminuição da prevalência de sorotipos vacinais e concomitantemente um aumento de sorotipos não vacinais. Esse fenômeno ocorre na nasofaringe de crianças saudáveis, a virulência e a patogenicidade dos novos sorotipos é que irá definir a epidemiologia das DP (Tan 2012; Geno et al. 2015; Weiser et al. 2018).

O *switching capsular* é o resultado de novas combinações capsulares, por mecanismo de transformação ou recombinação dos genes que codificam um tipo capsular por outro gene que codifica um sorotipo capsular diferente. A base genética continua a mesma, contudo ocorre a expressão de outro sorotipo capsular. O mais preocupante é quando um isolado pertencente a um sorotipo vacinal, capaz de causar DPI, adquire a cápsula de um sorotipo não vacinal; isso contribui para a doença de substituição de sorotipos através do desenvolvimento de sorotipos de “escape vacinal” (Tan 2012; Rayner et al. 2015). Esse fenômeno pode ocorrer dentro de 2 à 3 anos após a introdução de uma nova PCV (Weiser et al. 2018).

A diversidade natural na população pneumocócica e a pressão seletiva da vacinação, contribuem para o aumento da diversidade do microrganismo (Caierão et al. 2014; Ganaie et al. 2020) levando à necessidade de uma investigação contínua e atualização das PCVs.

A primeira PCV licenciada pelo Food and Drug Administration (FDA), e indicada mundialmente, foi a vacina pneumocócica conjugada heptavalente (PCV7), formada pelos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. No Brasil foi licenciada em 2002, disponibilizada em clínicas privadas de vacinação, e para indivíduos com comorbidade disponível por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), na rede nacional de Centros de Referências de Imunobiológicos Especiais (CRIE). A implementação de PCV no Programa nacional de imunização (PNI) do Brasil, só ocorreu em 2010 com a vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) com adição de outros sorotipos (1, 5 e 7F), que surgiu para contribuir na redução das DPIs. A partir de 2019, a vacina pneumocócica conjugada 13-valente (PCV13), com a inclusão dos sorotipos 3, 6A e 19A, foi disponibilizada pelo SUS, porém, somente para grupos populacionais suscetíveis à DPIs de todas as faixas etárias (Ministério da Saúde, 2019b; Grando 2013). Em 2021, foram licenciadas as vacinas PCV15

(dois sorotipos extras, 22F e 33F) e PCV20 (PCV15+8, 10A, 11A, 12F, 15B) (CDC 2022c; FDA 2021b, 2021).

A PCV10, reduz o transporte nasal e protege para DPI dos pneumococos de sorotipos pertencentes à vacina (Domingues et al. 2014). Todavia, tanto em países que aplicaram a PCV7 quando os que introduziram a PCV10, foi observado um aumento proporcional de infecções causadas por sorotipos não vacinais, especialmente 19A (Mott et al. 2014; Hendaus and Janahi 2016). A PCV13, que é constituída por sorotipos que causam até 92% das DPIs, aumentou a abrangência de proteção. Conferindo proteção para DPI e não invasivas como OMA (Dinleyici and Yargic 2009; Duggan 2010; Wiese et al. 2016). A PCV13, até hoje é a vacina multivalente que oferece melhor proteção contra infecções pneumocócicas. As PCV15 e PCV20 são muito recentes, ainda não foram implementadas mundialmente e não há dados sobre como essas vacinas funcionam em condições reais. Foram aprovadas pelo FDA porque os dados de ensaios clínicos indicam que elas causam uma resposta imune semelhante ao PCV13, protegendo infecções pneumocócicas graves (CDC 2022c).

Nos EUA, antes da implementação da PCV, eram relatados 100 casos de DPI a cada 100.000 crianças menores de 5 anos de idade em 1998, após a introdução das PCVs, (PCV7 em 2000 e PCV13 em 2010), foi constatada uma diminuição para 20 casos para 100.000 pessoas em 2010, e 9 casos a cada 100.000 pessoas em 2015 (Wahl et al. 2018).

Contudo, em alguns locais como a República Dominicana, onde foram analisados dados nacionais, pós PCV13 e anteriores à introdução da PCV13. A prevalência de pneumonia pneumocócica grave com derrame pleural foi semelhante antes e após a introdução da PCV13 (56,4% e 52,8%, respectivamente) em crianças menores de 15 anos. A proporção de casos de pneumococo causados por sorotipos vacinais foi de 86% para crianças <2 independente da introdução da PCV13, demonstrando a importância da cobertura vacinal com as 3 doses, só alcançadas até os 2 anos de idade (Ahmed et al. 2021).

Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil entre 2003 e 2009, período pré implementação da PCV10, cerca de 50% dos casos de meningite ocorreram em crianças menores de 1 ano de idade. No período posterior a 2010, o percentual reduziu para 17% nessa faixa etária. Ademais, ainda nas crianças menores de 1

ano, o coeficiente de incidência de meningites também diminuiu de 12,4 casos a cada 100 mil habitantes, em 2003, e para 2,8 casos a cada 100 mil habitantes, em 2018 (Ministério da Saúde, 2019c).

Scotta et al., 2014, em um estudo de análise retrospectiva de dados nacionais do sistema público de saúde brasileiro, estudaram a evolução da incidência da hospitalização por pneumonia nas crianças menores de 4 anos. Foram comparados os períodos pré vacinação (2002 à 2009) e após a introdução da PCV10 (2011 e 2012). Foi observado que não ocorreu uma diminuição na taxa de admissões não respiratórias, contudo, a incidência de hospitalização por pneumonia infantil no período pós vacinação apresentou uma diminuição significativa de 12,65%. Esses dados demonstram a eficácia e o impacto da vacina conjugada na saúde pública (Scotta et al. 2014). O conjunto de dados demonstra a eficácia e o grande impacto das PCVs na saúde pública nacional e mundial.

1.4.3. Colonização no processo da doença

A colonização pelo pneumococo é uma relação complexa com seu hospedeiro humano. Pneumococos são comensais altamente adaptados, e seu principal reservatório é na superfície mucosa das vias aéreas superiores dos portadores que possibilita a transmissão. Pode colonizar a nasofaringe, por algumas semanas até meses, e então eliminados sem sintomas no hospedeiro (Austrian 1986; Donkor 2013; Loughran et al. 2019). No entanto, a colonização é um pré-requisito para a DP, podendo causar doença grave quando fatores bacterianos e do hospedeiro permitem que invadam locais, como ouvido médio, pulmões, meninges e corrente sanguínea (Weiser et al. 2018; Løvlie et al. 2020).

Os fatores de virulência desse microrganismo, juntamente com agentes imunológicos do hospedeiro, é que irão mediar todo o processo de colonização, invasão e infecção (Weiser et al. 2018). A colonização só ocorre se esse microrganismo passar por barreiras das defesas do hospedeiro que matam ou eliminam as bactérias aspiradas. O primeiro obstáculo, é a movimentação mecânica mucociliar que atua para impulsionar, para fora do hospedeiro, as partículas e micro-organismos aspirados. Algumas enzimas pneumocócicas têm a capacidade de auxiliar na superação desse obstáculo, promover a adesão à superfície epitelial e

degradação do muco (Steinfurt et al. 1989; Tong et al. 1999; Feldman et al. 2002; Nelson et al. 2007; Fliegau et al. 2013), como por exemplo, a enzima neuraminidase (Nan) (Tong et al. 1999; Orihuela et al. 2004). O pneumococo pode produzir pelo menos dois tipos de Nan (Camara et al. 1991; Tong et al. 1999; Orihuela et al. 2004), e tem a capacidade de clivar resíduos terminais de ácido siálico de glicoproteínas, glicolipídios, e oligossacarídeos na superfície celular ou fluidos corporais, como o muco. A neuraminidase também tem o potencial de revelar possíveis receptores de superfície celular para adesinas pneumocócicas (Berry et al. 1996).

Outro obstáculo, imposto aos pneumococos no processo de colonização é a capacidade do epitélio respiratório produzir peptídeos antimicrobianos que matam as bactérias em contato. Contudo, há evidências que o pneumococo tem a capacidade de neutralizar essa defesa, por modificações no seu peptidoglicano, mediado pelas enzimas peptidoglicano- *N*-acetilglucosamina deacetilase (PgdA) e atenuador de resistência a drogas (Adr) (Davis et al. 2008); outro fenômeno de sobrevivência pneumocócica, após a interação com peptídeos antimicrobianos, é a capacidade de remover a própria cápsula de superfície celular em um processo dependente da autolisina N-acetylmuramoyl-L-alanine-amidase (LytA). Diferente da autólise bacteriana clássica, durante a eliminação da cápsula, LytA promove a sobrevivência bacteriana, e é dispersa circunferencialmente ao redor da célula. A liberação da cápsula aumenta drasticamente a invasão as células epiteliais (Kietzman et al. 2016). Assim, permite uma interação próxima entre bactéria e células hospedeiras, sendo um dos fatores para o início bem-sucedido da infecção.

Outro fator de virulência utilizado pelo pneumococo é a formação de biofilmes, comunidades altamente estruturadas de células, revestidas por uma matriz extracelular, que se aderem à superfície biótica ou abiótica (Donlan and Costerton 2002; Stoodley et al. 2002). A formação de biofilme durante a colonização pode servir a vários propósitos para pneumococos, além de proporcionar uma alta aderência à superfície, o biofilme fornece um ambiente protetor e nutritivo, no qual as bactérias podem se adaptar para coexistir com o hospedeiro. Outro benefício importante das comunidades de biofilme, é a proximidade das células bacterianas entre si, bem como a proximidade com o DNA que compõem a matriz extracelular. Assim, fornece um excelente ambiente para troca de material genético, e promove a sobrevivência e adaptação ao ambiente hospedeiro (Marks et al. 2012; Chao et al. 2014).

Pneumococos, em forma de biofilme, exibem níveis mais baixos de virulência e são incapazes de causar DPI (Sanchez et al. 2011), porém, alguns estudos afirmam que alterações no ambiente nasofaríngeo causadas por infecção viral concomitante, alterações na microflora, inflamação ou outras agressões ao hospedeiro, desencadeiam a liberação ativa de pneumococos de biofilmes para outros locais. Essas bactérias dispersas, têm propriedades fenotípicas distintas, perfis transcricionais diferentes e virulência significativamente aumentada, sendo assim são mais propensas a causar DPI (Marks et al. 2013; Chao et al. 2014). Em síntese, essa é a hipótese mais bem estruturada para entender as diferenças clínicas do pneumococo colonizador (em biofilme) e patogênico (planctônico/disperso), contudo é um assunto recente e requer mais estudos para o melhor entendimento.

Além dos mecanismos citados, outros processos também mediados por fatores de virulência pneumocócicos, são essenciais para etapa inicial do processo de invasão aos tecidos do hospedeiro e progressão para doença localizada ou invasiva. Por exemplo, a aquisição de íons metálicos, em especial metais de transição como ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), que são substancial para o crescimento e sobrevivência em múltiplos nichos do hospedeiro (Honsa et al. 2013), comprometimento da atividade dos neutrófilos e a interação com o sistema complemento do hospedeiro (Standish and Weiser 2009; Hergott et al. 2015), efeitos pró-inflamatórios da toxina pneumolisina (ply) (Matthias et al. 2008; Andre et al. 2017).

Outro fator vinculado com o microrganismo e que tem relação entre a colonização e a DP, é representado por diferenças substanciais entre os sorotipos. Alguns sorotipos são encontrados apenas na região da nasofaringe, como por exemplo, os sorotipos 21, 35B e 38, raramente causando DPI. Alguns autores advogam que, durante o processo de colonização por esses sorotipos, ocorre a interação cápsula e superfície mucosa da nasofaringe, assim, induz a produção de anticorpos em indivíduos saudáveis, esse fator auxiliaria na prevenção de infecções futuras por pneumococo (Browall et al. 2014). Em contrapartida, os sorotipos de perfil invasivos são incluídos nas PCVs, e a ascensão de novos sorotipos encontrados em DPI, justificam uma constante vigilância para inclusões e atualizações de sorotipos das PCVs (ANVISA 2013; CDC 2020).

Por fim, a carga pneumocócica elevada na nasofaringe, também é um fator crucial para que ocorra a DP, além dos fatores do próprio microrganismo e hospedeiro já citados, ainda não tem uma explicação concreta sobre quais fatores desencadeiam a multiplicação exacerbada desse microrganismo na nasofaringe. Uma das hipóteses bem estudadas é a relação pneumococo-vírus respiratório (van den Bergh et al. 2012; Smith et al. 2014; Brealey et al. 2018, 2020; Sumitomo et al. 2021), que será desenvolvida no item 1.5 da presente tese.

1.4.4. Fatores que influenciam na colonização

A idade é um fator determinante para a colonização do pneumococo. A frequência de colonização é maior em crianças menores de 5 anos de idade, a prevalência de portadores de pneumococo normalmente varia de 20 à 60% nessa faixa etária (Nackers et al. 2017; Dube et al. 2018; Brandileone et al. 2019; CDC 2020). O estado de portador decresce com a idade, estima-se, que ao pneumococo colonize menos de 10% dos adultos (Ministério da Saúde, 2019b; van der Poll and Opal 2009). Em idosos com mais de 60 anos, a prevalência de portador varia de 0 à 6% (Almeida et al. 2014; Milucky et al. 2019; Arguedas et al. 2020).

Na infância, o estado de portador se determina de forma dinâmica, e a frequência de transmissão de pessoa para pessoa é maior (Weiser et al. 2018; Ferreira et al. 2019). Durante a fase pré-escolar estima-se, que o estado de portador ocorra pelo menos uma vez (Donkor 2013). Em um estudo realizado na era pré-vacinal, foram coletadas amostras da nasofaringe de crianças do nascimento até 2 anos de idade. O pneumococo foi identificado em momentos diferentes, em média, 7 vezes por criança, sendo observada uma taxa de colonização de 60% durante o período de estudo (Gray et al. 1980). Os dados referentes a idade da população colonizada, sugere que a transmissão para adultos em especial aos idosos ocorra a partir do contato com a criança portadora (Weiser et al. 2018).

As taxas de colonização variam bastante, inclusive em populações distintas. Estudos entre algumas populações indígenas, como por exemplo, os índios norte-americanos, aborígenes australianos e nativos do Alasca, observaram alta prevalência de portadores de pneumococo, e a primeira aquisição ocorre em uma idade mais jovem, em comparação com outras populações (Torzillo and Gratten 2000; O'Brien et al. 2004; Millar et al. 2009; Simell et al. 2012; Smith-Vaughan et al.

2018). Millar e col. em 2009, coletaram swab de nasofaringe de 410 crianças indígenas (Navajo e Apache) menores de 6 anos, e coletaram novamente 6 meses e 12 meses depois do começo do estudo. Concluíram, que 92% delas foram colonizadas por pneumococo pelo menos uma vez durante o estudo, a grande maioria menores de 2 anos (Millar et al. 2009).

Fatores socioeconômicos também têm influência na prevalência de colonização por pneumococo. Em países de baixa renda, a prevalência de colonização pneumocócica é maior, e a primeira colonização acontece em crianças mais jovens em comparação com países de média-alta renda (Dube et al. 2018; Weiser et al. 2018). Algumas pesquisas realizadas em países de baixa renda, com crianças menores de 5 anos e previamente hípidas, a prevalência de colonização chegou até 90% em alguns países (Nackers et al. 2017; Weiser et al. 2018).

A vacinação pneumocócica, tem ação direta na colonização e no perfil de cepas circulantes na população, uma vez que o esquema de vacinação pelas PCVs, é realizado na faixa etária de menores de 2 anos, e contém sorotipos de perfil invasivo (O'Brien et al. 2007). As PCVs, reduzem o estado de portador de sorotipos invasivos vacinais, incluindo na população não vacinada, como idosos e adultos, por meio indireto (Hicks et al. 2007; Millar et al. 2008; Andrade et al. 2017; Milucky et al. 2019). Por consequência, alguns autores defendem que a vacinação é capaz de romper a cadeia de transmissão (Biesbroek et al. 2014b).

Após a implementação das PCVs, um questionamento surgiu: a vacinação poderia levar a diminuição das taxas gerais de colonização pelo pneumococo na nasofaringe humana, resultando em disbiose da microbiota? Dessa forma, causaria o desequilíbrio na proporção entre bactérias comensais e potencialmente patogênicas, como, por exemplo, *S. aureus*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis*, com consequente aumento das doenças causadas por esses microrganismos. Alguns estudos têm investigado a microbiota da nasofaringe na era pós PCVs, e a disbiose não tem sido relatada (van Gils et al. 2011; Spijkerman et al. 2012; Biesbroeck et al 2014; Salgado et al. 2020). Salgado et al (2020), em um estudo com análise metagenômica de aspirados de nasofaringe, analisaram dois grupos distintos, compostos por vacinados e não vacinados, concluindo que a PCV10 atua promovendo uma ação alvo-específica contra pneumococo e não alterou substancialmente o microbioma nasofaríngeo.

Após a implementação das PCV, foram relatados a diminuição de taxas de

transmissão, colonização e ocorrência de DPI de sorotipos vacinais (Domingues et al. 2014; Andrade et al. 2017; Turner et al. 2020). Em contrapartida, as taxas gerais de colonização por pneumococo não têm demonstrado grandes variações (Spijkerman et al. 2012; Adler et al. 2019; Brandileone et al. 2019; Ceyhan et al. 2021). Uma das justificativas é a pressão seletiva causada pelas PCVs, ou seja, a substituição dos sorotipos não vacinais que vieram a ocupar o nicho dos sorotipos vacinais, relatada tanto na população colonizada quanto em DP (Hicks et al. 2007; Brandileone et al. 2016, 2018; Neves et al. 2017; Tin Tin Htar et al. 2019).

Fatores ambientais são bem descritos como possíveis desencadeadores de DP, em locais de climas não tropicais, normalmente exibem uma sazonalidade de DPI no inverno (Dowell et al. 2003; Lin et al. 2009). Já outros fatores, como poluição do ar (Kim et al. 1996), baixa radiação UV (White et al. 2009) e baixa temperatura do ar (Nascimento-Carvalho et al. 2010) também parecem ter uma relação positiva com DP. Contudo, a influência na colonização ainda não é bem clara. Alguns autores defendem que a colonização também tem relação com períodos mais frios (Gray et al. 1982; Weiser et al. 2018), porém, concluem que o clima tem o papel de aumentar a suscetibilidade do hospedeiro ou outros fatores predisponentes, em vez do aparecimento e desaparecimento do patógeno, como uma explicação subjacente (Dowell et al. 2003). Além disso, as IVAI causadas por vírus característicos de inverno, também parecem influenciar a aquisição de pneumococos (Gray et al. 1980; van den Bergh et al. 2012; Marks et al. 2013; Arruda et al. 2014; Smith et al. 2014; Bakaletz 2017). Ademais, alguns estudos abrangentes demonstram, que pode existir um fenômeno sazonal na aquisição de novas cepas de pneumococo, com taxas mais altas nos meses de inverno (Gray et al. 1980; Al-Lahham 2020). Contudo, por intermédio de uma análise metagenômica que analisou a diversidade do microbioma nasofaríngeo de crianças saudáveis ao longo das estações, foi observado que no outono-inverno ocorre a predominância de *Proteobacteria* e *Fusobacteria*, e durante a primavera, dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (filo a que pertence o pneumococo). Essas diferenças foram independentes de coinfeção viral e/ou uso recente de antimicrobianos (Bogaert et al. 2011). Um fator que influencia na divergência entre taxas de colonização, é a metodologia utilizada para identificação do pneumococo. Quando detectado por PCR, as taxas de colonização são muito maiores do que identificação por cultura pneumocócica. Em um estudo de vigilância congolês, que utilizou qPCR para identificação do pneumococo de

amostras da nasofaringe de crianças, encontrou taxa de colonização de 86% (Muhandule Birindwa et al. 2020), o mesmo grupo de pesquisa em outro estudo havia encontrado 21% de taxa de colonização, esse por sua vez utilizou a técnica de cultura (Birindwa et al. 2018). A hipótese dessa diferença, é a alta sensibilidade da técnica de PCR em comparação com a cultura bacteriana (Espy et al. 2006). Contudo, para analisar a colonização por pneumococo em uma população, a coleta da amostra é realizada na nasofaringe e/ou orofaringe, que são locais com microbiota enriquecida e propício à troca genéticas entre microrganismos. No caso do pneumococo, ainda não há um consenso sobre a utilização de testes moleculares para estudos de colonização pneumocócica. Alguns autores defendem, que as técnicas moleculares seriam prejudicadas pela frequente troca genética entre pneumococos e outros estreptococos do grupo viridans, principalmente *S. pseudopneumoniae* e *S. mitis* (Whatmore et al. 2000; Arbique et al. 2004; Tavares et al. 2019). Outros autores consideram, que os alvos moleculares *LytA* e *piaB* (gene permease do transportador pia ABC), utilizados para ensaios de qPCR, são 100% específicos para *S. pneumoniae* (Trzciński et al. 2013; Wyllie et al. 2017).

1.5. Interação pneumococo e vírus respiratórios no trato respiratório (TR)

Os vírus respiratórios e pneumococo causam doenças em crianças, sobretudo em menores de 5 anos. A coinfeção por esses microrganismos em IRAs, é descrita na literatura (Korppi et al. 1989; Palacios et al. 2009; Techasaensiri et al. 2010; Hishiki et al. 2011; Moore et al. 2012; Yoshida et al. 2013; Jiang et al. 2017) como por exemplo, em pneumonias (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009; Nascimento-Carvalho et al. 2010; Jiang et al. 2017; Nolan et al. 2018; Yun et al. 2019), bronquiolite (Duttweiler et al. 2004; Thorburn et al. 2006) e OMA (Henderson et al. 1982; Pettigrew et al. 2011; Chonmaitree et al. 2015). Em estudos clínicos de coinfeção, há evidências crescentes de maior gravidade da doença durante IRA polimicrobiana em crianças pequenas (Korppi et al. 1989; Juvén et al. 2000; Okada et al. 2011; Vu et al. 2011). A coinfeção por bactérias está associada a aproximadamente 40% das infecções respiratórias virais, que necessitam de hospitalização (Falsey et al. 2013). Também é relatado, internações hospitalares mais longas e de maior gravidade da doença, especialmente em doenças como pneumonia e bronquiolite (Michelow et al. 2004; Kurz et al. 2013; Ricart et al. 2013).

As DPIs, têm sido observadas mais frequentemente durante os meses de inverno, muitos autores defendem, que é atribuído à cocirculação temporal de vírus respiratórios, especialmente com ADV, MPV, INF, RSV e hRV (Kim et al. 1996; Talbot et al. 2005; Watson et al. 2006; Kuster et al. 2011; Peltola et al. 2011; Moore et al. 2012; Choe et al. 2020).

Techasaensiri e col em 2010, realizaram uma análise retrospectiva de registros de crianças com DPI tratadas em um centro médico de Dallas/EUA, durante os anos de 2005 à 2008. A grande maioria (48%) eram crianças menores de 2 anos. Foi identificado vírus respiratórios em 34% dos pacientes com DPI. O vírus mais comum identificado foi o INF, seguido do hRV, ADV e RSV. Sobretudo, foi observado um padrão sazonal durante os 3 anos de estudo, com os picos de diagnósticos virais positivos entre novembro e fevereiro, coincidindo com o número máximo de pacientes com DPI. Nesse estudo não foram observadas características clínicas distintas entre DPI, com ou sem a presença dos vírus respiratórios. Porém, dos 6 pacientes que vieram a óbito por DPI, 3 tinham infecções virais documentadas (2 ADV, 1 PIV3), e todos os outros 3, não foram realizados testes para vírus respiratórios (Techasaensiri et al. 2010).

Em um estudo epidemiológico realizado por (Peltola et al. 2011) na Finlândia, foram analisados dados nacionais durante os períodos de 1995 e 2007 (período pré-PCVs). Observaram, que a taxa média de DPI em crianças menores de 5 anos, foi significativamente maior durante os períodos de alta atividade de hRV em comparação com períodos de baixa atividade de hRV. Também concluíram, que a taxa de DPI foi moderadamente aumentada durante os períodos de alta atividade do RSV. Esse estudo sugere, que a infecção por hRV e RSV pode contribuir para o desenvolvimento de DPI na população de crianças pequenas menores de 5 anos (Peltola et al. 2011).

Choe e colaboradores, realizaram uma análise retrospectiva de 2010 à 2018 nos EUA, incluíram indivíduos menores de 18 anos, com teste positivo para vírus respiratório bem como hemocultura. Nesse estudo não foram incluídas análises com hRV. Foi possível constatar cosazonalidade significativa entre bacteremia, tanto com RSV como com INF. Ao observar as coinfeções, houve associação entre bacteremia e a presença de hMPV e INF, no entanto essa associação não foi

contatada para os demais vírus. Nessa pesquisa, os principais microrganismos identificados em bacteremias foram pneumococos e *S. aureus* (Choe et al. 2020).

1.5.1. Diferenças entre identificação do agente bacteriano e viral

Alguns fatores são muito importantes para entender os estudos que envolvem a relação bactérias/vírus, pois há diferenças na identificação da etiologia da doença respiratória, dificultando a comparação entre estudos. Os dois principais fatores são: o tipo de amostra utilizada e os testes utilizados para identificação dos microrganismos. Como já explicado na presente tese, a cultura ainda é a metodologia mais utilizada para identificação do agente etiológico de pneumonia, é uma técnica de baixo custo, porém menos sensível que a qPCR (Bartlett 2011; Krishna and Cunnion 2012). Geralmente para diagnósticos de IVAI, as amostras utilizadas são: escarro, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal e líquido pleural que muito frequentemente apresentam resultados negativos na cultura (Mandell et al. 2007; Prina et al. 2015; Yun et al. 2019). Alguns estudos reportam, que qPCR aumenta de 11 a 30% a detecção do pneumococo destes sítios amostrais (Feris-Iglesias et al. 2014; Ebruke et al. 2021). Por sua vez, o pneumococo é um forte candidato à frequência subestimada em cultura negativa, cerca de 70-80% dos casos de líquido pleural negativo por cultura é detectado o pneumococo por qPCR (Perez et al. 2016; Pizzutti et al. 2020; Yun et al. 2022). Em contrapartida, para estudos de colonização pneumocócica com amostras provenientes da nasofaringe, a cultura é ainda a mais indicada devido a resultados falso-positivos decorrentes de possíveis trocas genéticas entre microrganismos (Whatmore et al. 2000; Arbique et al. 2004; Tavares et al. 2019).

Para a identificação dos vírus respiratórios, a técnica amplamente utilizada é a qPCR. Atualmente, é de grande importância a utilização das técnicas moleculares para identificação dos vírus nas doenças respiratórias. A rapidez da técnica, alta sensibilidade e especificidade facilitou a identificação do agente (Coiras et al. 2004; Zhang et al. 2020). Por se tratar de um sistema fechado, o risco de contaminação dos profissionais é menor em comparação com as outras técnicas, como a cultura viral.

Alguns estudos, consideram que durante uma doença respiratória, a presença de vírus respiratórios na nasofaringe, é considerado diagnóstico de uma infecção viral ou coinfeção (Michelow et al. 2004; Cilla et al. 2008; Techasaensiri et al. 2010; Ruuskanen et al. 2011; Kurz et al. 2013). Porém, a ampla utilização de qPCR para identificação de vírus respiratório em amostras como nasofaringe, por ser uma técnica altamente sensível, aumentou muito a detecção dos vírus respiratórios, o que pode tornar a interpretação dos resultados mais complicada (Jartti et al. 2008; van den Bergh et al. 2012; Fan et al. 2016; Howard et al. 2019). A qPCR, por utilizar ácidos nucleicos para detecção viral, não necessita que o vírus esteja viável para ser identificado (Chiu 2013). Devido a isso, podem representar uma eliminação prolongada do agente ou uma infecção assintomática recente (Howard et al. 2019), especialmente quando se refere aos vírus frequentes em pessoas assintomáticas como hRV (Jartti et al. 2004, 2008; Byington et al. 2015) e hBOV (Chonmaitree et al. 2015). A quantificação da carga viral por qPCR pode ser determinante na identificação do agente em doentes. Ademais, alguns autores afirmam, que o RSV, INF, hPIV e hMPV são altamente associados aos sintomas respiratórios, indicando uma relação causal entre a detecção desses vírus e doenças do TR (Jansen et al. 2011; Chonmaitree et al. 2015; Baillie et al. 2020).

Alguns estudos realizados em diferentes locais dos EUA, tiveram como objetivo identificar os agentes etiológicos mais frequentes em crianças hospitalizadas com PAC. Observam, que os patógenos mais comumente detectados foram os vírus respiratórios, seguido do pneumococo, como a principal bactéria envolvida, porém, foi identificado em cerca de 3% dos casos. Nesses estudos utilizaram as técnicas de imunofluorescência direta ou qPCR para identificação dos vírus respiratórios de aspirados nasofaríngeos. Contudo, para identificação bacteriana utilizaram amostras de sangue, lavado broncoalveolar ou LP, e a cultura bacteriana foi a técnica realizada (Jain et al. 2015; Jiang et al. 2017; Yun et al. 2022). Embora os autores relacionem com a redução substancial da doença pneumocócica devido à introdução das PCVs, admitem que os diagnósticos baseados em cultura bacteriana têm baixa sensibilidade (Jiang et al. 2017).

(Nascimento-Carvalho et al. 2013), um estudo brasileiro, investigou prováveis etiologias entre crianças com PAC grave menores de 5 anos. Os vírus respiratórios foram detectados na nasofaringe com base em qPCR, e amostras de LP foram utilizadas para cultura bacteriana. Das 206 crianças com PAC confirmada por

radiologia, apenas 18 crianças com líquido pleural foram incluídas para identificação do agente bacteriano, dessas 5 (28%) crianças foram positivas para bactérias, sendo 2 para pneumococo; pelo menos um vírus respiratório foi identificado na nasofaringe em 9 (50%) crianças, e bactéria/vírus em 4 (22%).

Esses estudos não podem ser comparados com pesquisas que utilizam a técnica de qPCR para identificação do agente etiológico diretamente de amostras do TRI. Como por exemplo (Feris-Iglesias et al. 2014), em um estudo com crianças de um hospital da República Dominicana, em que foram comparadas as técnicas de cultura e qPCR para identificação do pneumococo, no qual observou-se o aumento de 30% na detecção de pneumococos por qPCR, sendo o pneumococo detectado em 56% dos casos. Curiosamente nesse estudo não identificaram nenhum vírus respiratório, nem RSV e hRV que são patógenos importantes na infância. Alguns autores, corroboram com a hipótese de que os vírus respiratórios não são comuns à pneumonia grave com derrame pleural (Feris-Iglesias et al. 2014).

(Zhang et al. 2015), em um estudo realizado em Pequim, com amostras de aspirado traqueal de 371 crianças com PAC, utilizaram PCR para identificação dos agentes etiológicos. Um único patógeno viral foi detectado em 35,3% dos pacientes inscritos. O agente patogénico mais frequente foi RSV (43,9%), seguido do pneumococo (20,7%), hRV (14,8%), hPIV (9,4%) e ADV (8,6%). Nos pacientes com menos de três anos, RSV (44,6%), hRV (12,8%) e pneumococo (9,9%) foram os patógenos mais frequentes. Em crianças de 3-7 anos, pneumococo (38,9%), RSV (30,6%), *H. influenzae* (19,4%) e ADV (19,4%), foram os mais prevalentes. Em crianças acima de sete anos, as infecções por RSV (47,3%), pneumococo (41,9%) e hRV (21,5%) foram as mais frequentes. Nesse estudo, utilizaram amostras de aspirado traqueal, são pacientes intubados, e essa amostra é indicada para detecção do agente etiológico de IVAI (McCauley et al. 2016). Quanto à técnica de qPCR, ainda não é amplamente utilizada para identificação de bactérias (Krishna and Cunnion 2012).

A identificação dos vírus respiratórios na nasofaringe para a PAC, ainda gera dúvidas na relação causal dessa doença, especialmente em PAC grave (Feris-Iglesias et al. 2014). A medição da prevalência e infecção viral nasofaríngea assintomática em um grupo controle pode ajudar a esclarecer. Todavia, os vírus respiratórios têm sido relatados como causa primária de PAC (Imakita et al. 2000; Ruuskanen et al. 2011), e conhecidos por causarem outras IVAI (Boncristiani et al.

2009; Falsey et al. 2013; To et al. 2016; Stein et al. 2017; Kan-O et al. 2022). Através dessas diferenças entre estudos, é de grande importância ser criterioso ao analisar as relações pneumococo/vírus respiratórios.

1.5.2. Coinfecções no trato respiratório inferior (TRI)

O conhecimento sobre a coinfeção vírus/bactéria no TRI tem aumentado e, por consequência, a epidemiologia, o diagnóstico, o manejo e dos pacientes continuam a evoluir e a mudar a perspectiva médica da IVAI (Cawcutt and Kalil 2017).

O RSV, tem sido relatado como o vírus mais frequente em coinfecções com bactérias do que qualquer outro patógeno viral em crianças (Pacheco et al. 2021). Porém, alguns estudos que avaliaram a ocorrência de coinfeção bacteriana entre crianças hospitalizadas com IVAI relacionadas ao RSV, geralmente descreveram uma baixa prevalência (0,4-3,7%) de coinfecções (Titus and Wright 2003; Bloomfield et al. 2004; Duttweiler et al. 2004; Purcell and Fergie 2004; Resch et al. 2007). As crianças internadas em terapia intensiva, no entanto, tendem a ter uma prevalência mais alta (18-45%) de coinfeção RSV/bactéria (Duttweiler et al. 2004; Randolph et al. 2004; Thorburn et al. 2006; Resch et al. 2007), e nesses estudos o pneumococo foi pouco encontrado. Os autores, justificam que a falta de ensaios sensíveis de identificação bacteriana em crianças hospitalizadas com IVAI é um fator determinante das baixas estimativas (Moore et al. 2012).

O RSV é o vírus respiratório mais bem investigado quanto à relação vírus/pneumococo (Korppi et al. 1989; Pettigrew et al. 2011; Brealey et al. 2015; Godefroy et al. 2020; Pacheco et al. 2021). Acredita-se, que as coinfecções com pneumococo ocorrem em até 30% das crianças (Korppi et al. 1989; Wang et al. 2010; Moore et al. 2012; Brealey et al. 2015) e 12% dos adultos (Godefroy et al. 2020) hospitalizadas por IVAI, relacionadas ao RSV. Em um estudo japonês com 188 pacientes pediátricos internados com infecção broncopulmonar por RSV, foram coletados na admissão hospitalar aspirados nasofaríngeos para detecção de antígeno para identificação da infecção por RSV, e lavado brônquico-alveolar para cultura bacteriana. A codetecção mais comum foi com o pneumococo em 36,6% dos casos (Hishiki et al. 2011).

Independente da técnica utilizada, os estudos de avaliação etiologia da pneumonia pneumocócica indicaram que 13-49% das crianças hospitalizadas tinham doença viral respiratória concomitante (Claesson et al. 1989; Wubbel et al. 1999; Juvén et al. 2000; Palacios et al. 2009; Wang et al. 2010; Okada et al. 2011; Honkinen et al. 2012; To et al. 2016).

Em um estudo prospectivo realizado durante 3 anos por (Juvén et al. 2000), foram incluídas 254 crianças com PAC confirmada por exame radiológicos. Foram coletados aspirados de nasofaringe para testes virais de imunofluorescência, amostras de soro agudas e convalescentes para sorologia viral e bacteriana. A coinfeção viral/bacteriana, foi demonstrada em 30% dos indivíduos. Quase metade dos pacientes positivos para RSV, hRV, hPIV ou ADV tinham evidência de infecção bacteriana concomitante. O pneumococo foi a bactéria mais comumente associada aos vírus RSV (25%), hRV (33%) e PIV (28%) dos pacientes.

Em um estudo com amostras de aspirado traqueal de 371 crianças com PAC, a técnica de qPCR foi utilizada para identificação dos agentes etiológicos. Um único patógeno viral foi detectado em 35,3% dos pacientes inscritos, coinfeção vírus/bactéria em 17,8%. O pneumococo foi identificado em 20,8% dos casos, e desses, cerca de 77,9% foi detectado concomitantemente um vírus ou bactérias (Zhang et al. 2015).

Em uma pesquisa realizada na China com 1.167 crianças com PAC, para identificação de microrganismos foram coletadas amostras de secreção nasal. A infecção mista de RSV e pneumococo foi a mais prevalente, encontrada em 35,2% dos casos (Wang et al. 2010).

O INF também foi amplamente estudado, principalmente na população adulta. Estudos desenvolvidos nos EUA, ao analisar o pulmão pós-morte de pacientes da pandemia de H1N1, 13% apresentaram infecção concomitante por pneumococo (CDC 2009; Louie et al. 2009). Em estudos no Japão e Argentina, observou-se uma associação ainda maior, no qual aproximadamente 50% dos casos graves havia também a presença de pneumococo (Palacios et al. 2009; Okada et al. 2011).

O hRV é frequentemente associado a coinfeções, especialmente com pneumococo (Juvén et al. 2000; Ruuskanen et al. 2011). Em um estudo realizado com 76 crianças com PAC, foram coletadas amostras de escarro induzido para identificação dos vírus

respiratórios por detecção de antígeno e PCR, bactérias por cultura e PCR. Os patógenos mais frequentes detectados foram o pneumococo (50%), seguindo do *H. influenzae* (38%), hRV (30%), *M. catarrhalis* (28%), hBOV (18%) e hMPV (14%). A combinação de vírus e bactéria mais encontrada foi hRV e pneumococo, em 16% dos casos (Honkinen et al. 2012).

As codetecções hRV/pneumococo também são relatadas em adultos (Jennings et al. 2008; To et al. 2016). Um estudo retrospectivo, avaliou as manifestações de hRV entre adultos criticamente doentes. Dos 294 indivíduos incluídos no estudo, 22 (7,5%) testaram positivo para hRV. Desses, mais da metade (59,1%) apresentaram pneumonia concomitante, sendo o pneumococo o copatógeno mais comum (To et al. 2016).

Em contrapartida, J(Jullien et al. 2020)), mostraram que, curiosamente, a detecção de hRV foi menos comum entre crianças colonizadas por pneumococo (28,6% versus 47,5%; $p = 0,046$). Nesse estudo, foram incluídas crianças de 2 à 59 meses com pneumonia clínica definida pela OMS. Amostras de lavagem nasofaríngea foram coletadas para teste de qPCR para vírus respiratórios e pneumococo. O pneumococo foi detectado em 76/121 crianças (62,8%). Os vírus respiratórios foram detectados em proporção semelhante, entre crianças colonizadas por pneumococo (88,6%) e as não colonizadas (90%).

Alguns autores, defendem que após a implementação das PCVs, além da redução da pneumonia pneumocócica, também pode levar a diminuição das pneumonias associadas aos vírus respiratórios (Madhi et al. 2004, 2006). Um estudo africano, duplo-cego, randomizado e controlado, com 37.107 bebês, 18.245 receberam 3 doses da PCV, e 18.268 vacinados com placebo. Observaram que, a PCV teve ação em reduzir as pneumonias associadas a vírus respiratórios em 31% ($P = 0,0004$), com estimativas pontuais semelhantes de eficácia associadas ao INFA 45%, PIV 1–3 44%, RSV 22% (Madhi et al. 2004) e MPV 45% (Madhi et al. 2006). Os autores sugerem que, a maioria das pneumonias associadas a esses vírus em crianças hospitalizadas são decorrentes de infecções bacterianas concomitantes. Por outro lado, a maioria das pneumonias pneumocócicas evitáveis por vacina em crianças hospitalizadas pode ter relação com infecção respiratória viral (Madhi et al. 2004, 2006).

1.5.3. Interações mecânicas

Para que ocorram as infecções respiratórias, os microrganismos precisam primeiro residir, mesmo que transitoriamente, no espaço nasofaríngeo. Por ser um local rico em diversidade microbiana, a proximidade entre microrganismos leva a associações entre eles, podendo haver um favorecimento para a implantação de microrganismos, ou, ao contrário, uma relação competitiva entre eles (Bosch et al. 2013). Quando é analisada a associação entre pneumococos e vírus respiratórios, há suporte teórico nas interações positivas entre esses microrganismos, aumentando a gravidade da doença e inflamação (Hament et al. 1999; Peltola and McCullers 2004; Diavatopoulos et al. 2010; Pittet et al. 2010; Verkaik et al. 2011; Marks et al. 2013; Smith et al. 2014; Nguyen et al. 2015; Joma et al. 2021). Essas interações vírus/bactéria, podem se dar na superfície epitelial respiratória e em relação ao sistema imunológico do hospedeiro.

1.5.3.1. Mecanismos de influência viral na colonização e invasão bacteriana

Alterações no epitélio respiratório do hospedeiro, decorrentes do processo de infecção por vírus respiratórios aumentam a suscetibilidade à colonização bacteriana durante uma infecção simultânea, e após a recuperação total de uma doença viral (Bogaert et al. 2004; Bosch et al. 2013). Alguns exemplos, são os vírus: INF (Sumitomo et al. 2021), RSV (Hament et al. 2004) , ADV (Håkansson et al. 1994), hRV (Wang et al. 2009) que em estudos *in vitro* aumentam a aderência do pneumococo em células do TR.

Uma das estratégias utilizadas é a regulação positiva de proteínas de adesão: as células infectadas por vírus respiratórios podem diminuir a resposta imune inata, alterando a expressão de peptídeos antimicrobianos (defensinas), que são secretados na mucosa respiratória (Ganz 2003). Durante as infecções virais, ocorrem cascatas de respostas pró-inflamatórias, que levam à regulação positiva das proteínas de adesão encontradas nas células epiteliais e, conseqüentemente, à invasão celular de organismos patogênicos. Por exemplo, os vírus RSV e hPIV regulam positivamente proteínas de membranas intracelulares e externas, como molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), fímbrias homólogas P5 (fímbrias P5),

molécula de adesão carcinoembrionária-1 (CEACAM-1) e fator de ativação de plaquetas receptor (PAFr) (Jiang et al. 1999; Avadhanula et al. 2006), esse último e fibronectina também observado em estudos com hRV (Ishizuka et al. 2003). Com a expressão dessas proteínas, os microrganismos patogênicos, incluindo o pneumococo, são capazes de aderir a essas moléculas levando à invasão das células do hospedeiro (Bosch et al. 2013). Em um estudo *in vitro*, as células epiteliais nasais humanas primárias foram infectadas com hRV e, em seguida, pelas bactérias *S. aureus*, pneumococo e *H. influenzae* (Wang et al. 2009). Foi observado que, a infecção por hRV aumentou significativamente a expressão gênica e proteica de fibronectina em células epiteliais nasais. Em comparação com células de controle não infectadas por hRV, a adesão de *S. aureus*, pneumococo e *H. influenzae* aumentou significativamente para 2,53 vezes, 1,51 vezes e 2,74 vezes, respectivamente, em relação aos níveis de controle. Os autores sugerem que, o aumento da expressão de moléculas de adesão celular do hospedeiro, pode ser o mecanismo responsável pelo aumento da suscetibilidade bacteriana associada a infecções respiratórias induzidas por hRV.

Além desses fatores, a pré-exposição por vírus respiratórios também diminui a velocidade mucociliar e a depuração do pneumococo no TR (Stark et al. 2006; Pittet et al. 2010; Smith et al. 2014). Pittet et al. 2010, utilizaram um modelo *in vivo*, com camundongos infectados inicialmente por INF, e em seguida por pneumococo. Puderam observar que, inicialmente, a infecção das células pelo INF não levou ao aumento do número de pneumococos presentes na traqueia. Contudo, a infecção por INF resultou em diminuição da velocidade mucociliar traqueal e eliminação inicial de pneumococos, levando a um rápido aumento da carga pneumocócica, cerca de 2 horas após a infecção pneumocócica.

Outro mecanismo é o rompimento da barreira do epitélio: os vírus podem desorganizar intracelularmente os processos celulares, ou destruir células infectadas por exaustão metabólica ou lise (Bosch et al. 2013). A destruição das células leva ao desnudamento da camada epitelial, expondo a membrana basal; portanto, causando a invasão de microrganismos bacterianos (Plotkowski et al. 1986). A produção de componentes virais auxiliam nesse processo, como por exemplo a neuraminidase (NA), uma glicoproteína produzida pelo INF e hPIV (McCullers and Bartmess 2003; Alymova et al. 2004; Peltola and McCullers 2004), e a proteína-G expressa nas células com RSV (Avadhanula et al. 2007; Smith et al. 2014), sendo esses fatores

capazes de destruir a integridade das células infectadas. Essa destruição expõe os receptores bacterianos e auxilia nas coinfeções bacterianas (Peltola and McCullers 2004; Avadhanula et al. 2007). (Smith et al. 2014), foram um pouco além, com algumas metodologias *in vitro* e *in vivo* (camundongos), comprovaram que a proteína G do RSV expressa extracelularmente, liga-se diretamente à PBP1a do pneumococo. Essa ligação levou a mudanças significativas no transcriptoma do pneumococo, como o aumento da expressão de genes de virulência pneumocócica. Foi constatado aumento da aderência bacteriana, da infecção do epitélio respiratório ciliado diferenciado humano, e também o aumento da mortalidade em camundongos.

Para entender o papel da NA nas interações de vírus respiratórios e pneumococo, é necessário entender que muitas das estruturas que funcionam como receptores para ligação com as bactérias, como carboidratos, da superfície celular, são recobertos de ácido siálico. Se os ácidos siálicos são clivados pôr NA, as bactérias podem aderir e invadir (Peltola and McCullers 2004). O pneumococo produz NA, e a NanA é mais envolvida na sua patogênese, cerca de 100 vezes mais ativo que NanB em pH fisiológico (Berry et al. 1996). Em um estudo com modelo *in vivo* com chinchilas, foi observado que um mutante de pneumococo deficiente em NA tem sua capacidade reduzida de alterar as estruturas de carboidratos na nasofaringe (Tong et al. 2001). Outro estudo com chinchilas, demonstrou que infecção por INFA e posterior pneumococo causou mudanças mais pronunciadas nas estruturas de carboidratos do que qualquer patógeno sozinho, sugerindo que NAs de ambos os patógenos agem sinergicamente na alteração dos carboidratos, para facilitar a invasão pneumocócica (Tong et al. 2002). Outro estudo interessante, com infecção intranasal de camundongos com um mutante pneumococo sem NanA, demonstrou ser atenuada e não causou mortalidade, em comparação com a infecção com o pneumococo tipo selvagem altamente virulento. Nesse estudo os autores afirmam que, a virulência do pneumococo sem NanA e do tipo selvagem eram semelhantes, sugerindo que o pneumococo precisa de NA para adesão e invasão no TR, mas não para expressão de virulência ou sobrevivência na corrente sanguínea. Além disso, a virulência pneumocócica sem NanA pode ser resgatada por pré-infecção com INF, demonstrando que o NA do INF pode substituir o NA pneumocócico (Peltola et al. 2005).

Por fim, os vírus respiratórios parecem ter mecanismos capazes de influenciar no aumento da virulência bacteriana. Alguns estudos demonstraram que, a febre e outros sinais de danos às células hospedeiras induzidos pela infecção por INF estimula a dispersão do biofilme pneumococo, levando a maior capacidade de se disseminar da nasofaringe de camundongos, resultando em infecção em locais como o pulmão e sangue (Marks et al. 2013; Pettigrew et al. 2014). Além disso, alterações na expressão de genes de virulência foram observadas em pneumococos, tanto após infecção por INFA (Pettigrew et al. 2014) quanto pós ligação direta ao RSV (Smith et al. 2014), ambos associados ao aumento da virulência pneumocócica em camundongos (Pettigrew et al. 2014; Smith et al. 2014).

1.5.3.2. Disfunção dos componentes do sistema imunológico

Os vírus respiratórios são capazes de prejudicar a função dos neutrófilos, por exemplo, diminuindo a explosão oxidativa e aumentando a apoptose dos neutrófilos, levando assim a suscetibilidade à infecção bacteriana (McNamee and Harmsen 2006; Stark et al. 2006). Além disso, tem sido relatado que o INF, por exemplo, torna ineficaz o recrutamento e a ativação das células natural killer (NK), facilitando a infecção posterior por pneumococo (Small et al. 2010). Os vírus respiratórios também alteram a função dos monócitos, diminuem a produção e a atividade de citocinas e impedem o encaminhamento adequado da resposta imune. Todos esses fatores auxiliam para uma maior colonização bacteriana, aumentando o risco de mortalidade e gravidade de doenças respiratórias (Raza et al. 2000; Didierlaurent et al. 2008; Kukavica-Ibrulj et al. 2009). (Kukavica-Ibrulj et al. 2009), realizaram um estudo com modelo de camundongos, com objetivo de avaliar os efeitos da infecção viral inicial com hMPV ou INF-A, e 5 dias depois, infecção por pneumococo. Concluíram que, os grupos de camundongos coinfectados tiveram perda de peso significativa e níveis mais elevados de obstrução das vias aéreas, em comparação com os grupos com infecções únicas. As contagens bacterianas foram significativamente maiores em camundongos com infecções prévias com hMPV ou INF-A. Uma inflamação intersticial e alveolar mais pronunciada se correlacionou com níveis mais altos de citocinas e quimiocinas inflamatórias, nos pulmões de animais com coinfeções. Os autores defendem que, a infecção prévia com o hMPV ou INF-A predispõe os camundongos à infecção grave por pneumococo.

Outros vírus respiratórios que foram avaliados por suas interações com pneumococo

em modelos *in vivo*, também demonstraram uma ação sinérgica no aumento da gravidade da doença. Como o PIV não é patogênico em camundongos, (Alymova et al. 2005) utilizaram uma cepa recombinante do vírus da PIV1 murino com um gene hemaglutinina-neuraminidase derivado do PIV1 humano, para simular a coinfeção entre PIV e pneumococo. Concluíram que, a coinfeção levou a perda de peso pronunciada e a morte de camundongos.

Em um estudo recente (Manna et al. 2022), se desenvolveu um novo modelo *in vivo* de coinfeção em camundongos filhotes, utilizando pneumococo e vírus da pneumonia de camundongos (PVM), um análogo murino do RSV. A coinfeção aumentou o dano ao tecido nasal e aumentou a produção da quimiocina CCL3. A densidade pneumocócica nasofaríngea e excreção nas secreções nasais foram aumentadas pela coinfeção.

1.5.3.3. Sinergismo unidirecional ou bidirecional

A maioria dos estudos aponta para uma predisposição viral unidirecional à colonização e invasão bacteriana. No entanto, existem algumas investigações quanto à hipótese de que a presença bacteriana no TR também pode aumentar a suscetibilidade a uma infecção viral consecutiva (Verkaik et al. 2011; Nguyen et al. 2015). *In vitro*, a pré-incubação de células epiteliais do TR humano com pneumococo, mostrou aumentar a suscetibilidade das células à infecção por MPV (Verkaik et al. 2011), RSV (Nguyen et al. 2010, 2015), INF (Smith et al. 2013). Para hRV, foi observado aumento da infecção em células após tratamento *H. influenzae* (Sajjan et al. 2006; Gulraiz et al. 2015).

(Nguyen et al. 2015), observaram que, algumas cepas de pneumococos aumentaram a infecção *in vitro* por RSV de células epiteliais brônquicas humanas normais. Também fizeram testes *in vivo* com um modelo de camundongo, induzindo a colonização nasal de pneumococo e, após três dias, a infecção intranasal por RSV. Concluíram que, ocorreu aumento específico de replicação (carga viral) de RSV em comparação com o grupo sem colonização por pneumococos.

(Smith et al. 2013), realizaram uma pesquisa *in vivo* com modelo de camundongos que foram infectados por INFA, e sete dias depois por pneumococo. Nesse estudo,

observaram além do aumento da aderência bacteriana às células infectadas, aumento da morte celular infectada por aderência bacteriana, diminuição induzida por vírus na fagocitose de bactérias. Observaram que, os títulos virais pulmonar ao longo de sete dias estavam decaindo; após a introdução pneumocócica ocorreu o aumento, chamado pelos autores de rebote do título viral. Concluíram que, o desafio subsequente com pneumococo após a infecção por INF, causa um aumento nos títulos virais. Os autores defendem que, esse processo pode ocorrer devido à infecção subsequente por pneumococo que aumenta a liberação viral das células infectadas (Smith et al. 2013).

No entanto, existem poucas informações mecanísticas sobre a predisposição bacteriana para doenças virais, e mais pesquisas são necessárias para desvendar até que ponto as bactérias aumentam a presença viral. O que pode ser concluído até o momento é que, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*, a coinfeção pneumocócica e diferentes vírus respiratórios aumentam a gravidade da doença respiratória, e diferentes mecanismos estão envolvidos para que ocorra esse sinergismo.

1.5.4. Relação pneumococo e vírus respiratórios na progressão e gravidade da doença respiratória

Por muitos anos, o foco das pesquisas foi o melhor entendimento da percepção clínica: a ocorrência de uma IRA viral e alguns dias ou semanas depois, o episódio de infecção bacteriana (Mills 1984; Hament et al. 1999; Duttweiler et al. 2004; Thorburn et al. 2006; Bakaletz 2010; Chertow and Memoli 2013). O pneumococo é um grande contribuinte (Petersdorf et al. 1959; Schwarzmans et al. 1971a; Faden et al. 1990; Kim et al. 1996). Historicamente, as pandemias do INF, no século XX (1918, 1957 e 1968) e em 2009, foram grandes exemplos dessa relação, visto que, uma grande parte dos indivíduos com infecção por INF, desenvolveu infecção bacteriana secundária predominantemente causada pelo pneumococo. Foi possível determinar que a infecção pelo INF, facilitou a progressão do pneumococo para a condição de um patógeno potencialmente fatal (Petersdorf et al. 1959; Schwarzmans et al. 1971b; Morens et al. 2008; Chien et al. 2009).

A pneumonia pneumocócica como consequência de infecção por INF foi bem descrita em crianças e adultos, com claro aumento da gravidade da doença (O'Brien et al. 2000; Palacios et al. 2009; Martín-Loeches et al. 2011). No entanto, exceto durante surtos, o INF é um patógeno viral relativamente pouco frequente em crianças em comparação com o hRV e RSV. A ênfase histórica nas coinfeções INF/pneumococo entre adultos levou a uma visão unidirecional das interações vírus/bacterianas, em que as consequências da infecção viral no TR são benéficas para o crescimento bacteriano, e resultam em uma infecção bacteriana (Mills 1984; Hament et al. 1999; Peltola and McCullers 2004; Peteranderl et al. 2016). No entanto, o significado clínico das coocorrências de outros vírus respiratórios com pneumococo, durante infecções respiratórias pediátricas é relativamente incerto. No entanto, a dinâmica temporal subjacente às interações virais/bacterianas na IRA pediátrica, pode ter diferenças importantes daquelas estabelecidas para INF e o pneumococo em adultos (Brealey et al. 2015, 2018; Fan et al. 2016).

Determinar a contribuição da coinfeção viral/bacteriana para a gravidade da doença é altamente complexo, principalmente na população pediátrica. Há grande diversidade de vírus e espécies bacterianas distintas, que podem causar sintomas respiratórios semelhantes (Brealey et al. 2015). Os agentes responsáveis pelos sintomas de IRA são difíceis de estabelecer a partir de amostras de TRS, pois tanto vírus quanto bactérias, podem ser transportados comensalmente na nasofaringe (van den Bergh et al. 2012; Birger et al. 2018; Dodi et al. 2021). Estudos recentes, com o objetivo de investigar mais a fundo a relação vírus respiratórios e pneumococo na doença respiratória, incluíram um grupo de comparação assintomático (previamente hígdas, sem diagnóstico de doença respiratória) ou coletas de vigilância da mesma criança antes e/ou depois de doença e/ou sintomas respiratórios (van den Bergh et al. 2012; Howard et al. 2015, 2019; Fan et al. 2016; Brealey et al. 2018; DeMuri et al. 2018; Diaz-Diaz et al. 2022). Sobretudo, observaram que, o pneumococo e os vírus respiratórios parecem ter ação sinérgica no aumento da incidência e maior gravidade de doenças respiratórias em crianças (Brealey et al. 2018, 2020; Pacheco et al. 2021; Diaz-Diaz et al. 2022).

Os microrganismos mais frequentes nas IRAs são os vírus respiratórios, e quando investigam amostras do TRS, o pneumococo tem sido identificado concomitantemente com vírus respiratórios em cerca de 30% dos casos de IRA em

crianças (Hishiki et al. 2011; Moore et al. 2012), e até 75% dos casos associados com RSV em crianças pequenas (Chappell et al.; Brealey et al. 2015, 2020).

Recentemente, um estudo longitudinal prospectivo realizado na Austrália, investigou padrões de colonização bacteriana em crianças com menos de 2 anos, no período de 4 semanas antes e depois de infecção por RSV. A bactéria predominante encontrada foi o pneumococo (61,1%). Um fator importante nesse estudo é que o pneumococo permaneceu na nasofaringe, na maioria dos casos, da semana anterior até posterior à infecção pelo RSV. No mesmo estudo, os possíveis eventos de coaquisição, em que a espécie bacteriana foi detectada pela primeira vez com RSV, e não nas 4 semanas anteriores, foram observados em aproximadamente 20% dos casos positivos para RSV e pneumococo (Brealey et al. 2020). Em outro estudo australiano, com amostras de aspirados nasofaríngeos, de crianças menores de 2 anos com IRA. A detecção do pneumococo foi significativamente mais frequente durante infecções por RSV, em comparação com outros vírus respiratórios, e a codetecção de ambos os patógenos foi associada a maiores pontuações de gravidade clínica da doença respiratória (Brealey et al. 2018).

(Diaz-Diaz et al. 2022), investigaram amostras nasofaríngeas de crianças menores de 2 anos, com infecção por RSV leve (pacientes ambulatoriais, n=115) ou grave (pacientes internados, n=566), e controles saudáveis pareados (n=161). O pneumococo, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*, mas não *S. aureus*; foram detectados com mais frequência em crianças infectadas por RSV (84%) do que em controles saudáveis (46%; $P < 0,001$). A detecção de pneumococo e/ou *H. influenzae* foi associada a febre, tratamento antibiótico mais frequente, piores achados radiológicos e contagem de neutrófilos mais alta ($P < 0,01$), concluindo que há associação com o aumento da gravidade da doença.

Em um estudo realizado na Dinamarca, foram utilizadas informações de registro sobre hospitalização por infecção por RSV e DPI. Embora não tenha sido demonstrada associação espaço-temporal entre RSV e DPI em crianças menores de 2 anos, em nível individual, a hospitalização de uma criança por infecção do TRI relacionada ao RSV nos últimos 30 dias foi associada ao risco sete vezes maior de DPI (Stensballe et al. 2008).

A OMA é uma complicação comum da IVAS, cuja patogênese envolve vírus e bactérias (Faden et al. 1997; Chonmaitree et al. 2008, 2015; Binks et al. 2011;

Pettigrew et al. 2011). Um estudo australiano, foi realizado com 366 amostras da nasofaringe, com identificação da etiologia por qPCR. A colonização por pneumococo foi maior em crianças com OMA em comparação com crianças sem evidência de otite média. As crianças infectadas com hADV, tiveram 3 vezes mais chances de ter OMA com ou sem perfuração, nenhum outro vírus teve essa relação. Também, não foi encontrada uma relação causal na OMA com codeteção vírus/pneumococo na nasofaringe (Binks et al. 2011). Todavia, Pettigrew em 2011, em um estudo com análise da carga viral e codeteção, incluiu amostras da nasofaringe de crianças com IVAS. Concluiu-se que, a alta carga viral de RSV representou aumento de 2,6 vezes o risco relativo (RR) de ter OMA. Ao analisar a codeteção, foi observado que a alta carga viral de RSV e a presença de pneumococo, parece ter uma ação conjunta, pois aumentou para 4 vezes o RR de ter OMA, em comparação com amostras sem RSV de alta carga viral ou negativas para o pneumococo (Pettigrew et al. 2011).

Com relação ao hRV e pneumococo, um estudo realizado na Finlândia, teve como objetivo descrever o impacto da infecção por hRV na aquisição e transmissão de pneumococos. Foram incluídas 29 famílias, com pelo menos duas crianças. Foi realizada a primeira coleta de swab nasal de todos da família, após qualquer indivíduo apresentar algum sintoma respiratório. Durante as próximas 3 semanas, foram realizadas novas coletas, duas vezes por semana. O hRV foi detectado por qPCR, o pneumococo foi identificado por teste de antígeno e cultura. Crianças com infecção por hRV, tiveram taxa de 4 vezes maior de adquirir pneumococos da comunidade, em comparação com crianças sem infecção por hRV. Da mesma forma, a taxa de transmissão, ou seja, de adquirir colonização pneumocócica de um familiar colonizado, foi 14,8 vezes maior em crianças com infecção concomitante por hRV (Karppinen et al. 2017).

1.5.4.1. Estudos que analisam quantificação pneumocócica

A colonização pneumocócica na nasofaringe é um fator determinante para que ocorra a DP. A partir desta premissa, a quantificação (densidade) do pneumococo por qPCR, tem sido estudada na procura do melhor entendimento do processo das IRA. São relatadas densidades mais altas na nasofaringe em pacientes doentes do que em controles saudáveis. Essa relação quantitativa, tem sido observada em

crianças com OMA (Binks et al. 2011), pneumonia (Vu et al. 2011; Jullien et al. 2020), e outras IRAs (Fan et al. 2016; Brealey et al. 2018; DeMuri et al. 2018; Howard et al. 2019). No entanto, ainda não foi identificado nenhum nível específico de densidade pneumocócica que possa estabelecer diagnósticos de doenças, como a pneumonia (Albrich et al. 2012; Baggett et al. 2017; Brotons et al. 2017).

Atualmente, ainda não são completamente compreendidos os fatores específicos que levam o aumento na densidade pneumocócica nasofaríngea durante uma IRA. Sobretudo, parece ser influenciada pela presença dos vírus respiratórios. Um dos primeiros estudos sobre este assunto, (Vu et al. 2011), investigaram crianças com PAC confirmada por radiologia, e concluíram que a densidade pneumocócica foi 15 vezes maior quando teve a presença de vírus respiratório.

Alguns estudos que comparam as mesmas crianças durante períodos assintomáticos e sintomáticos de IRA, defendem que o aumento da densidade de pneumococos e colonização na nasofaringe, tem relação com o aparecimento de uma IRA (Fan et al. 2016; Howard et al. 2019). Em um estudo peruano, em 2016, com crianças menores de 3 anos, foram coletados swabs de nasofaringe, mensalmente durante 2 anos. Assim, foi demonstrada uma evolução dinâmica das densidades pneumocócicas; um aumento gradual levando a um episódio de IRA, pico da densidade durante IRA sintomática e uma diminuição na densidade pós IRA, para níveis semelhantes aos dos períodos basais (sem IRA). Também concluíram que, grupos com IRA positivos para os vírus respiratórios tiveram densidades pneumocócicas maiores, em especial na presença do hRV (Fan et al. 2016). Em um estudo com crianças menores de 3 anos, em que foram realizadas coletas de swabs nasofaríngeos semanalmente, independentemente da presença ou não de sintomas de IRA, acabaram por concluir, que a maior densidade de colonização pneumocócica ocorreu durante e após a IRA positiva para vírus respiratórios, do que os períodos sem IRA viral (Howard et al. 2017).

Outro estudo, um pouco diferente, é o de (Vissers et al. 2016), que foram incluídos somente lactentes hospitalizados com infecção por RSV. No qual, foram empregadas amostras de aspirado nasofaríngeo durante a hospitalização, e amostras de recuperação 4-6 semanas após a alta hospitalar. Foram analisadas taxa e densidade pneumocócica, e carga viral do RSV. Nesse estudo não foi encontrada uma alteração na taxa de colonização, nem da densidade pneumocócica

após a infecção pelo RSV. Porém, uma maior densidade pneumocócica nasofaríngea foi correlacionada quando a carga viral do RSV estava alta.

Alguns autores advogam que, o aumento da densidade pneumocócica parece não ser exclusivo do aparecimento da IRA, e sim da presença dos vírus respiratórios. Tem sido observado o aumento da densidade pneumocócica, tanto com a presença de sintomas respiratórios como na ausência deles (DeMuri et al. 2018; Howard et al. 2019). DeMuri em 2018, em um estudo com o propósito de investigar alterações na microbiota da nasofaringe durante períodos de ausência de sintomas e IVAS. Foram incluídas 278 crianças, de 48 a 96 meses, inicialmente assintomáticas. Foi realizada a coleta de amostras de lavado nasal, durante 4 visitas de vigilância (fevereiro, abril, setembro e dezembro), e sempre que as crianças apresentavam sintomas de IVAS. O estudo utilizou qPCR para detecção de vírus respiratórios, pneumococo, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*. A proporção de crianças colonizadas foi determinada na visita de vigilância inicial, e foi significativamente maior para *S. pneumoniae* (54%) em comparação com outras bactérias. A proporção de crianças colonizadas com qualquer uma das 3 bactérias, foi maior durante as visitas de IVAS do que durante as visitas de vigilância assintomáticas. As densidades bacterianas médias foram significativamente maiores em todas as visitas para todos os 3 patógenos quando um vírus foi detectado. As densidades bacterianas aumentaram significativamente durante a visita de IVAS, e diminuíram para níveis próximos da linha de base durante a recuperação. O impacto da detecção do vírus na detecção e densidade bacteriana, durou cerca de 14 dias desde o início dos sintomas. O efeito do vírus no aumento da densidade bacteriana e colonização foi maior para pneumococo, especialmente na presença do hRV, e quando mais de um vírus respiratório foi detectado. Essa relação também foi observada durante infecções virais assintomáticas. Os achados desse estudo demonstram que, mesmo na ausência de sintomas, a infecção viral aumenta a colonização e densidade bacteriana. Os autores especulam que o aumento da colonização por pneumococo predispõe o paciente às complicações de IVAS.

Outro estudo que procurou entender essas relações, foi (Howard et al. 2019), no qual 849 crianças, menores de 3 anos foram avaliadas prospectivamente para sintomas de IVAS, durante visitas domiciliares semanais. Foram coletadas amostras de swabs nasofaríngeos, mensalmente independente dos sintomas de IRA. Um subconjunto de amostras nasofaríngeas selecionadas aleatoriamente, foi coletado

durante períodos assintomáticos, com ≥ 8 dias de intervalo de um episódio de IRA. Para detecção de vírus respiratórios e densidade pneumocócica foi utilizada a técnica de qPCR. O pneumococo, foi detectado em 566/849 (67%) amostras de nasofaringe de crianças assintomáticas. Pelo menos 1 vírus respiratório foi detectado em 357/849 (42%) amostras de crianças assintomáticas, o mais frequente foi hRV (31%) seguido de ADV (11%), enquanto as detecções de INF, MPV, PIV e RSV em crianças assintomáticas foram incomuns ($\leq 3\%$). A colonização por pneumococo foi mais comum em amostras em que mais de 1 vírus respiratório foi detectado (78%) do que naqueles em que nenhum vírus respiratório (58%; $p < 0,001$). A detecção apenas de hRV, apenas de ADV ou codetecção de >1 vírus foi significativamente associada a densidades pneumocócicas aumentadas em comparação com amostras negativas para vírus. Os autores não encontraram associação significativa entre a detecção de outros vírus detectados com menos frequência. Os aumentos na densidade pneumocócica, foram significativamente associados ao aumento da incidência de IRA subsequente. A conclusão do estudo foi que, aumentos na densidade de colonização pneumocócica nasofaríngea durante períodos assintomáticos estão associadas às detecções virais; e está associada ao aparecimento subsequente de uma IRA.

Em contrapartida, um estudo de caso-controle, realizado com crianças indígenas em regiões remotas da Austrália, na faixa de 90 dias à 2 anos de idade com altas taxas de colonização por pneumococo (mais de 70%), encontrou resultados divergentes. Foram incluídas amostras da nasofaringe de controles provenientes de crianças de 0 à 180 dias antes de um episódio de IVAI, e os casos de 0 à 21 dias antes do episódio. Nesse estudo não foram encontradas diferenças significativas de colonização, nem densidade pneumocócica entre os casos e controles. O único microrganismo com associação significativa foi o ADV, com ou sem codetecção com pneumococo (Smith-Vaughan et al. 2018). Curiosamente, nesse estudo os casos tiveram a coleta amostral até 21 dias antes do episódio.

Um estudo canadense, com delineamento um pouco diferente, pois o objetivo foi avaliar a colonização pneumocócica em crianças com infecção respiratória viral e bacteriana distinguidas apenas clinicamente, incluiu 507 crianças de 2 meses até 18 anos, recrutados três grupos de sujeitos: crianças com doença respiratória internados na UTI, crianças previamente saudáveis com doença respiratória admitidas na enfermaria, e, crianças previamente saudáveis diagnosticadas no

serviço de urgência com pneumonia não grave. Os swabs nasofaríngeos dos indivíduos foram submetidos a testes quantitativos de qPCR para pneumococo. Foram identificados clinicamente 32% (160/507) das crianças com síndrome de infecção viral definida (por exemplo, bronquiolite, exacerbação de asma sem diagnóstico secundário de pneumonia bacteriana e sem radiografia de tórax compatível com pneumonia), 35% (179/507) com pneumonia indeterminada (caracterizada por um diagnóstico clínico de pneumonia, mas sem derrame/empiema) não grave, 26% (134/507) com pneumonia indeterminada com hospitalização e 6,7% (34/507) com infecção bacteriana definida (pneumonia complicada por derrame/empiema, identificada por ultrassonografia pulmonar). O pneumococo foi detectado em 45% (227/507) das crianças. Os padrões de colonização nasofaríngea de indivíduos com infecção viral definida foram muito semelhantes aos com infecção bacteriana definida ou pneumonia indeterminada. Entre as crianças portadoras de pneumococo, a densidade pneumocócica foi semelhante entre todas as diferentes categorias de doenças. Os autores concluem que, a avaliação e quantificação da colonização pneumocócica nasofaríngea, não parece ser útil, para discriminar entre doença respiratória viral aguda e bacteriana; conseqüentemente, é improvável que essa metodologia determine com segurança quais crianças com pneumonia indeterminada têm etiologia bacteriana e/ou requerem tratamento com antibióticos (Pernica et al. 2021). Essa pesquisa, mesmo sem identificação da etiologia das doenças respiratórias, demonstra a importância de entendermos melhor as relações entre vírus e pneumococo. Os estudos com crianças previamente híidas, podem esclarecer ainda mais essas relações.

1.5.5. Estudos de colonização

Durante a infância, a taxa de colonização pneumocócica é elevada, e os vírus respiratórios são frequentes na nasofaringe. Neste local parece ocorrer um processo dinâmico de aquisição e eliminação de vários microrganismos, durante o qual eles interagem entre si e com o hospedeiro. Por ser o sítio de origem das infecções do TR (Bogaert et al. 2004), é crescente, ainda que insuficiente, a investigação sobre as interações da microbiota nasofaríngea, em especial entre pneumococo e os vírus respiratórios em crianças saudáveis (Jacoby et al. 2007; van den Bergh et al. 2012; Muhandule Birindwa et al. 2020; Khan et al. 2021).

As pesquisas sobre a microbiota do trato intestinal, têm demonstrado que os microrganismos simbióticos são codependentes, por causa de vias metabólicas compartilhadas (Willing et al. 2011; Ding and Schloss 2014). Possivelmente, fatos semelhantes ocorram com os microrganismos respiratórios que interferem na presença um do outro, também podem estar relacionados no TRS (van den Bergh et al. 2012). Uma associação positiva entre patógenos no nível do hospedeiro, sugere que indivíduos com alta suscetibilidade à infecção por um patógeno também são suscetíveis à infecção por outro patógeno, podendo ser evidenciado, por exemplo, pela incidência acima da média ao longo do tempo (Jacoby et al. 2007). Fatores ambientais e função imunológica, podem desempenhar um papel importante (Principi et al. 1999; Regev-Yochay et al. 2004; Greenberg et al. 2006; Heinonen et al. 2019).

Uma associação positiva no nível microbiano, é observada quando a coocorrência de dois patógenos ocorre com mais frequência do que seria esperado, dadas as suscetibilidades independentes do hospedeiro a esses patógenos. No caso do transporte nasofaríngeo, isso pode ser resultado de um mecanismo pelo qual a presença de um patógeno cria condições propícias, como por exemplo, a adesão de outro na nasofaringe. Por outro lado, uma correlação negativa, sugeriria que os dois patógenos de interesse estão competindo por locais de colonização na nasofaringe (Jacoby et al. 2007).

Jacoby et al. 2007, em estudo de coorte realizado na Austrália Ocidental, com crianças matriculadas no nascimento e acompanhadas até 2 anos de idade. Foi um dos primeiros estudos que evidenciou padrões de coocorrência de bactérias potencialmente patogênicas e vírus respiratórios, em amostras da nasofaringe de crianças saudáveis. Foram incluídas 100 crianças aborígenes, e 180 não aborígenes, a coleta de aspirados nasofaríngeos foi realizada no nascimento e regularmente até os 2 anos de idade. Utilizaram teste de cultura bacteriana e qPCR, para detecção dos vírus respiratórios. No nível microbiano, a infecção por hRV foi positivamente correlacionada com o transporte de pneumococos, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*. Em crianças aborígenes e não aborígenes de todas as idades, exceto menores de 1 ano, o pneumococo foi isolado com mais frequência quando o hRV foi detectado.

Outro estudo foi realizado na Holanda, com 433 crianças saudáveis. As coletas de amostras de swab de nasofaringe foram realizadas com 6 semanas, 6, 12, 18 e 24 meses. Para identificação de bactérias, foi utilizada a técnica de cultura, e, para vírus respiratórios, a qPCR. Os vírus respiratórios foram detectados em quase 70% das amostras, com 29% das amostras apresentando múltiplos vírus. O hRV, foi o vírus detectado com maior frequência, 38% de todas as amostras coletadas, variando de 31% à 50%, entre a idade das coletas. A taxa de colonização pneumocócica foi de 62%. A colonização por pneumococo foi positivamente associada à presença de *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, hRV e enterovírus, e associado negativamente com a presença de *S. aureus*. O pneumococo, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*, eram mais prováveis de estarem na nasofaringe em combinação com \geq vírus respiratórios. A presença de INF, em geral foi associada a um risco aumentado de colonização por pneumococos. Nas crianças com colonização por pneumococo, tanto o hRV quanto o enterovírus, foram detectados 20% a mais do que nas não colonizadas, sendo as maiores associações bactéria versus vírus, do estudo (van den Bergh et al. 2012).

Uma pesquisa realizada na República Democrática do Congo, foram incluídas 375 crianças, de 2 à 60 meses. Foi coletado swab de nasofaringe e testes de PCR, realizados para detecção de bactérias potencialmente patogênicas e vírus respiratórios. O pneumococo foi a bactéria mais comum, detectada em 77% da população do estudo. O vírus mais frequentemente detectado foi o hRV (49%), seguido pelos enterovírus (22%) e hPIV (17%) das amostras. O RSV, foi encontrado em apenas 1% dos casos, e o INF foi ainda mais raro. A coocorrência de bactérias e vírus, atingiu 33% das crianças. O pneumococo, foi detectado juntamente com qualquer vírus respiratório em 30% das crianças (Muhandule Birindwa et al. 2020). Nesse estudo não foi apresentada uma análise com a codetecção do pneumococo e cada vírus em separado. A alta frequência do hRV, deve ser considerada na coocorrência de pneumococo e vírus respiratórios.

Em um estudo de (Verkaik et al. 2011), foram incluídas 57 crianças saudáveis, onde foram coletadas amostras de soro em série durante um período de 2 anos, aos 6, 14 e 24 meses de idade das crianças. Também foram coletados swab nasofaríngeo e nasal, aos 1,5, 6, 14 e 24 meses de idade para cultivo bacteriano de *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus* e pneumococo. O transporte nasofaríngeo frequente (≥ 2 vezes nos primeiros 2 anos de vida) de pneumococo, mas não dos outros três

patógenos, foi associado ao aumento das taxas de soroconversão de bebês para hMPV (frequentemente versus menos expostos , 93% vs. 59%; $p < 0,05$).

Um estudo de caso-controle de crianças com e sem HIV foi realizado na Índia, com o propósito de observar a associação de vírus respiratórios e bactérias entre assintomáticos para infecções respiratórias. Foram coletados swabs nasofaríngeos de 49 crianças com HIV (de 2 a 14 anos) e 43 sem HIV (de 2 a 5 anos). Foi utilizado qPCR, para detecção dos vírus respiratórios e detecção e densidade bacteriana. Bactérias foram encontradas em 67%, vírus em 45% e coocorrência em 27% das amostras. Na análise individual dos microrganismos, somente o *S. aureus* teve associação com o grupo de crianças com HIV. Independentemente da condição de HIV, a bactéria mais comum foi o *S. aureus* (53%), seguido pelo pneumococo (37%), esse com taxas semelhantes entre os grupos. Em crianças com HIV, o hRV e ADV foram mais frequentemente detectados (14% cada), hBOV (4%), seguidos dos RSV, hMPV, hPIV-3 e coronavírus-229 (2% cada). O hRV, também foi o mais frequente no grupo sem HIV (18%), seguido do hBOV (9%) e o INF-B foi identificado apenas nesse grupo (9%). O pneumococo, foi associado à coocorrência de espécies virais em crianças, independentemente da condição de HIV. Particularmente, a codetecção com ADV aumentou a probabilidade de detecção de pneumococos em seis vezes. O aumento da densidade pneumocócica foi observado com codetecção de vírus respiratórios, e especificamente com hRV. Ao analisar crianças com HIV, a presença de hRV aumentou 15 vezes o risco de colonização pneumocócica, e 8 vezes a colonização dupla de pneumococo e *S. aureus* (Khan et al. 2021). Nesse estudo, ao analisar somente crianças sem HIV, não foi encontrada associação entre pneumococo versus hRV ou ADV. Devido às fortes evidências dessas relações em indivíduos com HIV, pode ter influenciado nos resultados independentes da condição de HIV.

Embora haja intensa investigação sobre o tema da colonização por pneumococos e vírus respiratórios, o conhecimento sobre o tema ainda é incompleto. Há grandes diferenças entre cada um dos estudos realizados, na tentativa de compreender a relação entre colonização pneumocócica e vírus respiratórios na nasofaringe. Os estudos apresentam diferentes delineamentos, aplicados em crianças de diversas idades. Há uma diversidade de espécimes clínicos; às vezes lavado nasofaríngeo, outros swab de nasofaringe, e aspirados de nasofaringe. É possível também

reconhecer diferentes momentos de coleta amostral. Também em populações diferentes; com e sem sintomas, com critérios para definição e inclusão de sintomas. Os métodos laboratoriais voltados para pneumococos não apresentam uniformidade, havendo estudos com base em cultura ou qPCR, visando taxa de colonização ou densidade bacteriana. A identificação dos vírus respiratórios total, também há variações, cada vírus respiratório é diferente entre si, quando se analisa todos juntos, pode ocorrer a influência do mais prevalente em determinada população. Todos esses fatores atuam na dificuldade de melhor entender as relações entre pneumococo e vírus respiratórios. Esses microrganismos frequentam a nasofaringe, e estudos em população sem diagnósticos de doença respiratória se tornam necessários, para auxiliar na melhor compreensão desse tema ainda tão recente na literatura.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AA, Diamond JM, Chehoud C, Chang B, Kotzin JJ, Young JC, et al. The Perioperative Lung Transplant Virome: Torque Teno Viruses Are Elevated in Donor Lungs and Show Divergent Dynamics in Primary Graft Dysfunction. *Am J Transplant*. 2017 May;17(5):1313–24.
- Abbas AA, Taylor LJ, Dothard MI, Leiby JS, Fitzgerald AS, Khatib LA, et al. Redondoviridae, a Family of Small, Circular DNA Viruses of the Human Oro-Respiratory Tract Associated with Periodontitis and Critical Illness. *Cell Host Microbe*. 2019 May 8;25(5):719–29.e4.
- Abedi GR, Prill MM, Langley GE, Wikswow ME, Weinberg GA, Curns AT, et al. Estimates of Parainfluenza Virus-Associated Hospitalizations and Cost Among Children Aged Less Than 5 Years in the United States, 1998-2010. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016 Mar;5(1):7–13.
- Adler H, Nikolaou E, Gould K, Hinds J, Collins AM, Connor V, et al. Pneumococcal Colonization in Healthy Adult Research Participants in the Conjugate Vaccine Era, United Kingdom, 2010-2017. *J Infect Dis*. 2019 May 24;219(12):1989–93.
- Ahmed SS, Lessa FC, Coradin H, Sánchez J, Carvalho M da G, Soda E, et al. High Prevalence of Vaccine-Type Infections Among Children with Pneumococcal Pneumonia and Effusion After 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction in the Dominican Republic. *J Infect Dis*. 2021 Sep 1;224(12 Suppl 2):S228–36.
- Albrich WC, Madhi SA, Adrian PV, van Niekerk N, Marelets T, Cutland C, et al. Use of a rapid test of pneumococcal colonization density to diagnose pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2012 Mar 1;54(5):601–9.
- Al-Lahham A. Multicenter study of pneumococcal carriage in children 2 to 4 years of age in the winter seasons of 2017-2019 in Irbid and Madaba governorates of Jordan. *PLoS One*. 2020 Aug 13;15(8):e0237247.
- Almeida ST, Nunes S, Santos Paulo AC, Valadares I, Martins S, Breia F, et al. Low prevalence of pneumococcal carriage and high serotype and genotype diversity among

- adults over 60 years of age living in Portugal. *PLoS One*. 2014 Mar 6;9(3):e90974.
- Alto WA. Human metapneumovirus: a newly described respiratory tract pathogen. *J Am Board Fam Pract*. 2004 Nov;17(6):466–9.
- Alymova IV, Portner A, Takimoto T, Boyd KL, Babu YS, McCullers JA. The novel parainfluenza virus hemagglutinin-neuraminidase inhibitor BCX 2798 prevents lethal synergism between a paramyxovirus and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jan;49(1):398–405.
- Alymova IV, Taylor G, Takimoto T, Lin TH, Chand P, Babu YS, et al. Efficacy of novel hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 against human parainfluenza viruses in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 May;48(5):1495–502.
- do Amaral de Leon C, Amantea SL, Pilger DA, Cantarelli V. Clinical and epidemiologic profile of lower respiratory tract infections associated with human bocavirus. *Pediatr Pulmonol*. 2013 Nov;48(11):1112–8.
- Ampofo K, Bender J, Sheng X, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, et al. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: role of preceding respiratory viral infection. *Pediatrics*. 2008 Aug;122(2):229–37.
- Andrade AL, Afonso ET, Minamisava R, Bierrenbach AL, Cristo EB, Morais-Neto OL, et al. Direct and indirect impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction on pneumonia hospitalizations and economic burden in all age-groups in Brazil: A time-series analysis. *PLoS One*. 2017 Sep 7;12(9):e0184204.
- Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LFC, Ribeiro ML, Leite LCC, et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* Proteins in Evasion of Complement-Mediated Immunity. *Front Microbiol*. 2017 Feb 20;8:224.
- ANVISA. MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. 2013;9:1–150.
- Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho M da GS, Steigerwalt AG, et al. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2004 Oct;42(10):4686–96.
- Arguedas A, Trzciński K, O'Brien KL, Ferreira DM, Wyllie AL, Weinberger D, et al. Upper respiratory tract colonization with *Streptococcus pneumoniae* in adults. *Expert Rev Vaccines*. 2020 Apr;19(4):353–66.
- Arruda E, Jones MH, Escremim de Paula F, Chong D, Bugarin G, Notario G, et al. The burden of single virus and viral coinfections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants: a prospective birth cohort study in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Oct;33(10):997–1003.
- Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother*. 1986 Jul;18 Suppl A:35–45.
- Avadhanula V, Rodriguez CA, Devincenzo JP, Wang Y, Webby RJ, Ulett GC, et al. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J Virol*. 2006 Feb;80(4):1629–36.
- Avadhanula V, Wang Y, Portner A, Adderson E. Nontypeable *Haemophilus influenzae* and

- Streptococcus pneumoniae* bind respiratory syncytial virus glycoprotein. *J Med Microbiol.* 2007 Sep;56(Pt 9):1133–7.
- Baggett HC, Watson NL, Deloria Knoll M, Brooks WA, Feikin DR, Hammitt LL, et al. Density of Upper Respiratory Colonization With *Streptococcus pneumoniae* and Its Role in the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia Among Children Aged <5 Years in the PERCH Study. *Clin Infect Dis.* 2017 Jun 15;64(suppl_3):S317–27.
- Baillie VL, Moore DP, Mathunjwa A, Morailane P, Simões EAF, Madhi SA. A prospective case-control study on the association of Rhinovirus nasopharyngeal viral load and viremia in South African children hospitalized with severe pneumonia. *J Clin Virol.* 2020 Apr;125:104288.
- Bakaletz LO. Immunopathogenesis of polymicrobial otitis media. *J Leukoc Biol.* 2010 Feb;87(2):213–22.
- Bakaletz LO. Viral-bacterial co-infections in the respiratory tract. *Curr Opin Microbiol.* 2017 Feb;35:30–5.
- Bartlett JG. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2011 May;52 Suppl 4:S296–304.
- Bastos JCS, Simas PVM, Caserta LC, Bragunde AEA, Marson FA de L, Martini MC, et al. Rhinoviruses as critical agents in severe bronchiolitis in infants. *J Pediatr [Internet].* 2021 Dec 20; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.11.006>
- Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res.* 2012 Oct;160(4):258–66.
- Berezin EN, Carvalho LH, Lopes CR, Sanajotta AT, Brandileone MCC, Menegatti S, et al. Meningite pneumocócica na infância: características clínicas, sorotipos mais prevalentes e prognóstico. *J Pediatr.* 2002 Feb;78(1):19–23.
- Berezin EN, Jarovsky D, Cardoso MRA, Mantese OC. Invasive pneumococcal disease among hospitalized children in Brazil before and after the introduction of a pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine.* 2020 Feb 11;38(7):1740–5.
- van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JWA, de Steenhuijsen Piters WAA, Bosch AATM, van Gils EJM, et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PLoS One.* 2012 Oct 17;7(10):e47711.
- Berry AM, Lock RA, Paton JC. Cloning and characterization of nanB, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996 Aug;178(16):4854–60.
- Biesbroeck G, Wang X, Bart J.F. F, Rene M.J. E., Krzysztof T., Nynke Y. R., Reinier H. Ve., Sanders E.A.M., Bogaert D. Seven-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and Nasopharyngeal Microbiota in Healthy Children. *Emerg Infect Dis* 2014 Feb; 20(2): 201–210. 2014;20(2) :201–10.
- Biesbroek G, Bosch AATM, Wang X, Keijser BJB, Veenhoven RH, Sanders EAM, et al. The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014a Aug 1;190(3):298–308.
- Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJB, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014b Dec

- 1;190(11):1283–92.
- Binks MJ, Cheng AC, Smith-Vaughan H, Sloots T, Nissen M, Whiley D, et al. Viral-bacterial co-infection in Australian Indigenous children with acute otitis media. *BMC Infect Dis.* 2011 Jun 7;11:161.
- Birger R, Morita H, Comito D, Filip I, Galanti M, Lane B, et al. Asymptomatic Shedding of Respiratory Virus among an Ambulatory Population across Seasons. *mSphere* [Internet]. 2018 Jul 11;3(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mSphere.00249-18>
- Birindwa AM, Emgård M, Nordén R, Samuelsson E, Geravandi S, Gonzales-Siles L, et al. High rate of antibiotic resistance among pneumococci carried by healthy children in the eastern part of the Democratic Republic of the Congo. *BMC Pediatr.* 2018 Nov 19;18(1):361.
- Bloomfield P, Dalton D, Karleka A, Kesson A, Duncan G, Isaacs D. Bacteraemia and antibiotic use in respiratory syncytial virus infections. *Arch Dis Child.* 2004 Apr;89(4):363–7.
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004 Mar;4(3):144–54.
- Bogaert D, Keijsers B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS One.* 2011 Feb 28;6(2):e17035.
- Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis.* 2002 Nov 1;186(9):1330–4.
- Boncrystiani HF, Criado MF, Arruda E. Respiratory Viruses. *Encyclopedia of Microbiology.* 2009;500.
- Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog.* 2013 Jan;9(1):e1003057.
- Brandileone MC de C, Almeida SCG, Minamisava R, Andrade AL. Distribution of invasive Streptococcus pneumoniae serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine.* 2018 May 3;36(19):2559–66.
- Brandileone MC de C, Zanella RC, Almeida SCG, Brandao AP, Ribeiro AF, Carvalhanas TRMP, 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.* 2016 Nov 4;34(46):5604–11.
- Brandileone MC de C, Zanella RC, Almeida SCG, Cassiolato AP, Lemos APS de, Salgado MM, et al. Long-term effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in children in Brazil. *Vaccine.* 2019 Aug 23;37(36):5357–63.
- Brealey JC, Chappell KJ, Galbraith S, Fantino E, Gaydon J, Tozer S, et al. Streptococcus pneumoniae colonization of the nasopharynx is associated with increased severity during respiratory syncytial virus infection in young children. *Respirology.* 2018 Feb;23(2):220–7.
- Brealey JC, Sly PD, Young PR, Chappell KJ. Viral bacterial co-infection of the respiratory

- tract during early childhood. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2015 May;362(10). Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnv062>
- Brealey JC, Young PR, Sloots TP, Ware RS, Lambert SB, Sly PD, et al. Bacterial colonization dynamics associated with respiratory syncytial virus during early childhood. *Pediatr Pulmonol*. 2020 May;55(5):1237–45.
- Briles DE, Baton JC, Muker JI, Swiatlo E, Crain MJ. Pneumococcal Vaccines. *Microbiol Spectrum* [Internet]. 2019;7(6):GPP3-0028. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0028-2018>.
- Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae's* Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol*. 2018 Jun 22;9:1366.
- Brotos P, Bassat Q, Lanaspá M, Henares D, Perez-Arguello A, Madrid L, et al. Nasopharyngeal bacterial load as a marker for rapid and easy diagnosis of invasive pneumococcal disease in children from Mozambique. *PLoS One*. 2017 Sep 14;12(9):e0184762.
- Browall S, Backhaus E, Naucler P, Galanis I, Sjöström K, Karlsson D, et al. Clinical manifestations of invasive pneumococcal disease by vaccine and non-vaccine types. *Eur Respir J*. 2014 Dec;44(6):1646–57.
- Byington CL, Ampofo K, Stockmann C, Adler FR, Herbener A, Miller T, et al. Community Surveillance of Respiratory Viruses Among Families in the Utah Better Identification of Germs-Longitudinal Viral Epidemiology (BIG-LoVE) Study. *Clin Infect Dis*. 2015 Oct 15;61(8):1217–24.
- Caierão J, Hawkins P, Sant'anna FH, da Cunha GR, d'Azevedo PA, McGee L, et al. Serotypes and genotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* before and after PCV10 implementation in southern Brazil. *PLoS One*. 2014 Oct 30;9(10):e111129.
- Camara M, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ. *Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1991 Aug;59(8):2856–8.
- Campos GS, Silva Sampaio ML, Menezes ADL, Tigre DM, Moura Costa LF, Chinalia FA, et al. Human bocavirus in acute gastroenteritis in children in Brazil. *J Med Virol*. 2016 Jan;88(1):166–70.
- Castro IA, Costa LDC, Oliveira ACR, Souza M, das Dôres de Paula Cardoso D, Camargos PAM, et al. Circulation profile of respiratory viruses in symptomatic and asymptomatic children from Midwest Brazil. *Braz J Microbiol*. 2020 Dec;51(4):1729–35.
- Cawcutt K, Kalil AC. Pneumonia with bacterial and viral coinfection. *Curr Opin Crit Care*. 2017 Oct;23(5):385–90.
- CDC. Frequently Asked Influenza (Flu) Questions: 2021-2022 Season [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2022b [cited 2022 Feb 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/season/faq-flu-season-2021-2022.htm>
- CDC. How Flu Viruses Can Change: “Drift” and “Shift” [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021a [cited 2022 Mar 5]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>
- CDC. Pneumococcal Vaccination: What Everyone Should Know [Internet]. 2022c [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/public/index.html>

- CDC. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2020. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Bacterial Diseases. Pneumococcal Disease [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 7]. Available from: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/streptococcus-pneumoniae.html>
- CDC. Flu Symptoms & Complications [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021b [cited 2022 Feb 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/symptoms.htm>
- CDC. Research Use Only CDC Flu SC2 Multiplex Assay Primers and Probes [Internet]. 2021b [cited 2021 Nov 12]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/multiplex-primer-probes.html>
- CDC. COVID Data Tracker [Internet]. 2022a [cited 2022 Feb 2]. Available from: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#datatracker-home>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009 Oct 2;58(38):1071–4.
- CEVS/RS. Informe de Vigilância da Influenza/RS – Semana epidemiológica 47/2019 (até 23/11). Governo do estado do Rio Grande do Sul [Internet]. 2020; Available from: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/201911/27130006-boletim-semanal-flu-se-47.pdf>
- Ceyhan M, Karadag-Oncel E, Hascelik G, Ustundag G, Gurbuz V, Samlioglu P, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children aged less than five years. *Vaccine.* 2021 Apr 8;39(15):2041–7.
- Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:194.
- Chappell KJ, Brealey JC, Mackay IM, Bletchly C, Hugenholtz P, Sloots TP, et al. Respiratory Syncytial Virus Infection is Associated with Increased Bacterial Load in the Upper Respiratory Tract in Young Children. Available from: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0703.S1-005>
- Charlson ES, Chen J, Custers-Allen R, Bittinger K, Li H, Sinha R, et al. Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One.* 2010 Dec 20;5(12):e15216.
- Chaudhry R, Bordoni B. Anatomy, Thorax, Lungs. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
- Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *JAMA.* 2013 Jan 16;309(3):275–82.
- Chien YW, Klugman KP, Morens DM. Bacterial pathogens and death during the 1918 influenza pandemic. *N Engl J Med.* 2009 Dec 24;361(26):2582–3.
- Chiu CY. Viral pathogen discovery. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Aug;16(4):468–78.
- Choe YJ, Park S, Michelow IC. Co-seasonality and co-detection of respiratory viruses and bacteraemia in children: a retrospective analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Dec;26(12):1690.e5–1690.e8.
- Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, Trujillo R, Marom T, Loeffelholz MJ, et al. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life:

- association with acute otitis media development. *Clin Infect Dis*. 2015 Jan 1;60(1):1–9.
- Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, et al. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clin Infect Dis*. 2008 Mar 15;46(6):815–23.
- Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol*. 2008 Oct;80(10):1843–9.
- Claesson BA, Trollfors B, Brolin I, Granström M, Henrichsen J, Jodal U, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in children based on antibody responses to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*. 1989 Dec;8(12):856–62.
- CNDSS. As causas sociais das iniquidades em saúde no Brasil. Ministério da Saúde. [Internet]. 2008; Available from: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/causas_sociais_iniquidades.pdf
- Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol*. 2004 Mar;72(3):484–95.
- Colom Aj. TA. Post-infectious bronchiolitis obliterans. *Pediatric Pulmonolog* [Internet]. 2018; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ppul.24221>
- Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett*. 2014 Dec;162(2 Pt A):22–38.
- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1255–62.
- Cox DW, Khoo SK, Zhang G, Lindsay K, Keil AD, Knight G, et al. Rhinovirus is the most common virus and rhinovirus-C is the most common species in paediatric intensive care respiratory admissions. *Eur Respir J* [Internet]. 2018 Aug;52(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00207-2018>
- Dano ID, Ousmane S, Moumouni K, Lagare A, Issa I, Testa J. Risk factors associated with *Streptococcus pneumoniae* carriage in children under five years old with acute respiratory infection in Niger. *Pan Afr Med J*. 2019 Jul 19;33:239.
- Davis KM, Akinbi HT, Standish AJ, Weiser JN. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*. 2008 Dec;4(12):e1000241.
- Davis SM, Deloria-Knoll M, Kassa HT, O'Brien KL. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on nasopharyngeal carriage and invasive disease among unvaccinated people: review of evidence on indirect effects. *Vaccine*. 2013 Dec 17;32(1):133–45.
- De Lencastre H, Tomasz A. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Dec;50 Suppl S2:75–81.
- DeMuri GP, Gern JE, Eickhoff JC, Lynch SV, Wald ER. Dynamics of Bacterial Colonization With *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* During Symptomatic and Asymptomatic Viral Upper Respiratory Tract Infection. *Clin Infect Dis*. 2018 Mar 19;66(7):1045–53.

- Diavatopoulos DA, Short KR, Price JT, Wilksch JJ, Brown LE, Briles DE, et al. Influenza A virus facilitates Streptococcus pneumoniae transmission and disease. *FASEB J*. 2010 Jun;24(6):1789–98.
- Diaz-Diaz A, Bunsow E, Garcia-Maurino C, Moore-Clingenpeel M, Naples J, Juergensen A, et al. Nasopharyngeal Codetection of Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae Shapes Respiratory Syncytial Virus Disease Outcomes in Children. *J Infect Dis*. 2022 Mar 2;225(5):912–23.
- Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):323–9.
- Ding T, Schloss PD. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*. 2014 May 15;509(7500):357–60.
- Dinleyici EC, Yargic ZA. Current knowledge regarding the investigational 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2009 Aug;8(8):977–86.
- Dodi G, Attanasi M, Di Filippo P, Di Pillo S, Chiarelli F. Virome in the Lungs: The Role of Anelloviruses in Childhood Respiratory Diseases. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Jun 23;9(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9071357>
- Domingues CMAS, Verani JR, Montenegro Renoier EI, de Cunto Brandileone MC, Flannery B, de Oliveira LH, et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. *Lancet Respir Med*. 2014 Jun;2(6):464–71.
- Donkor ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Mar 7;3:7.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167–93.
- Dowell SF, Whitney CG, Wright C, Rose CE Jr, Schuchat A. Seasonal patterns of invasive pneumococcal disease. *Emerg Infect Dis*. 2003 May;9(5):573–9.
- Duarte EC, Schneider MC, Paes-Sousa R, da Silva JB, Castillo-Salgado C. [Life expectancy at birth and mortality in Brazil, 1999: exploratory analysis of regional differences]. *Rev Panam Salud Publica*. 2002 Dec;12(6):436–44.
- Dube FS, Ramjith J, Gardner-Lubbe S, Nduru P, Robberts FJL, Wolter N, et al. Longitudinal characterization of nasopharyngeal colonization with Streptococcus pneumoniae in a South African birth cohort post 13-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Sci Rep*. 2018 Aug 21;8(1):12497.
- Duggan ST. Pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (13-valent, adsorbed) [prevenar 13®]. *Drugs*. 2010 Oct 22;70(15):1973–86.
- Duttweiler L, Nadal D, Frey B. Pulmonary and systemic bacterial co-infections in severe RSV bronchiolitis. *Arch Dis Child*. 2004 Dec;89(12):1155–7.
- Ebruke BE, Deloria Knoll M, Haddix M, Zaman SMA, Prospero C, Feikin DR, et al. The Etiology of Pneumonia From Analysis of Lung Aspirate and Pleural Fluid Samples: Findings From the Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) Study. *Clin Infect Dis*. 2021 Dec 6;73(11):e3788–96.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in

- clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):165–256.
- Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis.* 1997 Jun;175(6):1440–5.
- Faden H, Stanievich J, Brodsky L, Bernstein J, Ogra PL. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. *Pediatr Infect Dis J.* 1990 Sep;9(9):623–6.
- Faggion HZ, Leotte J, Trombetta H, Pereira LA, Lapinski BA, Nogueira MB, et al. Influenza Sentinel Surveillance and Severe Acute Respiratory Infection in a Reference Hospital in Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019 Dec 20;53:e20170498.
- Falsey AR, Becker KL, Swinburne AJ, Nylan ES, Formica MA, Hennessey PA, et al. Bacterial complications of respiratory tract viral illness: a comprehensive evaluation. *J Infect Dis.* 2013 Aug 1;208(3):432–41.
- Fan RR, Howard LM, Griffin MR, Edwards KM, Zhu Y, Williams JV, et al. Nasopharyngeal Pneumococcal Density and Evolution of Acute Respiratory Illnesses in Young Children, Peru, 2009-2011. *Emerg Infect Dis.* 2016 Nov;22(11):1996–9.
- FDA. PREVNAR 20 [Internet]. Center for Biologics Evaluation; Research. 2021b [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/prevnar-20>
- FDA. VAXNEUVANCE [Internet]. Center for Biologics Evaluation; Research. 2021 [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaxneuvance>
- Feldman C, Anderson R, Cockeran R, Mitchell T, Cole P, Wilson R. The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. *Respir Med.* 2002 Aug;96(8):580–5.
- Fé MMM, Monteiro AJ, Moura FEA. Parainfluenza virus infections in a tropical city: clinical and epidemiological aspects. *Braz J Infect Dis.* 2008 Jun;12(3):192–7.
- Feris-Iglesias J, Fernández J, Sánchez J, Pimenta F, Peña C, Coradin H, et al. Aetiology of paediatric pneumonia with effusion in the Dominican Republic and the potential impact of pneumococcal conjugate vaccines. *Pneumonia (Nathan).* 2014 Jun 2;4:8–15.
- Ferreira HLDS, Costa KLP, Cariolano MS, Oliveira GS, Felipe KKP, Silva ESA, et al. High incidence of rhinovirus infection in children with community-acquired pneumonia from a city in the Brazilian pre-Amazon region. *J Med Virol.* 2019 Oct;91(10):1751–8.
- Fischer GB, Teper A, Colom AJ. Acute viral bronchiolitis and its sequelae in developing countries. *Paediatr Respir Rev.* 2002;
- Fisher BT, Danziger-Isakov L, Sweet LR, Munoz FM, Maron G, Tuomanen E, et al. A Multicenter Consortium to Define the Epidemiology and Outcomes of Inpatient Respiratory Viral Infections in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018 Dec 3;7(4):275–82.
- Fliegau M, Sonnen AFP, Kremer B, Henneke P. Mucociliary clearance defects in a murine in vitro model of pneumococcal airway infection. *PLoS One.* 2013 Mar 19;8(3):e59925.
- Foxman EF, Iwasaki A. Genome-virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Apr;9(4):254–64.

- Furuya-Kanamori L, Cox M, Milinovich GJ, Magalhaes RJS, Mackay IM, Yakob L. Heterogeneous and Dynamic Prevalence of Asymptomatic Influenza Virus Infections. *Emerg Infect Dis*. 2016 Jun;22(6):1052–6.
- Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral Streptococcus. *MBio* [Internet]. 2020 May 19;11(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00937-20>
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):710–20.
- García-Rodríguez JA, Fresnadillo Martínez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Dec;50 Suppl S2:59–73.
- GBD. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 2018 Nov;18(11):1191–210.
- GBD. Quantifying risks and interventions that have affected the burden of lower respiratory infections among children younger than 5 years: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jan;20(1):60–79.
- Geiser J, Boivin G, Huang S, Constant S, Kaiser L, Tapparel C, et al. RSV and HMPV Infections in 3D Tissue Cultures: Mechanisms Involved in Virus-Host and Virus-Virus Interactions. *Viruses* [Internet]. 2021 Jan 19;13(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/v13010139>
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):871–99.
- Gierke R, Patricia Wodi A, Mph e. MK. Pneumococcal Disease [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>
- van Gils EJM, Veenhoven RH, Rodenburg GD, Hak E, Sanders EAM. Effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage with *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in a randomized controlled trial. *Vaccine*. 2011 Oct 13;29(44):7595–8.
- Godefroy R, Giraud-Gatineau A, Jimeno MT, Edouard S, Meddeb L, Zandotti C, et al. Respiratory Syncytial Virus Infection: Its Propensity for Bacterial Coinfection and Related Mortality in Elderly Adults. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Dec;7(12):ofaa546.
- Grando IM. IMPACTO DA VACINA PNEUMOCÓCICA CONJUGADA 10 VALENTE NA MENINGITE PNEUMOCÓCICA EM CRIANÇAS ATÉ 2 ANOS DE IDADE NO BRASIL. 2013.
- Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis*. 1980 Dec;142(6):923–33.
- Gray BM, Turner ME, Dillon HC Jr. 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. *Am J Epidemiol*. 1982 Oct;116(4):692–703.
- Greenberg D, Givon-Lavi N, Broides A, Blancovich I, Peled N, Dagan R. The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and

- Haemophilus influenzae carriage in children and their mothers. *Clin Infect Dis*. 2006 Apr 1;42(7):897–903.
- Greenberg SB. Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016 Aug;37(4):555–71.
- Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*. 2003 Mar;9(3):372–5.
- Gregianini TS, Seadi CF, Menegolla I, Martins LG, Ikuta N, Wolf JM, et al. Human metapneumovirus in Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018 Jan;51(1):30–8.
- Gregianini TS, Seadi CF, Zavarize Neto LD, Martins LG, Muller GC, Stralioatto SM, et al. A 28-year study of human parainfluenza in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *J Med Virol*. 2019 Aug;91(8):1423–31.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):244–53.
- Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Jan;30(1):277–319.
- Gulraiz F, Bellinghausen C, Bruggeman CA, Stassen FR. Haemophilus influenzae increases the susceptibility and inflammatory response of airway epithelial cells to viral infections. *FASEB J*. 2015 Mar;29(3):849–58.
- Gunson RN, Maclean AR, Shepherd SJ, Carman WF. Simultaneous detection and quantitation of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and adenovirus by use of real-time PCR and pooled standards. *J Clin Microbiol*. 2009 Mar;47(3):765–70.
- Håkansson A, Kidd A, Wadell G, Sabharwal H, Svanborg C. Adenovirus infection enhances in vitro adherence of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun*. 1994 Jul;62(7):2707–14.
- Hament JM, Aerts PC, Fleer A, Van Dijk H, Harmsen T, Kimpen JLL, et al. Enhanced adherence of Streptococcus pneumoniae to human epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Pediatr Res*. 2004 Jun;55(6):972–8.
- Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999 Dec;26(3-4):189–95.
- Harris JM 2nd, Gwaltney JM Jr. Incubation periods of experimental rhinovirus infection and illness. *Clin Infect Dis*. 1996 Dec;23(6):1287–90.
- Haynes AK, Fowlkes AL, Schneider E, Mutuc JD, Armstrong GL, Gerber SI. Human Metapneumovirus Circulation in the United States, 2008 to 2014. *Pediatrics* [Internet]. 2016 May;137(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2015-2927>
- Heikkinen T, Järvinen A. The common cold. *Lancet*. 2003 Jan 4;361(9351):51–9.
- Heinonen S, Rodriguez-Fernandez R, Diaz A, Oliva Rodriguez-Pastor S, Ramilo O, Mejias A. Infant Immune Response to Respiratory Viral Infections. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2019 Aug;39(3):361–76.
- Hendaus MA, Janahi IA. Parapneumonic Effusion in Children: An Up-to-Date Review. *Clin Pediatr* . 2016 Jan;55(1):10–8.
- Henderson FW, Collier AM, Sanyal MA, Watkins JM, Fairclough DL, Clyde WA Jr, et al. A

- longitudinal study of respiratory viruses and bacteria in the etiology of acute otitis media with effusion. *N Engl J Med*. 1982 Jun 10;306(23):1377–83.
- Hergott CB, Roche AM, Naidu NA, Mesaros C, Blair IA, Weiser JN. Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *J Clin Invest*. 2015 Oct 1;125(10):3878–90.
- Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis*. 2007 Nov 1;196(9):1346–54.
- Hishiki H, Ishiwada N, Fukasawa C, Abe K, Hoshino T, Aizawa J, et al. Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *J Infect Chemother*. 2011 Feb;17(1):87–90.
- Honkinen M, Lahti E, Österback R, Ruuskanen O, Waris M. Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):300–7.
- Honsa ES, Johnson MDL, Rosch JW. The roles of transition metals in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Dec 4;3:92.
- Hooven TA, Polin RA. Pneumonia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2017 Aug;22(4):206–13.
- Howard LM, Fan R, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Hartinger S, et al. Nasopharyngeal Pneumococcal Density Is Associated With Viral Activity but Not With Use of Improved Stoves Among Young Andean Children. *Open Forum Infect Dis*. 2017 Aug 2;4(3):ofx161.
- Howard LM, Johnson M, Williams JV, Zhu Y, Gil AI, Edwards KM, et al. Respiratory Viral Detections During Symptomatic and Asymptomatic Periods in Young Andean Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Oct;34(10):1074–80.
- Howard LM, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Williams JV, Gil AI, et al. Nasopharyngeal Pneumococcal Density during Asymptomatic Respiratory Virus Infection and Risk for Subsequent Acute Respiratory Illness. *Emerg Infect Dis*. 2019 Nov;25(11):2040–7.
- Imakita M, Shiraki K, Yutani C, Ishibashi-Ueda H. Pneumonia caused by rhinovirus. *Clin Infect Dis*. 2000 Mar;30(3):611–2.
- Infopédia. -ite no Dicionário infopédia de Termos Médicos [em linha]. Porto: Porto Editora [Internet]. Dicionário infopédia de Termos Médicos. [cited 2022 Jan 23]. Available from: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/termos-medicos/-ite>
- Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, Takahashi H, Ida S, Sasaki T, et al. Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis*. 2003 Dec 15;188(12):1928–39.
- Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jan;26(1):135–62.
- Jacoby P, Watson K, Bowman J, Taylor A, Riley TV, Smith DW, et al. Modelling the co-occurrence of *Streptococcus pneumoniae* with other bacterial and viral pathogens in the upper respiratory tract. *Vaccine*. 2007 Mar 22;25(13):2458–64.
- Jain S, Williams DJ, Arnold SR, Ampofo K, Bramley AM, Reed C, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *N Engl J Med*. 2015 Feb

26;372(9):835–45.

Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, et al. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2631–6.

Jartti T, Jartti L, Peltola V, Waris M, Ruuskanen O. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects: asymptomatic respiratory viral infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Dec;27(12):1103–7.

Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol*. 2004 Apr;72(4):695–9.

Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RTR, Werno AM, et al. Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. *Thorax*. 2008 Jan;63(1):42–8.

Jiang W, Wu M, Zhou J, Wang Y, Hao C, Ji W, et al. Etiologic spectrum and occurrence of coinfections in children hospitalized with community-acquired pneumonia. *BMC Infect Dis*. 2017 Dec 20;17(1):787.

Jiang Z, Nagata N, Molina E, Bakaletz LO, Hawkins H, Patel JA. Fimbria-mediated enhanced attachment of nontypeable *Haemophilus influenzae* to respiratory syncytial virus-infected respiratory epithelial cells. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):187–92.

Johnson JA. Pathogenesis of bacterial infections of the respiratory tract. *Br J Biomed Sci*. 1995 Jun;52(2):157–61.

Joma BH, Siwapornchai N, Vanguri VK, Shrestha A, Roggensack SE, Davidson BA, et al. A Murine Model for Enhancement of *Streptococcus pneumoniae* Pathogenicity upon Viral Infection and Advanced Age. *Infect Immun*. 2021 Jul 15;89(8):e0047120.

Jones N. The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Sep 23;51(1-3):5–19.

Jullien S, Sharma R, Lhamu Mynak M, Henares D, Muñoz-Almagro C, Bassat Q. Pneumococcal nasopharyngeal carriage among Bhutanese children hospitalized with clinical pneumonia: serotypes and viral co-infection. *BMC Infect Dis*. 2020 Dec 9;20(1):940.

JustActions. The Missing Piece : Why continued neglect of pneumonia threatens the achievement of health goals. JustActions, New York, USA [Internet]. 2018; Available from: https://stopppneumonia.org/wp-content/uploads/2018/11/The-Missing-Piece_-0611_Spread.pdf

Juvén T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, Roivainen M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Apr;19(4):293–8.

Kan-O K, Washio Y, Fujimoto T, Shiroyama N, Nakano T, Wakamatsu K, et al. Differences in the spectrum of respiratory viruses and detection of human rhinovirus C in exacerbations of adult asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Investig*. 2022 Jan;60(1):129–36.

Karppinen S, Teräsjärvi J, Auranen K, Schuez-Havupalo L, Siira L, He Q, et al. Acquisition and Transmission of *Streptococcus pneumoniae* Are Facilitated during Rhinovirus

- Infection in Families with Children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Nov 1;196(9):1172–80.
- Kenealy T. Sore throat. *BMJ Clin Evid* [Internet]. 2014 Mar 4;2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589314>
- Kesson AM. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev*. 2007 Sep;8(3):240–8.
- Khan T, Das RS, Chaudhary A, Chatterjee J, Bhattacharya SD. Association of nasopharyngeal viruses and pathogenic bacteria in children and their parents with and without HIV. *Pneumonia (Nathan)*. 2021 May 5;13(1):8.
- Kietzman CC, Gao G, Mann B, Myers L, Tuomanen EI. Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium. *Nat Commun*. 2016 Feb 29;7:10859.
- Kimaro Mlacha SZ, Warira A, Gatakaa H, Goldblatt D, Scott JAG. Outpacing the pneumococcus: Antibody dynamics in the first few days following pneumococcal capsular antigen stimulation. *Sci Rep*. 2018 Oct 18;8(1):15376.
- Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Rodriguez-Barradas MC, Nahm WK, Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis*. 1996 Jan;22(1):100–6.
- Korppi M, Leinonen M, Koskela M, Mäkelä PH, Launiala K. Bacterial coinfection in children hospitalized with respiratory syncytial virus infections. *Pediatr Infect Dis J*. 1989 Oct;8(10):687–92.
- Krishna NK, Cunnion KM. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. *Med Clin North Am*. 2012 Nov;96(6):1067–78.
- Kukavica-Ibrulj I, Hamelin ME, Prince GA, Gagnon C, Bergeron Y, Bergeron MG, et al. Infection with human metapneumovirus predisposes mice to severe pneumococcal pneumonia. *J Virol*. 2009 Feb;83(3):1341–9.
- Kurz H, Göpfrich H, Huber K, Krugluger W, Asbott F, Wabnegger L, et al. Spectrum of pathogens of in-patient children and youths with community acquired pneumonia: a 3 year survey of a community hospital in Vienna, Austria. *Wien Klin Wochenschr*. 2013 Nov;125(21-22):674–9.
- Kuster SP, Tuite AR, Kwong JC, McGeer A, Toronto Invasive Bacterial Diseases Network Investigators, Fisman DN. Evaluation of coseasonality of influenza and invasive pneumococcal disease: results from prospective surveillance. *PLoS Med*. 2011 Jun;8(6):e1001042.
- Kutter JS, Spronken MI, Fraaij PL, Fouchier RA, Herfst S. Transmission routes of respiratory viruses among humans. *Curr Opin Virol*. 2018 Feb;28:142–51.
- Levine OS, Farley M, Harrison LH, Lefkowitz L, McGeer A, Schwartz B. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children: a population-based case-control study in North America. *Pediatrics*. 1999 Mar;103(3):E28.
- Lin HC, Lin CC, Chen CS, Lin HC. Seasonality of pneumonia admissions and its association with climate: an eight-year nationwide population-based study. *Chronobiol Int*. 2009 Dec;26(8):1647–59.
- Liu DX, Liang JQ, Fung TS. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). *Encyclopedia of Virology*. 2021;428.

- Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):3027–35.
- Li Y, Pillai P, Miyake F, Nair H. The role of viral co-infections in the severity of acute respiratory infections among children infected with respiratory syncytial virus (RSV): A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2020 Jun;10(1):010426.
- Lopes GP, Amorim ÍPS, Melo B de O de, Maramaldo CEC, Bomfim MRQ, Lima Neto LG, et al. Identification and seasonality of rhinovirus and respiratory syncytial virus in asthmatic children in tropical climate. *Biosci Rep [Internet]*. 2020 Sep 30;40(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/BSR20200634>
- Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiol Spectr [Internet]*. 2019 Mar;7(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018>
- Louie J, Jean C, Chen TH, Park S, Ueki R, Harper T, et al. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1)-United States, May-August 2009. *MMWR Surveill Summ*. 2009;58(38):1071–4.
- Løvlie A, Vestrheim DF, Aaberge IS, Steens A. Changes in pneumococcal carriage prevalence and factors associated with carriage in Norwegian children, four years after introduction of PCV13. *BMC Infect Dis*. 2020 Jan 10;20(1):29.
- LPSN. Genus *Streptococcus* [Internet]. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. [s.d.] [cited 2022 Mar 16]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/genus/streptococcus>
- Lynch JP 3rd, Kajon AE. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016 Aug;37(4):586–602.
- Lysholm F, Wetterbom A, Lindau C, Darban H, Bjerkner A, Fahlander K, et al. Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing. *PLoS One*. 2012 Feb 15;7(2):e30875.
- Madhi SA, Klugman KP, Vaccine Trialist Group. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):811–3.
- Madhi SA, Ludewick H, Kuwanda L, van Niekerk N, Cutland C, Little T, et al. Pneumococcal coinfection with human metapneumovirus. *J Infect Dis*. 2006 May 1;193(9):1236–43.
- Malta FC, Varella RB, Guimarães MAAM, Miagostovich MP, Fumian TM. Human Bocavirus in Brazil: Molecular Epidemiology, Viral Load and Co-Infections. *Pathogens [Internet]*. 2020 Aug 10;9(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9080645>
- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 1;44 Suppl 2:S27–72.
- Mangtani P, Cutts F, Hall AJ. Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence. *Lancet Infect Dis*. 2003 Feb;3(2):71–8.
- Manna S, McAuley J, Jacobson J, Nguyen CD, Ullah MA, Sebina I, et al. Synergism and Antagonism of Bacterial-Viral Coinfection in the Upper Respiratory Tract. *mSphere*. 2022

Feb 23;7(1):e0098421.

- March M de F, Galvão A. Pneumonia adquirida na comunidade em crianças e vacinação antipneumocócica 10 valente: atualização. *Rev Pediatr SOPERJ* [Internet]. 2018;18(3). Available from: http://revistadepediatriasoperj.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=1057&nomeArquivo=v18n3a04.pdf
- Marks LR, Davidson BA, Knight PR, Hakansson AP. Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *MBio* [Internet]. 2013 Jul 23;4(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00438-13>
- Marks LR, Reddinger RM, Hakansson AP. High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio* [Internet]. 2012 Sep 25;3(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00200-12>
- Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014 Dec;14(12):827–35.
- Martín-Loeches I, Sanchez-Corral A, Diaz E, Granada RM, Zaragoza R, Villavicencio C, et al. Community-acquired respiratory coinfection in critically ill patients with pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus. *Chest*. 2011 Mar;139(3):555–62.
- Masters IB, Isles AF, Grimwood K. Necrotizing pneumonia: an emerging problem in children? *Pneumonia* (Nathan). 2017 Jul 25;9:11.
- Matthias KA, Roche AM, Standish AJ, Shchepetov M, Weiser JN. Neutrophil-toxin interactions promote antigen delivery and mucosal clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):6246–54.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):4–11.
- McAllister DA, Liu L, Shi T, Chu Y, Reed C, Burrows J, et al. Global, regional, and national estimates of pneumonia morbidity and mortality in children younger than 5 years between 2000 and 2015: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2019 Jan;7(1):e47–57.
- McCauley LM, Webb BJ, Sorensen J, Dean NC. Use of Tracheal Aspirate Culture in Newly Intubated Patients with Community-Onset Pneumonia. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Mar;13(3):376–81.
- McCullers JA, Bartmess KC. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2003 Mar 15;187(6):1000–9.
- McErlean P, Shackelton LA, Andrews E, Webster DR, Lambert SB, Nissen MD, et al. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). *PLoS One*. 2008 Apr 2;3(4):e1847.
- McNamara PS, Flanagan BF, Smyth RL, Hart CA. Impact of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus co-infection in severe bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol*. 2007 Aug;42(8):740–3.
- McNamee LA, Harmsen AG. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6707–21.

- Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Rollins NK, Duffy LB, Ziegler T, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*. 2004 Apr;113(4):701–7.
- Millar EV, O'Brien KL, Zell ER, Bronsdon MA, Reid R, Santosham M. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Navajo and White Mountain Apache children before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Aug;28(8):711–6.
- Millar EV, Watt JP, Bronsdon MA, Dallas J, Reid R, Santosham M, et al. Indirect effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal colonization among unvaccinated household members. *Clin Infect Dis*. 2008 Oct 15;47(8):989–96.
- Miller EK, Khuri-Bulos N, Williams JV, Shehabi AA, Faouri S, Al Jundi I, et al. Human rhinovirus C associated with wheezing in hospitalised children in the Middle East. *J Clin Virol*. 2009 Sep;46(1):85–9.
- Mills EL. Viral infections predisposing to bacterial infections. *Annu Rev Med*. 1984;35:469–79.
- Milucky J, Carvalho M de G, Roupheal N, Bennett NM, Talbot HK, Harrison LH, et al. *Streptococcus pneumoniae* colonization after introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for US adults 65 years of age and older, 2015-2016. *Vaccine*. 2019 Feb 14;37(8):1094–100.
- Moore DP, Dagan R, Madhi SA. Respiratory viral and pneumococcal coinfection of the respiratory tract: implications of pneumococcal vaccination. *Expert Rev Respir Med*. 2012 Aug;6(4):451–65.
- Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*. 2008 Oct 1;198(7):962–70.
- Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu Rev Virol*. 2020 Sep 29;7(1):83–101.
- Mott M, Caierão J, Rosa da Cunha G, Rodrigues Perez LR, Matusiak R, Pilger de Oliveira KR, et al. Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Int J Infect Dis*. 2014 Mar;20:47–51.
- Ministério da Saúde. Dia Mundial da Pneumonia [Internet]. 2019a [cited 2022a Feb 17]. Available from: <https://bvsms.saude.gov.br/12-11-dia-mundial-da-pneumonia/>
- Ministério da Saúde. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. 5a ed. Brasília D. F. Brasil: Ministério. 2019b.
- Ministério da Saúde. Ministério da saúde Governo Federal Brasil - Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2019. 2020; Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/13/informe-epidemiologico_influenza-2019-se52.pdf
- Ministério da Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais [Internet]. 2019b [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://www.rets.epsjv.fiocruz.br/biblioteca/vigilancia-em-saude-no-brasil-20032019-da-criacao-da-secretaria-de-vigilancia-em-saude>

- Ministério da Saúde. Sazonalidade do Vírus Sincicial Respiratório no Brasil. Nota técnica conjunta número 05/2015 CGSCAM/DAPE/SAS/MS, CGAFME/DAF/SCTIE/ MS e CGDT/DEVIT/SVS/MS. 2017; Available from: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/Diretrizes_manejo_infeccao_causada_VSR2017.pdf
- Ministério da Saúde. Guia de vigilância da covid. Ministério da Saúde do Governo Federal - Brasil [Internet]. 2021; Available from: https://coronavirus.saude.mg.gov.br/images/1_2021/17-03-Guia_de_vigilancia_da_covid_16marc2021.pdf
- Muhandule Birindwa A, Gonzales-Siles L, Nordén R, Geravandi S, Tumusifu Manegabe J, Morisho L, et al. High bacterial and viral load in the upper respiratory tract of children in the Democratic Republic of the Congo. *PLoS One*. 2020 Oct 29;15(10):e0240922.
- Nackers F, Cohuet S, le Polain de Waroux O, Langendorf C, Nyehangane D, Ndazima D, et al. Carriage prevalence and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* prior to 10-valent pneumococcal vaccine introduction: A population-based cross-sectional study in South Western Uganda, 2014. *Vaccine*. 2017 Sep 18;35(39):5271–7.
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 May 1;375(9725):1545–55.
- Nascimento-Carvalho AC, Vilas-Boas AL, Fontoura MSH, Xu M, Vuorinen T, Söderlund-Venermo M, et al. Serologically diagnosed acute human bocavirus 1 infection in childhood community-acquired pneumonia. *Pediatr Pulmonol*. 2018 Jan;53(1):88–94.
- Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MRA, Barral A, Araújo-Neto CA, Oliveira JR, Sobral LS, et al. Seasonal patterns of viral and bacterial infections among children hospitalized with community-acquired pneumonia in a tropical region. *Scand J Infect Dis*. 2010 Dec;42(11-12):839–44.
- Nascimento-Carvalho CM, Oliveira JR, Cardoso MRA, Araújo-Neto C, Barral A, Saukkoriipi A, et al. Respiratory viral infections among children with community-acquired pneumonia and pleural effusion. *Scand J Infect Dis*. 2013 Jun;45(6):478–83.
- Nascimento-Carvalho CM, Ribeiro CT, Cardoso MRA, Barral A, Araújo-Neto CA, Oliveira JR, et al. The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Oct;27(10):939–41.
- Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun*. 2007 Jan;75(1):83–90.
- Neves FPG, Cardoso NT, Snyder RE, Marlow MA, Cardoso CAA, Teixeira LM, et al. Pneumococcal carriage among children after four years of routine 10-valent pneumococcal conjugate vaccine use in Brazil: The emergence of multidrug resistant serotype 6C. *Vaccine*. 2017 May 15;35(21):2794–800.
- Nguyen DT, Louwen R, Elberse K, van Amerongen G, Yüksel S, Luijendijk A, et al. *Streptococcus pneumoniae* Enhances Human Respiratory Syncytial Virus Infection In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. 2015 May 13;10(5):e0127098.
- Nguyen DT, Tien Nguyen D, de Witte L, Ludlow M, Yüksel S, Wiesmüller KH, et al. The Synthetic Bacterial Lipopeptide Pam3CSK4 Modulates Respiratory Syncytial Virus Infection Independent of TLR Activation [Internet]. Vol. 6, *PLoS Pathogens*. 2010. p.

e1001049. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001049>

Nolan VG, Arnold SR, Bramley AM, Ampofo K, Williams DJ, Grijalva CG, et al. Etiology and Impact of Coinfections in Children Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia. *J Infect Dis.* 2018 Jun 20;218(2):179–88.

NVEH/SCMG. Boletim epidemiológico - SINDROME RESPIRATORIA AGUDA GRAVE. Núcleo de Vigilância Epidemiológica Hospitalar (NVEH), Santa Casa de Misericórdia de Goiânia (SCMG) [Internet]. 2017; Available from: https://www.saude.go.gov.br/images/imagens_migradas/upload/arquivos/2017-07/bolepi_scmg_2017-061.pdf

O'Brien KL, Millar EV, Zell ER, Bronsdon M, Weatherholtz R, Reid R, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization among immunized and unimmunized children in a community-randomized trial. *J Infect Dis.* 2007 Oct 15;196(8):1211–20.

O'Brien KL, Shaw J, Weatherholtz R, Reid R, Watt J, Croll J, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* among Navajo children in the era before use of conjugate pneumococcal vaccines, 1989-1996. *Am J Epidemiol.* 2004 Aug 1;160(3):270–8.

O'Brien KL, Walters MI, Sellman J, Quinlisk P, Regnery H, Schwartz B, et al. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: the role of preceding influenza infection. *Clin Infect Dis.* 2000 May;30(5):784–9.

Okada T, Morozumi M, Matsubara K, Komiyama O, Ubukata K, Takahashi T, et al. Characteristic findings of pediatric inpatients with pandemic (H1N1) 2009 virus infection among severe and nonsevere illnesses. *J Infect Chemother.* 2011 Apr;17(2):238–45.

OPAS. Vigilância das pneumonias e meningites bacterianas em crianças menores de 5 anos. Guia prático. Segunda edição. Brasília, D.F.: Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS); 2020. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Orihuela CJ, Gao G, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis.* 2004 Nov 1;190(9):1661–9.

Pacheco GA, Gálvez NMS, Soto JA, Andrade CA, Kalergis AM. Bacterial and Viral Coinfections with the Human Respiratory Syncytial Virus. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Jun 13;9(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9061293>

Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, Kapoor V, et al. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One.* 2009 Dec 31;4(12):e8540.

Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis.* 2014 Aug;25:45–52.

Pecchini R, Berezin EN, Souza MC, Vaz-de-Lima L de A, Sato N, Salgado M, et al. Parainfluenza virus as a cause of acute respiratory infection in hospitalized children. *Braz J Infect Dis.* 2015 Jul;19(4):358–62.

Pellett PE, Mitra S, Holland TC. Basics of virology. *Handb Clin Neurol.* 2014;123:45–66.

Peltola V, Heikkinen T, Ruuskanen O, Jartti T, Hovi T, Kilpi T, et al. Temporal association between rhinovirus circulation in the community and invasive pneumococcal disease in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Jun;30(6):456–61.

- Peltola VT, Gopal Murti K, McCullers JA. Influenza Virus Neuraminidase Contributes to Secondary Bacterial Pneumonia [Internet]. Vol. 192, *The Journal of Infectious Diseases*. 2005. p. 249–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1086/430954>
- Peltola VT, McCullers JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Jan;23(1 Suppl):S87–97.
- Perales JG, Pistre IP, Junior AC. Respiratory diseases in childhood: biomolecular, clinical and surgical aspects. Rio de Janeiro: Elsevier. 2016;1.
- Perdrizet J, Santana CFS, Senna T, Alexandre RF, Sini de Almeida R, Spinardi 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. *Hum Vaccin Immunother*. 2021 Apr 3;17(4):1162–72.
- Pereira VS, Rosa AM, Hacon S de S, Castro HA de, Ignotti E. Análise dos atendimentos ambulatoriais por doenças respiratórias no Município de Alta Floresta - Mato Grosso - Amazônia brasileira. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2011;1(3):393–400.
- Perez VP, Caierão J, Fischer GB, Dias CAG, d'Azevedo PA. Pleural effusion with negative culture: a challenge for pneumococcal diagnosis in children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Oct;86(2):200–4.
- Pernica JM, Inch K, Alfaraidi H, Van Meer A, Carciumaru R, Luinstra K, et al. Assessment of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* colonization does not permit discrimination between Canadian children with viral and bacterial respiratory infection: a matched-cohort cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2021 May 31;21(1):509.
- Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C. Human Influenza Virus Infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016 Aug;37(4):487–500.
- Petersdorf RG, Fusco JJ, Harter DH, Albrink WS. Pulmonary infections complicating Asian influenza. *AMA Arch Intern Med*. 1959 Feb;103(2):262–72.
- Pettigrew MM, Gent JF, Pyles RB, Miller AL, Nokso-Koivisto J, Chonmaitree T. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. *J Clin Microbiol*. 2011 Nov;49(11):3750–5.
- Pettigrew MM, Marks LR, Kong Y, Gent JF, Roche-Hakansson H, Hakansson AP. Dynamic changes in the *Streptococcus pneumoniae* transcriptome during transition from biofilm formation to invasive disease upon influenza A virus infection. *Infect Immun*. 2014 Nov;82(11):4607–19.
- van Piggelen RO, van Loon AM, Krediet TG, Verboon-Macielek MA. Human rhinovirus causes severe infection in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Apr;29(4):364–5.
- Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Feb;106(1):56–60.
- Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 2010 Jan 1;201(1):32–41.
- Pineda Solas V, Pérez Benito A, Domingo Puiggros M, Larramona Carrera H, Segura Porta F, Fontanals Aymerich D. [Bacteremic pneumococcal pneumonia]. *An Esp Pediatr*. 2002 Nov;57(5):408–13.

- Pitrez PMC, Stein RT, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones MH, et al. [Rhinovirus and acute bronchiolitis in young infants]. *J Pediatr*. 2005 Sep;81(5):417–20.
- Pittet LA, Hall-Stoodley L, Rutkowski MR, Harmsen AG. Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Apr;42(4):450–60.
- Pizzutti K, Perez VP, Barbiero C, d'Azevedo PA, Fischer GB, Dias C. Identifying pneumococci in parapneumonic pleural effusion: Is there a role for culture-independent methods? *Pediatr Pulmonol*. 2020 Feb;55(2):484–9.
- Plotkowski MC, Puchelle E, Beck G, Jacquot J, Hannoun C. Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Nov;134(5):1040–4.
- van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009 Oct 31;374(9700):1543–56.
- Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 2015 Sep 12;386(9998):1097–108.
- Principi N, Marchisio P, Schito GC, Mannelli S. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascanius Project Collaborative Group. *Pediatr Infect Dis J*. 1999 Jun;18(6):517–23.
- Pscheidt VM, Gregianini TS, Martins LG, Veiga ABG da. Epidemiology of human adenovirus associated with respiratory infection in southern Brazil. *Rev Med Virol*. 2021 Jul;31(4):e2189.
- Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 912 infants and children hospitalized for treatment of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Mar;23(3):267–9.
- Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1417–64.
- Randolph AG, Reder L, Englund JA. Risk of bacterial infection in previously healthy respiratory syncytial virus-infected young children admitted to the intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Nov;23(11):990–4.
- Rayner RE, Savill J, Hafner LM, Huygens F. Genotyping *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2015;10(4):653–64.
- Raza MW, Blackwell CC, Elton RA, Weir DM. Bactericidal activity of a monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus. *J Med Microbiol*. 2000 Mar;49(3):227–33.
- Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis*. 2004 Mar 1;38(5):632–9.
- Renwick N, Schweiger B, Kapoor V, Liu Z, Villari J, Bullmann R, et al. A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany. *J Infect Dis*. 2007 Dec 15;196(12):1754–60.
- Resch B, Gusenleitner W, Mueller WD. Risk of concurrent bacterial infection in preterm infants hospitalized due to respiratory syncytial virus infection. *Acta Paediatr*. 2007 Apr;96(4):495–8.

- Resti M, Micheli A, Moriondo M, Becciolini L, Cortimiglia M, Canessa C, et al. Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. *Clin Ther*. 2009 Jun;31(6):1266–73.
- Ricart S, Marcos MA, Sarda M, Anton A, Muñoz-Almagro C, Pumarola T, et al. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol*. 2013 May;48(5):456–63.
- Rigatto O, Gomes B, Silva E. Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(2):134–44.
- Ruane D, Chorny A, Lee H, Faith J, Pandey G, Shan M, et al. Microbiota regulate the ability of lung dendritic cells to induce IgA class-switch recombination and generate protective gastrointestinal immune responses. *J Exp Med*. 2016 Jan 11;213(1):53–73.
- Rubin LG. Pneumococcal vaccine. *Pediatr Clin North Am*. 2000 Apr;47(2):269–85, v.
- Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011 Apr 9;377(9773):1264–75.
- Sahin-Yilmaz A, Naclerio RM. Anatomy and physiology of the upper airway. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 Mar;8(1):31–9.
- Sajjan US, Jia Y, Newcomb DC, Bentley JK, Lukacs NW, LiPuma JJ, et al. H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2121–3.
- Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, Gruenert DC, Hershenson MB. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Dec 15;178(12):1271–81.
- Salgado VR, Fukutani KF, Fukutani E, Lima JV, Rossi EA, Barral A, et al. Effects of 10-valent pneumococcal conjugate (PCV10) vaccination on the nasopharyngeal microbiome. *Vaccine*. 2020 Feb 5;38(6):1436–43.
- Sanchez CJ, Kumar N, Lizcano A, Shivshankar P, Dunning Hotopp JC, Jorgensen JH, et al. *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. *PLoS One*. 2011 Dec 8;6(12):e28738.
- SBP. Pneumonia adquirida na Comunidade na Infância. Sociedade Brasileira de Pediatria [Internet]. 2018; Available from: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/Pneumologia_-_20981d-DC_-_Pneumonia_adquirida_na_comunidade-ok.pdf
- Schochet. Anatomy of a Child's Lung [Internet]. Pediatric Pulmonologists. 2015 [cited 2022 Feb 11]. Available from: <https://www.pedilung.com/pediatric-lung-diseases-disorders/anatomy-of-a-childs-lung/>
- Schuck-Paim C, Shanks GD, Almeida FEA, Alonso WJ. Exceptionally high mortality rate of the 1918 influenza pandemic in the Brazilian naval fleet. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013 Jan;7(1):27–34.
- Schwarzmann SW, Adler JL, Sullivan RJ Jr, Marine WM. Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med*. 1971a Jun;127(6):1037–41.

- Schwarzmann SW, Adler JL, Sullivan RJ, Marine WM. Bacterial Pneumonia During the Hong Kong Influenza Epidemic of 1968-1969: Experience in a City-County Hospital. *Arch Intern Med.* 1971b Jun 1;127(6):1037–41.
- Scotta MC, Veras TN, Klein PC, Tronco V, Polack FP, Mattiello R, et al. Impact of 10-valent pneumococcal non-typeable Haemophilus influenzae protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) on childhood pneumonia hospitalizations in Brazil two years after introduction. *Vaccine.* 2014 Jul 31;32(35):4495–9.
- Self WH, Williams DJ, Zhu Y, Ampofo K, Pavia AT, Chappell JD, et al. Respiratory Viral Detection in Children and Adults: Comparing Asymptomatic Controls and Patients With Community-Acquired Pneumonia. *J Infect Dis.* 2016 Feb 15;213(4):584–91.
- Sender V, Hentrich K, Henriques-Normark B. Virus-Induced Changes of the Respiratory Tract Environment Promote Secondary Infections With *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Mar 22;11:643326.
- Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet.* 2017 Sep 2;390(10098):946–58.
- Silva Filho EB da, Silva AL da, Santos A de O dos, Dall'acqua DSV, Souza LFB, Others. Infecções respiratórias de importância clínica: uma revisão sistemática. 2017; Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/33445/2/Infec%20a7%20b5es%20Respirat%20b3rias%20de%20import%20ancia%20cl%20adnica%20uma%20revis%20a3o%20sistem%20a1tica.pdf>
- da Silva LHA, Spilki FR, Riccetto AGL, Baracat EE, Arns CW. Human Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus. *Clinical & Biomedical Research [Internet].* 2009 Aug 24 [cited 2022 Feb 28];29(2). Available from: <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/8065>
- Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL, et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines.* 2012 Jul;11(7):841–55.
- Simoes EAF, Cherian T, Chow J, Shahid-Salles SA, Laxminarayan R, John TJ. Acute Respiratory Infections in Children. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries.* Washington (DC): World Bank; 2011.
- Singanayagam A, Joshi PV, Mallia P, Johnston SL. Viruses exacerbating chronic pulmonary disease: the role of immune modulation. *BMC Med.* 2012 Mar 15;10:27.
- SIREVA. Informação da vigilância das pneumonias e meningites bacterianas. IAL [Internet]. 2020; Available from: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/sireva_2020_hi_men_spn_portal_ial_06-06-2021.pdf
- Sleeman KL, Daniels L, Gardiner M, Griffiths D, Deeks JJ, Dagan R, et al. Acquisition of *Streptococcus pneumoniae* and nonspecific morbidity in infants and their families: a cohort study. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Feb;24(2):121–7.
- Small CL, Shaler CR, McCormick S, Jeyanathan M, Damjanovic D, Brown EG, et al. Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. *J Immunol.* 2010 Feb

- 15;184(4):2048–56.
- Smith AM, Adler FR, Ribeiro RM, Gutenkunst RN, McAuley JL, McCullers JA, et al. Kinetics of coinfection with influenza A virus and *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*. 2013 Mar;9(3):e1003238.
- Smith CM, Sandrini S, Datta S, Freestone P, Shafeeq S, Radhakrishnan P, et al. Respiratory syncytial virus increases the virulence of *Streptococcus pneumoniae* by binding to penicillin binding protein 1a. A new paradigm in respiratory infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Jul 15;190(2):196–207.
- Smith JA, Mullerworth MH, Westlake GW, Tatoulis J. Empyema thoracis: 14-year experience in a teaching center. *Ann Thorac Surg*. 1991 Jan;51(1):39–42.
- Smith-Vaughan HC, Binks MJ, Beissbarth J, Chang AB, McCallum GB, Mackay IM, et al. Bacteria and viruses in the nasopharynx immediately prior to onset of acute lower respiratory infections in Indigenous Australian children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Sep;37(9):1785–94.
- Sofia S. Teórica, Fundamentação - Infecções respiratórias agudas. Available from: https://www.unasus.unifesp.br/biblioteca_virtual/pab/2/unidades_casos_complexos/unidade14/unidade14_ft_infecoes.pdf
- Souza EV de, de Souza YFVP, Medeiros RS, de Azevedo LS, de Queiroz TGA, Sanz-Duro RL, et al. Diversity of enteric and non-enteric human adenovirus strains in Brazil, 2006-2011. *Arch Virol*. 2021 Mar;166(3):897–903.
- Spezia PG, Macera L, Mazzetti P, Curcio M, Biagini C, Sciandra I, et al. Redondovirus DNA in human respiratory samples. *J Clin Virol*. 2020 Oct;131:104586.
- Spijkerman J, Prevaes SMPJ, van Gils EJM, Veenhoven RH, Bruin JP, Bogaert D, et al. Long-term effects of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis*. *PLoS One*. 2012 Jun 25;7(6):e39730.
- Srinivasan V, du Plessis M, Beall BW, McGee L. Quadriplex real-time polymerase chain reaction (*lytA*, *mef*, *erm*, *pbp2b(wt)*) for pneumococcal detection and assessment of antibiotic susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Dec;71(4):453–6.
- Standish AJ, Weiser JN. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2602–9.
- Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN, LeVine AM. Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol*. 2006 Jun;78(6):829–38.
- Steiner M, Strassl R, Straub J, Böhm J, Popow-Kraupp T, Berger A. Nosocomial rhinovirus infection in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Dec;31(12):1302–4.
- Steinfort C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, et al. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun*. 1989 Jul;57(7):2006–13.
- Stein RT, Bont LJ, Zar H, Polack FP, Park C, Claxton A, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2017 Apr;52(4):556–69.
- Stensballe LG, Hjuler T, Andersen A, Kaltoft M, Ravn H, Aaby P, et al. Hospitalization for

- respiratory syncytial virus infection and invasive pneumococcal disease in Danish children aged <2 years: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 15;46(8):1165–71.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 2002 Jan 30;56:187–209.
- Stralioatto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha MLT, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Jul;35(4):283–91.
- Sultana M, Sarker AR, Sheikh N, Akram R, Ali N, Mahumud RA, et al. Prevalence, determinants and health care-seeking behavior of childhood acute respiratory tract infections in Bangladesh. *PLoS One*. 2019 Jan 10;14(1):e0210433.
- Sumitomo T, Nakata M, Nagase S, Takahara Y, Honda-Ogawa M, Mori Y, et al. GP96 Drives Exacerbation of Secondary Bacterial Pneumonia following Influenza A Virus Infection. *MBio*. 2021 Jun 29;12(3):e0326920.
- Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KM, et al. Seasonality of invasive pneumococcal disease: temporal relation to documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *Am J Med*. 2005 Mar;118(3):285–91.
- Tan TQ. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jul;25(3):409–19.
- Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Sep;14(9):828–34.
- Tavares DA, Handem S, Carvalho RJ, Paulo AC, de Lencastre H, Hinds J, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* by a real-time PCR assay targeting SP2020. *Sci Rep*. 2019 Mar 1;9(1):3285.
- Techasaensiri B, Techasaensiri C, Mejías A, McCracken GH Jr, Ramilo O. Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Jun;29(6):519–23.
- Thadchanamoorthy V, Dayasiri K. Review on Pneumococcal Infection in Children. *Cureus*. 2021 May 9;13(5):e14913.
- Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DBL, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr*. 2007 Sep;83(5):422–8.
- Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HKF. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax*. 2006 Jul;61(7):611–5.
- Tin Tin Htar M, Sings HL, Syrochkina M, Taysi B, Hilton B, Schmitt HJ, et al. The impact of pneumococcal conjugate vaccines on serotype 19A nasopharyngeal carriage. *Expert Rev Vaccines*. 2019 Dec;18(12):1243–70.
- Titus MO, Wright SW. Prevalence of serious bacterial infections in febrile infants with respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 2003 Aug;112(2):282–4.
- To KKW, Lau SKP, Chan KH, Mok KY, Luk HKH, Yip CCY, et al. Pulmonary and extrapulmonary complications of human rhinovirus infection in critically ill patients. *J Clin*

Virol. 2016 Apr;77:85–91.

- Tong HH, Grants I, Liu X, DeMaria TF. Comparison of alteration of cell surface carbohydrates of the chinchilla tubotympanum and colonial opacity phenotype of *Streptococcus pneumoniae* during experimental pneumococcal otitis media with or without an antecedent influenza A virus infection. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4292–301.
- Tong HH, James M, Grants I, Liu X, Shi G, DeMaria TF. Comparison of structural changes of cell surface carbohydrates in the eustachian tube epithelium of chinchillas infected with a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant or its isogenic parent strain [Internet]. Vol. 31, *Microbial Pathogenesis*. 2001. p. 309–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.2001.0473>
- Tong HH, McIver MA, Fisher LM, DeMaria TF. Effect of lacto-N-neotetraose, asialoganglioside-GM1 and neuraminidase on adherence of otitis media-associated serotypes of *Streptococcus pneumoniae* to chinchilla tracheal epithelium. *Microb Pathog*. 1999 Feb;26(2):111–9.
- Torzillo PJ, Gratten M. Conjugate pneumococcal vaccines for aboriginal children in Australia. *Med J Aust*. 2000 Oct 2;173(S2):S51–3.
- Trzciński K, Bogaert D, Wyllie A, Chu MLJN, van der Ende A, Bruin JP, et al. Superiority of trans-oral over trans-nasal sampling in detecting *Streptococcus pneumoniae* colonization in adults. *PLoS One*. 2013 Mar 28;8(3):e60520.
- Turner P, Leab P, Ly S, Sao S, Miliya T, Heffelfinger JD, et al. Impact of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Colonization and Invasive Disease in Cambodian Children. *Clin Infect Dis*. 2020 Apr 10;70(8):1580–8.
- Unger SA, Bogaert D. The respiratory microbiome and respiratory infections. *J Infect*. 2017 Jun;74 Suppl 1:S84–8.
- van Kerkhove MD, Mounts AW, Mall S, Vandemaele KAH, Chamberland M, dos Santos T, et al. Epidemiologic and virologic assessment of the 2009 influenza A (H1N1) pandemic on selected temperate countries in the Southern Hemisphere: Argentina, Australia, Chile, New Zealand and South Africa. *Influenza Other Respi Viruses*. 2011 Nov;5(6):e487–98.
- Vannella KM, Moore BB. Viruses as co-factors for the initiation or exacerbation of lung fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008 Oct 13;1(1):2.
- Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson JF, Jacques MA, Lebrun MH, et al. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Mar 5;4:29.
- Veiga ABG da, Martins LG, Riediger I, Mazetto A, Debur M do C, Gregianini TS. More than just a common cold: Endemic coronaviruses OC43, HKU1, NL63, and 229E associated with severe acute respiratory infection and fatality cases among healthy adults. *J Med Virol*. 2021 Feb;93(2):1002–7.
- Verkaik NJ, Nguyen DT, de Vogel CP, Moll HA, Verbrugh HA, Jaddoe VWV, et al. *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Dec;17(12):1840–4.
- Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia. In: *Tratado de infectologia*. 2004. p. 984–984.
- Vespa G, Constenla DO, Pepe C, Safadi MA, Berezin E, de Moraes JC, et al. Estimating the

- cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination in Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2009 Dec;26(6):518–28.
- Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):142–50.
- Vissers M, Ahout IM, van den Kieboom CH, van der Gaast-de Jongh CE, Groh L, Cremers AJ, et al. High pneumococcal density correlates with more mucosal inflammation and reduced respiratory syncytial virus disease severity in infants. *BMC Infect Dis*. 2016 Mar 17;16:129.
- Vu HTT, Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HAT, Nguyen CDL, Nguyen ATT, et al. Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Jan;30(1):11–8.
- Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000-15. *Lancet Glob Health*. 2018 Jul;6(7):e744–57.
- Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope*. 2009 Jul;119(7):1406–11.
- Wang YJ, Liu J, Fang F, He LY, Li JM, Zhang Q, et al. [Microbiological etiology in children with community acquired pneumonia]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010 Mar;12(3):184–7.
- Watelet JB, Van Cauwenberge P. Applied anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. *Allergy*. 1999;54 Suppl 57:14–25.
- Watson M, Gilmour R, Menzies R, Ferson M, McIntyre P, New South Wales Pneumococcal Network. The association of respiratory viruses, temperature, and other climatic parameters with the incidence of invasive pneumococcal disease in Sydney, Australia. *Clin Infect Dis*. 2006 Jan 15;42(2):211–5.
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jun;16(6):355–67.
- Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, Broughton K, Woodard G, Sturgeon D, et al. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of “Atypical” pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1374–82.
- White ANJ, Ng V, Spain CV, Johnson CC, Kinlin LM, Fisman DN. Let the sun shine in: effects of ultraviolet radiation on invasive pneumococcal disease risk in Philadelphia, Pennsylvania. *BMC Infect Dis*. 2009 Dec 4;9:196.
- WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007;82(12):93–104.
- WHO. The Global Impact of Respiratory Disease. Second Edition Forum of International Respiratory Societies [Internet]. 2017;(9781849840873). Available from: https://www.who.int/gard/publications/The_Global_Impact_of_Respiratory_Disease_PO R.pdf
- WHO. WHO - The top 10 causes of death [Internet]. 2019 [cited 2022 Jan 4]. Available from:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

- WHO. Pneumonia [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 16]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>
- Wiese AD, Griffin MR, Zhu Y, Mitchel EF Jr, Grijalva CG. Changes in empyema among U.S. children in the pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine*. 2016 Dec 7;34(50):6243–9.
- Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):233–43.
- Willner D, Furlan M, Haynes M, Schmieder R, Angly FE, Silva J, et al. Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS One*. 2009 Oct 9;4(10):e7370.
- Wolter N, Tempia S, Cohen C, Madhi SA, Venter M, Moyes J, et al. High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral coinfection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*. 2014 Nov 15;210(10):1649–57.
- Wormer JR, Shankar A, Van Hensbroek MB, Hindori-Mohangoo AD, Covert H, Lichtveld MY, et al. Poor Adherence to the WHO Guidelines on Feeding Practices Increases the Risk for Respiratory Infections in Surinamese Preschool Children. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Oct 13;18(20). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph182010739>
- Wubbel L, Muniz L, Ahmed A, Trujillo M, Carubelli C, McCoig C, et al. Etiology and treatment of community-acquired pneumonia in ambulatory children. *Pediatr Infect Dis J*. 1999 Feb;18(2):98–104.
- Wylie KM, Mihindukulasuriya KA, Sodergren E, Weinstock GM, Storch GA. Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. *PLoS One*. 2012 Jun 13;7(6):e27735.
- Wyllie AL, Pannekoek Y, Bovenkerk S, van Engelsdorp Gastelaars J, Ferwerda B, van de Beek D, et al. Sequencing of the variable region of rpsB to discriminate between *Streptococcus pneumoniae* and other streptococcal species. *Open Biol* [Internet]. 2017 Sep;7(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.170074>
- Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH, Cho DY, Holmes S, et al. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. *Cell Host Microbe*. 2013 Dec 11;14(6):631–40.
- Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Le MN, Dinh Vu T, Yoshino H, et al. Respiratory syncytial virus: co-infection and paediatric lower respiratory tract infections. *Eur Respir J*. 2013 Aug;42(2):461–9.
- Young JC, Chehoud C, Bittinger K, Bailey A, Diamond JM, Cantu E, et al. Viral metagenomics reveal blooms of anelloviruses in the respiratory tract of lung transplant recipients. *Am J Transplant*. 2015 Jan;15(1):200–9.
- Yun KW, Wallihan R, Desai A, Alter S, Ambroggio L, Cohen DM, et al. Clinical Characteristics and Etiology of Community-Acquired Pneumonia in US Children, 2015–2018. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2022 Feb 8; Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0000000000003475>
- Yun KW, Wallihan R, Juergensen A, Mejias A, Ramilo O. Community-Acquired Pneumonia in Children: Myths and Facts. *Am J Perinatol*. 2019 Jul;36(S 02):S54–7.

Zhang H, Wang Y, Porter E, Lu N, Li Y, Yuan F, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of influenza A, B, C, and D viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019 Sep;95(1):59–66.

Zhang N, Wang L, Deng X, Liang R, Su M, He C, et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J Med Virol*. 2020 Apr;92(4):408–17.

Zhang TG, Li AH, Lyu M, Chen M, Huang F, Wu J. Detection of respiratory viral and bacterial pathogens causing pediatric community-acquired pneumonia in Beijing using real-time PCR. *Chronic Dis Transl Med*. 2015 Jun;1(2):110–6.

Zhou H, Haber M, Ray S, Farley MM, Panozzo CA, Klugman KP. Invasive pneumococcal pneumonia and respiratory virus co-infections. *Emerg Infect Dis*. 2012 Feb;18(2):294–7.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

MANUSCRITO

“Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Brazilian children: interplay with viral co-infection” publicado na revista Plos One.

As normas para publicação podem ser consultadas no link: <https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

2021-2022 Impact Factor: 3.24

Qualis Capes: A1

O manuscrito pertencente a esta tese integra um projeto mais amplo (contemplado no Edital CHAMADA FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017 – PPSUS). Inicialmente, investigamos os fatores associados à colonização por *Streptococcus pneumoniae*, com ênfase na presença de vírus respiratórios. A seguir, respondendo à questão de pesquisa da tese, estudamos as consequências da colonização por pneumococos, com e sem presença de vírus nos desfechos respiratórios das crianças saudáveis. Pensamos em elaborar dois manuscritos para apresentar os resultados. Contudo, buscando um manuscrito mais amplo e consistente, que pudesse atender a complexidade do tema, decidimos por agregar todos os dados em um único manuscrito, que está aqui sendo apresentado.

RESEARCH ARTICLE

Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Brazilian children: Interplay with viral co-infection

Kauana Pizzutti^{1*}, Juliana Comerlato^{1,2}, Daniele Vargas de Oliveira¹, Amanda Robaina¹, Mariana Preussler Mott¹, Pedro Uriel Pedrotti Vieira¹, Tiago Fetzner¹, Gabriela Rosa da Cunha¹, Muriel Primon de Barros¹, Jaqueline Verardo¹, Nelde Maria Bruscato^{3,4}, João Carlos Batista Santana⁵, Roberta Rigo Dalla Corte⁵, Emilio Hideyuki Moriguchi^{3,5}, Vladimir Vicente Cantarelli¹, Cicero Armídio Gomes Dias¹

1 Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil, **2** Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil, **3** Moriguchi Institute, Veranópolis, RS, Brazil, **4** Community Hospital São Peregrino Lazziozi, Veranópolis, RS, Brazil, **5** Hospital of Health Clinic of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

* pizzuttik@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Pizzutti K, Comerlato J, Oliveira DVd, Robaina A, Mott MP, Vieira PUP, et al. (2025) Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Brazilian children: Interplay with viral co-infection. PLOS ONE 20(1): e0316444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316444>

Editor: Jaiaram Meena, Indian Institute of Technology BHU Varanasi, INDIA

Received: December 19, 2023

Accepted: December 11, 2024

Published: January 2, 2025

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316444>

Copyright: © 2025 Pizzutti et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files

Abstract

Nasopharyngeal transmission of *Streptococcus pneumoniae* is a prerequisite for the development of pneumococcal diseases. Previous studies have reported a relationship between respiratory viruses and *S. pneumoniae* infections. However, there are few studies on this issue among healthy children. This study aimed to examine the relationships between these agents in healthy children from Southern Brazil. This cohort study included 229 nasopharyngeal samples collected from children aged 18–59 months at baseline. *S. pneumoniae* was detected using bacterial culture, whereas respiratory viruses were identified using quantitative polymerase chain reaction. A questionnaire was used at the time of sample collection and medical records were reviewed 14 days after participant inclusion. The prevalence of pneumococcal carriage was 63.7% (146/229), while respiratory viruses were detected in 49.3% (113/229) of the children. Respiratory viruses were more frequently found among pneumococcal carriers than among non-carriers (54.4% vs. 39.7%, $p = 0.033$). Additionally, rhinovirus (hRV) was more frequent among the pneumococcal carriers (39% vs. 21.7%, $p = 0.012$), and the presence of human bocavirus (hBOV) alone was associated with the absence of pneumococcal carriage (2.7% vs. 10.8%, $p = 0.016$). No differences were found in the frequency of pneumococcal carriage, respiratory virus detection, or the co-occurrence of clinical symptoms and diagnosis in the participants 14 days after specimen collection. Our findings revealed a positive relationship between pneumococcal carriage and respiratory virus detection, particularly for hRV. However, we did not observe a relationship between nasopharyngeal respiratory viruses and pneumococci detection during medical appointments, respiratory symptoms, or diseases. This study was one of the first investigations in Latin America to explore the relationship between respiratory viruses and pneumococcal carriage in a healthy children.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is a common cause of invasive diseases, such as pneumonia, meningitis, and bacteremia. Since the global introduction of pneumococcal conjugate vaccines (PCV), the incidence of invasive pneumococcal disease (IPD) has declined [1–4]. However, this disease remains among the leading causes of morbidity and mortality in children under five years old and the elderly, particularly in low- and middle-income countries [5]. Global estimates indicate that pneumococcus caused 8.9 million cases of pneumonia in children aged 1–59 months and 294,000 deaths among children aged 1–59 months worldwide in 2015 [6]. Although conjugate vaccines are available, Brazil continues to experience a high annual pneumonia rate, primarily based on the number of hospitalizations for pneumonia in children during their first year of life, reaching 3,433 per 100,000 inhabitants [7]. Pneumococcal vaccine coverage in Brazil in 2017 was approximately 92%, with rates reaching 93.7% in southern Brazil [8].

Nasopharyngeal pneumococcal colonization (PNC) is a prerequisite for pneumococcal disease and facilitates transmission within the community [9, 10]. Various factors influence pneumococcal carriage, including age, nursery attendance, number of siblings, and vaccination [11, 12]. Viruses may also affect the prevalence of pneumococcal colonization. Recent studies have reported an increase in pneumococcal density when respiratory viruses were simultaneously present in the nasopharynx [13–16]. Increased density promotes pneumococcal invasion and the severity of IPD [12]. However, no specific value was established to reliably predict the possibility of pneumococcal pneumonia [17–20].

These viruses primarily cause acute respiratory infections (ARI) during childhood. During viral infection, PNC is associated with increased viral activity and progression to ARI [20–23]. Interactions between respiratory viruses and pneumococci increase the severity of respiratory illnesses [13, 14, 21, 24]. Additionally, the role of various viruses in creating conditions for bacterial superinfections, such as pneumococcal pneumonia, was previously documented [25, 26]. Epidemiological studies have shown that an increase in certain viruses among children is associated with higher rates of pediatric admission owing to IPD [24, 26, 27]. Furthermore, mechanistic studies have revealed that viruses increase bacterial adhesion, translocation, and persistence [28–31].

The relationship between viral infections and pneumococcal diseases has been thoroughly examined. However, there is information regarding the interaction between respiratory viruses and pneumococcal carriage in healthy children is lacking [14, 15]. Several studies have explored the heightened severity of infectious diseases when these pathogens interact [13–16, 21, 31]. However, there is a notable gap in data concerning children who are carriers of both pneumococcal and viral pathogens. This study aimed to examine the relationship between respiratory viruses, pneumococcal carriage, and the development of respiratory diseases in Brazilian children aged 18–59 months.

Materials and methods

Study population and data collection

We conducted a cohort study to investigate pneumococcal carriage and respiratory viruses in the nasopharynx of children aged 18–59 months. The participants were recruited between February 2018 and October 2019 from Veranópolis City, Rio Grande do Sul, Brazil. The city had an estimated population of 26,533 inhabitants in 2017, 781 of whom were children aged 18–59 months old. This age group included children who had complete vaccination schedules. Participants were recruited through schools, telephone calls, and radio announcements in the city.

All legal guardians provided written informed consent at the time of specimen collection using an informed consent form. If siblings were included, the legal guardian provided consent for both children. All participants were considered healthy enough to attend school and maintain a normal routine at the time of data collection. Individuals were deemed ineligible for enrollment if they had been diagnosed with acute respiratory disease or had been hospitalized in the week preceding specimen collection at enrollment. Health professionals trained for the study collected a nasopharyngeal specimen and conducted structural interviews with legal guardians to collect data on demographic characteristics, pneumococcal vaccination history, and the presence of symptoms, such as cough, coryza/congestion, or sore throat. The children did not undergo medical examinations.

The medical records of each participant were accessed in November 2019 and analyzed for up to 14 days after collection. This period was selected because respiratory disease and/or symptoms following co-infection with pneumococcus and respiratory viruses appear to manifest within a period of 1 to 2 weeks [15, 16, 20–22]. Data were retrieved from 15 different health services covering the entire city to identify symptoms and relevant outcomes. Symptoms, including cough, nasal congestion/coryza, sore throat, and fever, were considered. These outcomes were categorized according to the clinical syndromes: community-acquired pneumonia, sinusitis, acute otitis media, tonsillopharyngitis, asthma, and upper and lower ARI. All relevant outcomes were recorded in the database, with each occurrence counted only once per child, even if the same outcome was presented multiple times to the same participant. If there were no records of visits for a child, it was assumed that the child did not seek medical care for outcomes of interest during that period. The diagnoses documented in the records were based on clinical criteria established by each medical professional. Subsequently, each case was thoroughly reviewed by a pediatric researcher in our team (JCS).

Respiratory sample collection, and testing

Nasopharyngeal specimen collection followed the Specimen Collection Guidelines–CDC protocol [32], utilizing FLOQswab® (516CS01, Copan®, Murrieta, CA, USA), which were immediately placed in vials containing 1.0 mL skim milk, tryptone, glucose, glycerol transport medium and stored on dry ice. All nasopharyngeal specimens were sent to the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre. Subsequently, the specimens were transferred to a freezer at -80°C until culture. Pneumococcal isolation and identification were conducted using a previously described protocol [32], involving broth enrichment, followed by growth on a blood agar base.

The viral nucleic acid was extracted from NP specimens using the MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystems®) by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. The 18S rRNA gene was selected as an internal control to monitor nucleic acid extraction efficiency and potential PCR inhibition [33]. Ten respiratory viruses were screened: respiratory syncytial virus, influenza viruses (INF) A and B, metapneumovirus (MPV), human rhinovirus (hRV), adenovirus (ADV), human parainfluenza virus (hPIV) 1–3, and human bocavirus (hBOV). The quantitative PCR assays used are detailed in S1 Table and have been previously described [34–36].

Ethical approval

The study was approved by the Ethics Committees of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (approval numbers 2.176.785 and 3.374.087) and the Federal University of Rio Grande do Sul (Hospital de Clínicas de Porto Alegre; approval numbers 2.106.235 and 3.063.051).

Statistical analysis

The sample size was calculated considering the Brazilian PNC prevalence of 62.3% [37], with a 95% confidence level (CI) and an acceptable error of 5.3%, resulting in a required sample size of 229 children. Categorical variables were analyzed using frequencies and percentages, whereas continuous variables were summarized using means and standard deviations. The association between pneumococcal carriage and/or respiratory virus detection and age was assessed using the Kruskal–Wallis test followed by post-hoc Dunn’s pairwise tests and Bonferroni correction. The association of pneumococcal carriage with demographic data, symptoms, medical record analysis, and respiratory viruses was assessed using chi-square or Fisher’s exact tests. Odds ratios and multinomial logistic regression, where applicable. The multinomial logistic regression included four outcome categories including ‘agent identified’ (reference group), ‘pneumococcal carriage only,’ ‘respiratory virus detection only,’ and ‘co-occurrence.’ The exposure variables included age (months), male sex, lack of sleep, season, and any illness symptoms at enrollment. A chi-square or Fisher’s exact test was carried out on the symptoms at the time of collection, and each virus was investigated using two cut-off points: Ct <30 (high levels only) and <35 (any level); Ct >35 was considered negative. Results with a *p*-value < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS software (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

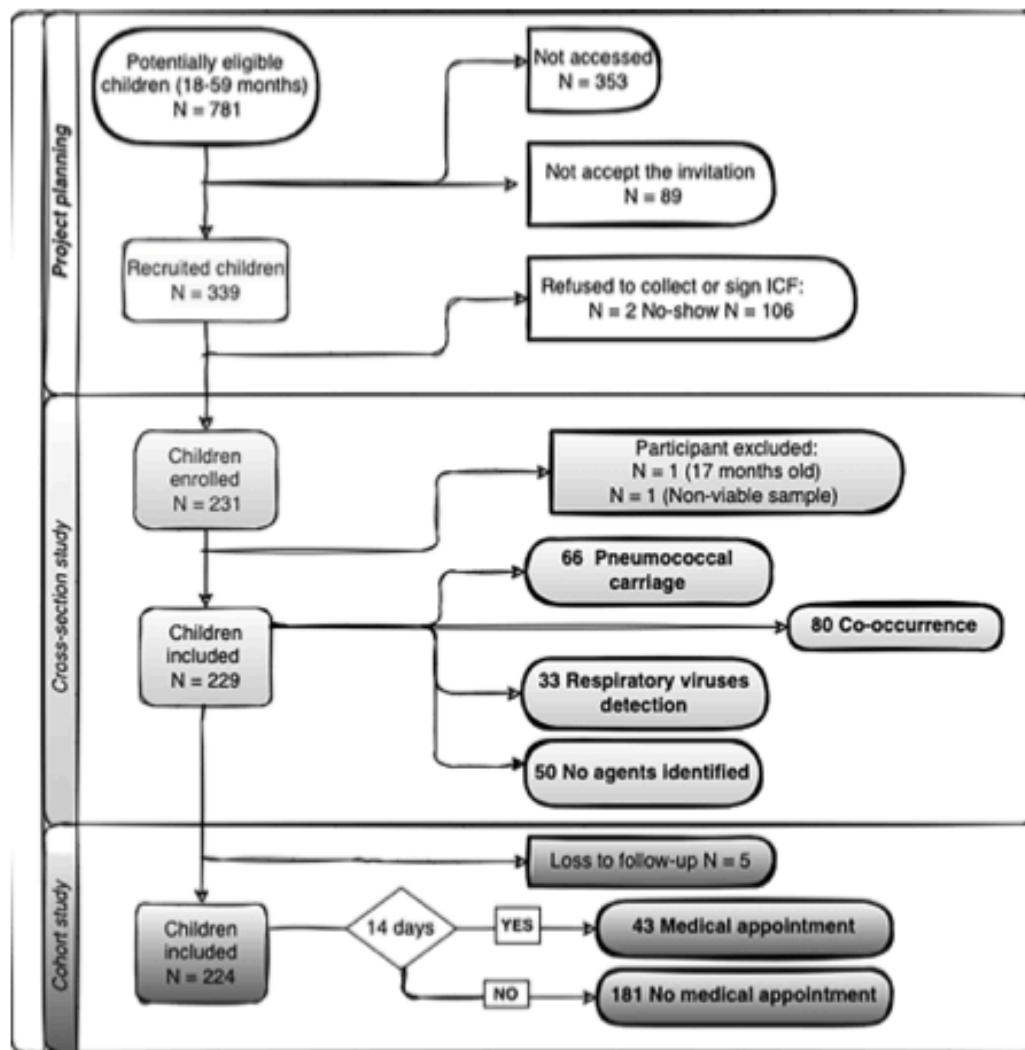
Results

In 2017, Veranópolis City had an estimated 781 children aged 18–59 months. A total of 229 children were included in this cross-sectional study (Fig 1). Five children were excluded from the medical record evaluation, resulting in 224 children included in the cohort study. The study population comprised equal numbers of females and males. Siblings were not clustered in the analyses because of the small number of participants under this condition (only 10 participants).

The prevalence of pneumococcal carriage was 63.7% (146/229, CI 95%: 57.4–69.8%) and 49.3% (113/229, CI 95%: 42.9–55.8%) for respiratory viruses. Respiratory viruses were more frequently found among pneumococcal carriers (54.4% (80/146) vs. non-carriers [39.7% (33/83); *p* = 0.033]). CI95%: 46.7–62.7%). Co-occurrence rate of 34.9% (80/229, CI 95%: 29.0–41.3%). As shown in Table 1, children who tested positive for viral infection, with or without the co-occurrence of pneumococcus, were younger than pneumococcal carriers (31 and 33 months vs. 42 months; *p* < 0.001). There was a significant relationship between viral and bacterial co-occurrence and male sex (63.8%; *p* = 0.004), whereas the absence of the investigated organisms was associated with females (Table 1).

Additionally, multinomial logistic regression analysis of certain demographic data and the presence of pneumococcal carriage, respiratory virus, and co-occurrence was conducted (S2 Table). With each passing month of age, the likelihood of acquiring a respiratory virus decreased by 4% (*p* = 0.020; OR 0.96, 95% CI 0.92; 0.99), and 5% for co-occurrence (*p* = 0.003; OR 0.95, 95% CI 0.92; 0.98). The male sex was associated with a higher co-occurrence rate (*p* = 0.001; OR 3.62, 95% CI 1.64; 7.98). The likelihood of co-occurrence was higher in fall (*p* = 0.018; OR 5.3, 95% CI 1.33; 21.09), compared with that in spring, which had the highest number of children without microorganisms detected. The symptoms associated with each virus at the time of collection were investigated using two cutoffs: Ct <30 (only high levels) and <35 (any level), as detailed in Table 2. The only symptom associated with the occurrence of any virus was sore throat with any hRV Ct value (*p* < 0.05).

Various viruses were detected in children with pneumococcal infections. A relationship was observed between total hRV (alone + co-detection) 39% (57/146, *p* = 0.011) and the



ICF, informed consent form.

Fig 1. Flow diagram of children aged 18–59 months, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019. ICF, informed consent form.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316444.g001>

detection of any respiratory virus 54.8% (80/146, $p = 0.040$) with pneumococcal carriage (Table 3). Additionally, the presence of hBOV alone was associated with the absence of pneumococcal carriage (10.8%; $p = 0.016$). All samples tested negative for INF A and B, as well as for hPIV 1, 2, and 3.

Table 1. Demographic characteristics of the population (n = 229) according to identified microorganisms, Veranópolis/RS, Brazil, 2018–2019.

	Total	Only Pneumococcal carriage	Only Respiratory viruses detection	Co-occurrence ³	No agents identified	p-value
n, (%)	229	66 (28.8%)	33 (14.4%)	80 (34.9%)	50 (21.8%)	
Age months, median [IQR]	36 [27; 48]	42 [30; 51]	31 [25; 47]	33 [24; 43]	42 [29; 54]	<0.001 ⁴
Male Sex	115 (50.2%)	30 (45.5%)	17 (51.5%)	51 (63.8%)	17 (34%)	0.008
Female Sex	114 (49.8%)	36 (54.5%)	16 (48.5%)	29 (36.2%)	33 (66%)	-
Self-reported race						0.428
White	212 (92.5%)	58 (87.9%)	31 (93.9%)	77 (96.3%)	46 (92%)	
Black	2 (0.9%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.3%)	1 (2%)	
Mixed race	13 (5.7%)	7 (10.6%)	1 (3%)	2 (2.5%)	3 (6%)	
Indigenous	1 (0.4%)	1 (1.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Doesn't know	1 (0.4%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Asthma	13 (5.7%)	3 (4.5%)	3 (9.1%)	4 (5%)	3 (6%)	0.812
Diabetes	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Kidney Disease	2 (0.9%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.3%)	1 (2%)	0.629
Heart Disease	1 (0.4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0.309
Liver Disease	1 (0.4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.600
Cystic Fibrosis	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Sickle cell Anemia	2 (0.9%)	1 (1.5%)	0 (0%)	1 (1.3%)	0 (0%)	0.759
Cancer	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Vaccine status ¹	225 (98.3%)	65 (98.5%)	31 (93.9%)	80 (100%)	49 (98%)	0.169
School attendance	213 (93%)	61 (92.4%)	31 (93.9%)	77 (96.3%)	44 (88%)	0.347
More than one child < 5 years old lives in the same household	32 (14%)	6 (9.1%)	7 (21.2%)	11 (13.8%)	8 (16%)	0.404
Other children < 5 years old sleep in the same bedroom of the participant	25 (10.9%)	9 (13.6%)	6 (18.2%)	5 (6.3%)	5 (10%)	0.248
Other people sleep in the same bedroom of the participant	163 (71.2%)	41 (62.1%)	27 (81.8%)	60 (75%)	35 (70%)	0.167
Family has a member smoker	46 (20.1%)	10 (15.2%)	10 (30.3%)	18 (22.5%)	8 (16%)	0.266
Education levels of legal guardians						0.801
Elementary school	38 (16.6%)	13 (19.7%)	7 (21.2%)	12 (15%)	6 (12%)	
High school	80 (34.9%)	19 (28.8%)	11 (33.3%)	31 (38.8%)	19 (38%)	
Undergraduate/graduate	111 (48.5%)	34 (51.53%)	15 (45.5%)	37 (46.3%)	25 (50%)	
Breastfeed						
Yes	215 (93.9%)	61 (92.4%)	30 (90.9%)	76 (95%)	48 (98%)	0.488
Information unavailable	1 (0.4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	
Breastfeeding at the time of interview (n = 212) ²	32 (15.1%)	6 (10%)	7 (23.3%)	12 (16%)	7 (14.9%)	0.415
Any illness symptoms at the interview	131 (57.2%)	42 (63.6%)	18 (54.5%)	40 (50%)	31 (62%)	0.337
Cough	79 (34.5%)	22 (33.3%)	12 (36.4%)	26 (32.5%)	19 (38%)	0.918

(Continued)

Table 1. (Continued)

	Total	Only Pneumococcal carriage	Only Respiratory viruses detection	Co-occurrence ³	No agents identified	p-value
Nasal congestion/coryza	108 (47.2%)	37 (56.1%)	14 (42.4%)	34 (42.5%)	23 (46%)	0.347
Sore throat	5 (2.2%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (5%)	1 (2%)	0.158
Seasons of the year of sample collection						0.146
Summer	6 (2.6%)	2 (3%)	1 (3%)	1 (1.3%)	2 (4%)	
Fall	102 (44.5%)	30 (45.5%)	10 (30.3%)	45 (56.3%)	17 (34%)	
Winter	97 (42.4%)	25 (37.9%)	19 (57.6%)	30 (37.5%)	23 (46%)	
Spring	24 (10.5%)	9 (13.6%)	3 (9.1%)	4 (5%)	8 (16%)	

p<0.05 significant by Kruskal–Wallis + Bonferroni test (Age) or the chi-square (other variables)

¹ At least one dose PCV10 and/or PCV13 vaccination.

² 17 legal guardian didn't answer if the child was still being breastfeeding

³ Co-occurrence = Pneumococcal carriage and respiratory virus detection.

⁴ Children who tested positive for virus infection and co-occurrence were younger than those that were pneumococcal carriers only

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316444.t001>

Among the eligible participants for the cohort study, 19.2% (43/224) required medical care within 14 days. Co-occurrence was present in 32.5% (14/43) of children who needed medical care. However, no statistically significant correlation was found between pneumococcal carriage, respiratory virus detection, or co-occurrence in the medical appointments of the participants 14 days after specimen collection (Table 4).

No relationships were found between the frequency of pneumococcal carriage, respiratory virus detection, or co-occurrence and different clinical symptoms and diagnoses of the participants 14 days after the collection of specimens (Table 4). The frequency of each respiratory virus and the symptoms of the children after 14 days of medical care are detailed in S4 Table.

Table 2. Frequency of clinical symptoms in children with detection of respiratory viruses by real-time PCR using the cut-off levels cycle threshold (CT), Ct-value of < 30 (only high levels) and < 35 (any level), Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.

Cycle Threshold (Ct)	Total	RNV			ADV			BOV			RSV			MPV			Any respiratory virus		
		<30	<35	>35	<30	<35	>35	<30	<35	>35	<30	<35	>35	<30	<35	>35	<30	<35	>35
n, (%)	229	33 (14.4)	75 (32.8)	154 (67.2)	9 (3.9)	23 (10)	206 (90)	6 (2.6)	27 (11.8)	202 (88.2)	3 (1.3)	17 (7.4)	212 (92.6)	2 (0.9)	17 (7.4)	212 (92.6)	47 (20.5)	113 (49.3)	116 (50.7)
Cough	79 (34.5)	11 (33.3)	26 (34.7)	53 (54.4)	2 (22.2)	5 (21.7)	74 (35.9)	0 (0)	8 (29.6)	71 (35.1)	0 (0)	4 (23.5)	75 (35.4)	0 (0)	5 (29.4)	74 (34.9)	13 (27.7)	38 (33.6)	41 (35.3)
Nasal congestion/coryza	108 (47.2)	17 (51.5)	35 (46.7)	73 (47.4)	3 (33.3)	10 (43.5)	98 (47.6)	1 (16.7)	10 (37)	98 (48.5)	0 (0)	5 (29.4)	103 (48.6)	1 (50)	7 (41.2)	101 (47.6)	21 (44.7)	48 (42.5)	60 (51.7)
Sore throat	5 (2.2)	2 (6.1)	4 (5.3)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	5 (2.4)	0 (0)	0 (0)	5 (2.5)	0 (0)	0 (0)	5 (2.4)	0 (0)	0 (0)	5 (2.4)	2 (4.3)	4 (3.5)	1 (0.9)

p<0.05 significant by Chi-square or Fisher's exact test

ct >35 was negative

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316444.t002>

Table 3. Frequency of respiratory viruses in children with and without pneumococcal carriage, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.

	Respiratory virus detection	Pneumococcal carriage		p-value
		Yes (n = 146)	No (n = 83)	
hRV	Alone (n = 51)	38 (26%)	13 (15.7%)	0.100
	Total ¹ (n = 75)	57 (39%)	18 (21.7%)	0.011
ADV	Alone (n = 9)	6 (4.1%)	3 (3.6%)	1.000
	Total ¹ (n = 23)	18 (12.3%)	5 (6%)	0.195
hBOV	Alone (n = 13)	4 (2.7%)	9 (10.8%)	0.016
	Total ¹ (n = 27)	16 (11%)	11 (13.3%)	0.761
RSV	Alone (n = 8)	7 (4.8%)	1 (1.2%)	0.264
	Total ¹ (n = 17)	14 (9.6%)	3 (3.6%)	0.163
MPV	Alone (n = 2)	1 (0.7%)	1 (1.2%)	1.000
	Total ¹ (n = 17)	13 (8.9%)	4 (4.8%)	0.384
Any respiratory virus (n = 113)		80 (54.8%)	33 (39.7%)	0.040

The chi-square or Fisher's exact test

p < 0.05 significant

¹ Total = alone + co-detection with another respiratory virus (S3 Table).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316444.t003>

Seasonality could not be reliably determined because of the lack of homogeneity in the sample collection across seasons, as detailed in S5 Table. Samples were collected based on the availability of volunteers, with fewer collections occurring during summer, likely because of school vacations.

Table 4. Incidence of medical appointments, clinical symptoms and diagnosis in 14 days of medical record analysis according to identified microorganism, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.

	Total	Only Pneumococcal carriage	Only Respiratory viruses detection	Co-occurrence ¹	No agents identified
n, (%)	224	65 (29%)	31 (13.8%)	80 (35.7%)	48 (21.4%)
Medical appointments	43	11 (16.9%)	8 (25.8%)	14 (17.5%)	10 (20.8%)
Any documented clinical symptoms within 14 days, n (%)	41 (18.3%)	11 (16.9%)	7 (22.6%)	14 (17.5%)	9 (18.8%)
Cough	24 (10.71%)	7 (10.8%)	5 (16.1%)	6 (7.5%)	6 (12.5%)
Nasal congestion/ coryza	18 (8.04%)	7 (10.8%)	2 (6.5%)	4 (5%)	5 (10.4%)
Fever	13 (5.8%)	5 (7.7%)	2 (6.5%)	2 (2.5%)	4 (8.3%)
Sore throat	8 (3.6%)	4 (6.2%)	0 (0)	4 (5%)	0
Any diagnosis within 14 days, n (%)	43 (19.2%)	11 (16.9%)	8 (25.8%)	14 (17.5%)	10 (20.8%)
Pneumonia	-	-	-	-	-
Tonsillopharyngitis	8 (3.6%)	6 (9.2%)	1 (3.2%)	1 (1.3%)	-
Sinusitis	6 (2.7%)	1 (1.5%)	2 (3.2%)	2 (2.5%)	2 (4.2%)
AOM ²	2 (0.9%)	2 (1.5%)	0	1 (1.3%)	-
ARI	23 (10.3%)	4 (6.2%)	4 (12.9%)	8 (10%)	7 (14.6%)
Asthma	-	-	-	-	-
Gastroenteritis	8 (3.6%)	1 (1.5%)	2 (6.5%)	3 (3.8%)	2 (4.2%)

Not statistically significant by the chi-square or Fisher's exact test.

¹Co-occurrence = Pneumococcal carriage and respiratory virus detection

²AOM = acute otitis media

³No symptoms were reported at two medical appointments

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316444.t004>

Discussion

This study represents an initial investigation in Latin America to explore the relationship between respiratory viruses and pneumococcal infections in healthy children. We found a significant relationship between respiratory viruses, particularly rhinoviruses and pneumococci in children aged 18–59 months in Southern Brazil. However, no association was found with disease development 14 days after exposure to these agents. The prevalence of respiratory viruses was higher in younger children, a finding consistent with previous literature reporting a high viral prevalence in children younger than our study population (< 1 year) [38, 39]. Although our study did not include children under one year of age, we observed a similar relationship between younger age and respiratory viruses in children aged 18–59 months.

Children who were “too sick” were excluded from this study. The recruitment process allowed for the inclusion of children with mild respiratory symptoms as reported by their guardians. Consequently, 108 (47.2%) and 79 (34.5%) children exhibited coryza/congestion and coughing, respectively. Despite the frequency of these symptoms in our study, they were not associated with the detection of the viruses studied. According to the literature, these symptoms are commonly associated with respiratory viruses. Notably, lower Ct levels are often associated with more severe respiratory symptoms and mortality [40]. However, in our study, high Ct levels were observed, which is consistent with the clinical condition of the study group (considered healthy) and the lack of association with symptoms.

An association between hRV and sore throat was identified independent of Ct values, and some studies have demonstrated an association between hRV and sore throat [41, 42]. For instance, in a study conducted on individuals experiencing sore throats, hRV was the most commonly detected pathogen [43]. Moreover, an experimental study involving intranasal inoculation of hRV observed scratchy/sore throat symptoms appearing 10–12 h after the induced inoculation [44]. Notably, these symptom observations were not derived from a medical examination; however, some subjectivity was involved. In the present study, INF and hPIV were not detected. The prevalence of these viruses is typically low (<3%) among asymptomatic children [15, 16] because they interact with their hosts and produce symptoms [45, 46].

No relationship was observed between a specific virus and pneumococcal colonization. However, the detection of more than one virus, especially hRV, is associated with pneumococcal carriage. These findings are consistent with those of Demuri (2018) [15] and Howard (2019) [16], who also reported a relationship between the presence of respiratory viruses and pneumococcal colonization in samples with more than one respiratory virus. In both cited studies, hRV was the most frequent virus involved in the co-occurrence of pneumococcal carriage and significantly influenced the increase in pneumococcal density [15, 16]. There is considerable diversity among studies regarding the age ranges of healthy children. For instance, one study focused on children under three years old [15], while another included children aged four to seven years [16]. Additionally, a study conducted in the Democratic Republic of Congo in children aged 2–60 months reported pneumococcus and viral co-occurrences in 30% of the study population. However, this study did not analyze the co-occurrence of pneumococci and each virus individually [47]. Furthermore, some studies have reported an association between pneumococcus and hRV infection in healthy children. A study conducted in western Australia demonstrated a positive correlation between hRV and pneumococcal carriage in children older than one year [48].

Currently, there is no evidence suggesting an antagonistic relationship between hBOV and pneumococcal carriage. Co-infection with hBOV and pneumococcus has been reported [49–51]. A Brazilian study investigating hBOV-related community-acquired pneumonia in children caused found that pneumococcus was the main bacteria in co-infection cases, with

pneumococcus detected in 33% (7/21) of co-infections [52]. Similarly, a Japanese study observed a positive correlation between the co-detection of pneumococcus and hBOV, where 85.7% (12/14) of children tested positive exclusively for both pathogens in otitis media fluid. However, this correlation was not observed in the nasopharynx, as the proportion of pneumococcus was similar between groups of individuals positive and negative for hBOV and other pathogenic bacteria. Notably, pneumococci were the only pathogens present in all but one of the co-detections in hBOV-positive cases, whereas in the nasopharynx, it was mixed with other pathogenic bacteria [53]. This suggests that these pathogens migrated to their target site (otitis media fluid), with the nasopharynx not being the site where the etiological agent was identified. It is essential to highlight that in children without serious diseases, these microorganisms may play an antagonistic role in the colonization of the nasopharynx, potentially suggesting the protection of pneumococcus in the presence of hBOV alone. However, interpretation of the results of both studies was limited by the small number of patients included. Nevertheless, these studies collectively underscore the relevance of pneumococcus and respiratory virus coinfection in disease pathogenesis. Our findings, such as the absence of INF and hPIV in the sampled population, likely reflect the predominance of these viruses in children with more severe symptoms. INF, in particular, is well known for its association with co-infection and increased risk of subsequent severe pneumococcal disease [54, 55]. Further studies are needed to elucidate the mechanisms underlying the interactions between hBOV and pneumococci.

We examined the clinical outcomes of the population 14 days after specimen collection to gain a deeper insight into the relationships between these microorganisms. We focused on medical consultations, but exclusively recorded the symptoms and diagnoses of interest. The importance of viral infections in predisposing individuals to subsequent bacterial infections is well-established. Among healthy children, studies have demonstrated that the presence of respiratory viruses and pneumococci at high densities is a risk factor for subsequent infections [15, 16, 21]. However, our results suggest harmonious coexistence between viruses and pneumococci. Notably, this population had high vaccination coverage for the prevention of pneumococcal diseases. Therefore, the protection conferred by the vaccine may have prevented the development of disease, regardless of the presence of viral agents. In populations with insufficient vaccination coverage, the relationship with the presence of viruses may differ and warrants further investigation.

These observations suggest that pneumococcal carriage is affected by various factors that are poorly understood, with the participation of viruses likely to play a prominent role. Studies investigating the relationship between respiratory viruses and pneumococcal colonization should be approached with caution. There is considerable diversity across studies, including variations in the age of the children studied, specimen collection methods, microbiological and molecular techniques used for pneumococcal detection, viruses studied, and the definition of outcomes (presence or density of pneumococci). Although this diversity may hinder direct comparisons among study results, it underscores the need for additional research that can offer new perspectives on this issue.

This study had unique characteristics and limitations that merit consideration. This is one of the pioneering investigations analyzing the co-occurrence of pneumococcus and various respiratory viruses among children aged 18–59 months, a population that is predominantly vaccinated against pneumococcal diseases. A limitation of our study, similar to other studies, is the use of PCR to detect respiratory viruses in healthy children. Interpretation of the results can be challenging, as detection may indicate prolonged shedding of the virus resulting from a previous episode [16, 56]. Furthermore, although comprehensive, our viral panel did not

include other agents that could potentially contribute to pneumococcal colonization, such as seasonal coronaviruses.

In summary, our findings revealed a positive relationship between pneumococcal carriage and multiple respiratory viruses, particularly rhinoviruses, in a population with high vaccination coverage. However, despite this association, there was no increased risk of subsequent development of respiratory disease during the 14-day follow-up period. This field of investigation remains open to further studies that may offer insights into this complex issue.

Supporting information

S1 Table. Primers and probes used in qPCR assays.

(PDF)

S2 Table. Socio-demographic factors associated with only pneumococcal carriage, only respiratory viruses detection, co-occurrence in 229 children, Veranópolis, Brazil, 2018–2019.

(PDF)

S3 Table. Frequency of respiratory viruses in children with and without pneumococcal carriage, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.

(PDF)

S4 Table. Frequency of clinical symptoms and diagnosis in medical care within 14 days according to different respiratory viruses, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.

(PDF)

S5 Table. Detection of different respiratory viruses according to seasons, Veranópolis/RS, Brazil, between 2018 and 2019.

(PDF)

Acknowledgments

We extend our sincere appreciation to all the staff at the Instituto Moriguchi for their cooperation and collaboration. We also thank the Veranópolis Health Department and Hospital São Peregrino Lazziozi for their assistance in collecting information from medical records. Special thanks go to the staff at the Federal University of Health Science of Porto Alegre, particularly Cristiane Bündchen, for providing statistical assistance. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing. We are grateful to all the children who participated in the study as well as to the nurses, pediatricians, and community health workers at the Public and Private Health Systems of Veranópolis.

Author Contributions

Conceptualization: Kauana Pizzutti, Juliana Comerlato, Neide Maria Bruscato, Roberta Rigo Dalla Corte, Emilio Hideyuki Moriguchi, Vlademir Vicente Cantarelli.

Data curation: Kauana Pizzutti, Amanda Robaina, Pedro Uriel Pedrotti Vieira, Tiago Fetzner, Gabriela Rosa da Cunha, Muriel Primon de Barros, Jaqueline Verardo, João Carlos Batista Santana, Cícero Armídio Gomes Dias.

Formal analysis: Kauana Pizzutti, Mariana Preussler Mott, João Carlos Batista Santana, Emilio Hideyuki Moriguchi, Cícero Armídio Gomes Dias.

Investigation: Kauana Pizzutti, Daniele Vargas de Oliveira, Amanda Robaina, Mariana Preussler Mott, Tiago Fetzner, Gabriela Rosa da Cunha, Muriel Primon de Barros, Neide Maria Bruscato, Cícero Armídio Gomes Dias.

Methodology: Kauana Pizzutti, Juliana Comerlato, Daniele Vargas de Oliveira, Amanda Robaina, Mariana Preussler Mott, Pedro Uriel Pedrotti Vieira, Tiago Fetzner, Gabriela Rosa da Cunha, Muriel Primon de Barros, Jaqueline Verardo, Neide Maria Bruscato, Vlademir Vicente Cantarelli.

Project administration: Juliana Comerlato, Neide Maria Bruscato, Emilio Hideyuki Moriguchi, Vlademir Vicente Cantarelli, Cícero Armídio Gomes Dias.

Resources: João Carlos Batista Santana, Roberta Rigo Dalla Corte, Emilio Hideyuki Moriguchi, Vlademir Vicente Cantarelli, Cícero Armídio Gomes Dias.

Software: Jaqueline Verardo.

Supervision: Juliana Comerlato, Daniele Vargas de Oliveira, Mariana Preussler Mott, Neide Maria Bruscato, João Carlos Batista Santana, Roberta Rigo Dalla Corte, Emilio Hideyuki Moriguchi, Vlademir Vicente Cantarelli, Cícero Armídio Gomes Dias.

Validation: Kauana Pizzutti, Juliana Comerlato, Daniele Vargas de Oliveira, Amanda Robaina, Mariana Preussler Mott, Pedro Uriel Pedrotti Vieira, Jaqueline Verardo, Neide Maria Bruscato, Vlademir Vicente Cantarelli.

Visualization: Kauana Pizzutti, Juliana Comerlato, Amanda Robaina, Mariana Preussler Mott, Pedro Uriel Pedrotti Vieira, Tiago Fetzner, Gabriela Rosa da Cunha, Muriel Primon de Barros, Jaqueline Verardo, Neide Maria Bruscato, João Carlos Batista Santana, Roberta Rigo Dalla Corte, Vlademir Vicente Cantarelli, Cícero Armídio Gomes Dias.

Writing – original draft: Kauana Pizzutti, Cícero Armídio Gomes Dias.

Writing – review & editing: Juliana Comerlato, João Carlos Batista Santana.

References

- Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *J Infect Dis.* 2007; 196: 1346–1354. <https://doi.org/10.1086/521626> PMID: 17922399
- Plishwili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 2010; 201: 32–41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jip485> PMID: 19947881
- Scotta MC, Veras TN, Klein PC, Tronco V, Polack FP, Mattiello R, et al. Impact of 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHD-CV) on childhood pneumonia hospitalizations in Brazil two years after introduction. *Vaccine.* 2014; 32: 4495–4499. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.042> PMID: 24958703
- Berezin EN, Jarovsky D, Cardoso MRA, Mantese OC. Invasive pneumococcal disease among hospitalized children in Brazil before and after the introduction of a pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine.* 2020; 38: 1740–1745. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.038> PMID: 31874778
- Pan American Health Organization (PAHO). pneumococcus. [cited 10 Nov 2021]. Available: <https://www.paho.org/en/topics/pneumococcus>
- Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob Health.* 2018; 6: e744–e757.
- Andrade AL, Afonso ET, Minamisava R, Blerrenbach AL, Cristo EB, Moraes-Neto OL, et al. Direct and indirect impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction on pneumonia hospitalizations and economic burden in all age-groups in Brazil: A time-series analysis. *PLoS One.* 2017; 12: e0184204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184204> PMID: 28880953

8. DATASUS. Pneumococcal Vaccination. [Internet]. 2017 [cited 2024 April 20]. Available from: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?bd_pni/cpnibr.def
9. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis.* 1997; 175: 1440–1445. <https://doi.org/10.1086/516477> PMID: 9180184
10. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 144–154.
11. Levine OS, Farley M, Harrison LH, Lefkowitz L, McGoer A, Schwartz B. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children: a population-based case-control study in North America. *Pediatrics.* 1999; 103: E28. <https://doi.org/10.1542/peds.103.3.e28> PMID: 10049984
12. Dano ID, Ousmane S, Moumouni K, Lagare A, Issa I, Testa J. Risk factors associated with *Streptococcus pneumoniae* carriage in children under five years old with acute respiratory infection in Niger. *Pan Afr Med J.* 2019; 33: 238. <https://doi.org/10.11604/pamj.2019.33.239.15945> PMID: 31692896
13. Wolter N, Tempia S, Cohen C, Madhi SA, Venter M, Moyes J, et al. High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral co-infection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 2014; 210: 1649–1657. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu326> PMID: 24907383
14. Vissers M, Ahout IM, van den Kieboom CH, van der Gaast-de Jongh CE, Groh L, Cremers AJ, et al. High pneumococcal density correlates with more mucosal inflammation and reduced respiratory syncytial virus disease severity in infants. *BMC Infect Dis.* 2018; 18: 129. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1454-x> PMID: 28983753
15. DeMuri GP, Gem JE, Eickhoff JC, Lynch SV, Wald ER. Dynamics of Bacterial Colonization With *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* During Symptomatic and Asymptomatic Viral Upper Respiratory Tract Infection. *Clin Infect Dis.* 2018; 66: 1045–1053.
16. Howard LM, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Williams JV, Gil AI, et al. Nasopharyngeal Pneumococcal Density during Asymptomatic Respiratory Virus Infection and Risk for Subsequent Acute Respiratory Illness. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25: 2040–2047. <https://doi.org/10.3201/eid2511.190157> PMID: 31625844
17. Albrich WC, Madhi SA, Adrian PV, van Niekerk N, Mareletsi T, Cuffand C, et al. Use of a rapid test of pneumococcal colonization density to diagnose pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2012; 54: 601–609. <https://doi.org/10.1093/cid/cir859> PMID: 22156852
18. Brotans P, Bassal Q, Lanaspá M, Henares D, Perez-Arguello A, Madrid L, et al. Nasopharyngeal bacterial load as a marker for rapid and easy diagnosis of invasive pneumococcal disease in children from Mozambique. *PLoS One.* 2017; 12: e0184762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184762> PMID: 28910402
19. Baggett HC, Watson NL, Deloria Knoff M, Brooks WA, Feikin DR, Hammit LL, et al. Density of Upper Respiratory Colonization With *Streptococcus pneumoniae* and Its Role in the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia Among Children Aged <5 Years in the PERCH Study. *Clin Infect Dis.* 2017; 64: S317–S327.
20. Howard LM, Fan R, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Hartinger S, et al. Nasopharyngeal Pneumococcal Density is Associated With Viral Activity but Not With Use of Improved Stoves Among Young Andean Children. *Open Forum Infect Dis.* 2017; 4: ofx161. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx161> PMID: 28929126
21. Fan RR, Howard LM, Griffin MR, Edwards KM, Zhu Y, Williams JV, et al. Nasopharyngeal Pneumococcal Density and Evolution of Acute Respiratory Illnesses in Young Children, Peru, 2009–2011. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22: 1996–1999. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160902> PMID: 27767919
22. Brealey JC, Chappell KJ, Galbraith S, Fantino E, Gaydon J, Tozer S, et al. *Streptococcus pneumoniae* colonization of the nasopharynx is associated with increased severity during respiratory syncytial virus infection in young children. *Respirology.* 2018; 23: 220–227.
23. Brealey JC, Young PR, Sloots TP, Ware RS, Lambert SB, Sly PD, et al. Bacterial colonization dynamics associated with respiratory syncytial virus during early childhood. *Pediatr Pulmonol.* 2020; 55: 1237–1245. <https://doi.org/10.1002/ppul.24715> PMID: 32176838
24. Ampofo K, Bender J, Sheng X, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, et al. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: role of preceding respiratory viral infection. *Pediatrics.* 2008; 122: 229–237. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3192> PMID: 18676537
25. Jiang W, Wu M, Zhou J, Wang Y, Hao C, Ji W, et al. Etiologic spectrum and occurrence of co-infections in children hospitalized with community-acquired pneumonia. *BMC Infect Dis.* 2017; 17: 787. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2891-x> PMID: 29262797
26. Nolan VG, Arnold SR, Bramley AM, Ampofo K, Williams DJ, Grihalva CG, et al. Etiology and Impact of Co-infections in Children Hospitalized with Community-Acquired Pneumonia. *J Infect Dis.* 2018; 218: 179–188. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix641> PMID: 29228381

27. Choe YJ, Park S, Michelow IC. Co-seasonality and co-detection of respiratory viruses and bacteraemia in children: a retrospective analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2020; 26: 1690.e5–1690.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.006> PMID: 32919073
28. Hamant JM, Kimpen JL, Flier A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998; 26: 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01389.x> PMID: 10575129
29. Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, Takahashi H, Ida S, Sasaki T, et al. Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis.* 2003; 188: 1928–1939.
30. Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, Gruenert DC, Hershenson MB. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178: 1271–1281. <https://doi.org/10.1164/rccm.200801-136OC> PMID: 18787220
31. Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 194.
32. Milucky J, Carvalho MG, Roupheal N, Bennett NM, Talbot HK, Harrison LH, et al. *Streptococcus pneumoniae* colonization after introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for US adults 65 years of age and older, 2015–2016. *Vaccine.* 2019; 37(8): 1094–1100.
33. CDC. Specimen Collection Guidelines. [s.d.] [cited 12 Nov 2021]. Available: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/speccollectionguidelines.pdf>
34. Gunson RN, Maclean AR, Shepherd SJ, Carman WF. Simultaneous detection and quantitation of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and adenovirus by use of real-time PCR and pooled standards. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 765–770. <https://doi.org/10.1128/JCM.01721-08> PMID: 19144801
35. Zhang H, Wang Y, Porter E, Lu N, Li Y, Yuan F, et al. development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of influenza A, B, C, and D viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019; 95: 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.011> PMID: 31130238
36. CDC. Research Use Only CDC Flu SC2 Multiplex Assay Primers and Probes. 10 Sep 2021 [cited 12 Nov 2021]. Available: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/multiplex-primer-probes.html>
37. Brandileone M-C de C, Zanella RC, Almeida SCG, Cassiolato AP, Lemos APS de, Salgado MM, et al. Long-term effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children in Brazil. *Vaccine.* 2019; 37: 5357–5363.
38. Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, et al. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 2631–2636. <https://doi.org/10.1128/JCM.02094-10> PMID: 21543571
39. Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, Trujillo R, Maron T, Loeffelholz MJ, et al. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life: association with acute otitis media development. *Clin Infect Dis.* 2015; 60: 1–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu714> PMID: 25205769
40. Bouzid D, Jordi Vila J, Hansen G, Manissero D, Pareja J, Rao SN, et al. Systematic review on the association between respiratory virus real-time PCR cycle threshold values and clinical presentation or outcomes. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 23(76): 33–49.
41. Ambrosioni J, Bridevaux P-O, Aubert J-D, Soccia P, Wagner G, Kaiser L. Role of rhinovirus load in the upper respiratory tract and severity of symptoms in lung transplant recipients. *J Clin Virol.* 2015; 64: 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.12.021> PMID: 25728070
42. Kenealy T. Sore throat. *BMJ Clin Evid* [Internet]. 2014 Mar 4;2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589314> PMID: 24589314
43. Mielik S, Gokahmetoglu S, Bald E, Onuk FA. Sore throat in primary care project: a clinical score to diagnose viral sore throat. *Fam Pract.* 2015; 32(3): 263–8. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmv015> PMID: 25808403
44. Harris JM 2nd, Gwaltney JM Jr. Incubation periods of experimental rhinovirus infection and illness. *Clin Infect Dis.* 1996; 23(6): 1287–90. <https://doi.org/10.1093/cid/23.6.1287> PMID: 8953073
45. Human parainfluenza viruses (HPiVs) [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/parainfluenza/hcp/clinical.html>
46. CDC. Flu Symptoms & Diagnosis [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/index.html>
47. Muhandule Birindwa A, Gonzales-Siles L, Nordén R, Geravandi S, Tumusifu Manegabe J, Morisho L, et al. High bacterial and viral load in the upper respiratory tract of children in the Democratic Republic of the Congo. *PLoS One.* 2020; 15: e0240922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240922> PMID: 33119683

48. Jacoby P, Watson K, Bowman J, Taylor A, Riley TV, Smith DW, et al. Modelling the co-occurrence of *Streptococcus pneumoniae* with other bacterial and viral pathogens in the upper respiratory tract. *Vaccine*. 2007; 25: 2458–2464.
49. Mohammadi M. Acute respiratory infection in co-infection form of bacteria and virus, human Bocavirus with *Streptococcus pneumoniae*: A case report. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020; 7(3): e106476.
50. X, Zhen g J, Zhu L, Xu H. Human bocavirus-1 screening in infants with acute lower respiratory tract infection Zhang J. *Int. Med. Res.*, 2021; 49(8): 03000606211027739.
51. Mackenzie GA, McLellan J, Machuka E, Ndiaye M, Pathirana J, Fombah A, et al. Aetiology of lobar pneumonia determined by multiplex molecular analyses of lung and pleural aspirate specimens in the Gambia: findings from population-based pneumonia surveillance. *BMJ Open*, 2022; 12(3): e056706. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-056706> PMID: 35273059
52. Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MR, Meriluoto M, Kempainen K, Kantola K, Ruuskanen O, et al. Human bocavirus infection diagnosed serologically among children admitted to hospital with community-acquired pneumonia in a tropical region. *J. Med. Virol.* 2012; 84(2): 253–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.22268> PMID: 22170545
53. Beder LB, Hotomi M, Ogami M, Yamauchi K, Shimada J, Bilal DG, et al. Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media. *Eur J Pediatr*. 2009; 168: 1365–1372 <https://doi.org/10.1007/s00431-009-0939-7> PMID: 19221788
54. Pettigrew MM, Marks LR, Kong Y, Gent JF, Roche-Hakansson H, Hakansson AP. Dynamic changes in the *Streptococcus pneumoniae* transcriptome during transition from biofilm formation to invasive disease upon influenza A virus infection. *Infect Immun*. 2014; 82(11):4607–19.
55. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1)—United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009; 58(38):1071–4.
56. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol*. 2004; 72: 695–699. <https://doi.org/10.1002/jmv.20027> PMID: 14981776

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Investigamos a relação entre a presença de colonização por *Streptococcus pneumoniae* e vírus respiratórios em crianças saudáveis. Também realizamos uma coorte destas mesmas crianças e a possibilidade de ocorrência de desfechos infecciosos. Em relação aos objetivos desta tese, consideramos que:

- Foi encontrada associação positiva entre a colonização do pneumococo e a presença de vírus respiratórios na nasofaringe de crianças saudáveis com 18-59 meses de idade;
- Entre os vírus respiratórios pesquisados, o hRV foi o mais frequente e teve associação positiva com a colonização por pneumococo;
- Os vírus respiratórios e a codeteção (pneumococo + vírus) foram positivamente associados ao sexo masculino e a crianças mais jovens do estudo.
- Para as variáveis estudadas na análise de prontuários de 14 dias após a coleta das amostras, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de crianças colonizadas por pneumococo, presença de vírus respiratórios, codeteção ou sem microrganismo identificado e a ocorrência de consultas pediátricas, sintomas respiratórios e doenças respiratórias;
- Não conseguimos analisar a sazonalidade dos microrganismos testados. Devido a heterogeneidade das coletas de amostras, especialmente a baixa aderência de participantes durante o verão.

A relação entre o pneumococo e os vírus respiratórios é muito complexa. A presença destes microrganismos patogênicos na nasofaringe de crianças saudáveis, é um assunto ainda novo e necessita de pesquisas como a nossa para a melhor compreensão.

A colonização pneumocócica é um fator determinante para que a doença pneumocócica ocorra. No nosso estudo concluímos que a presença dos vírus

respiratórios, em especial hRV, influencia positivamente a colonização por pneumococo.

Muitos estudos demonstraram que os vírus respiratórios predisõem a doença pneumocócica e/ou a colonização por pneumococo possivelmente influencia o aparecimento de IRA viral. No nosso estudo não conseguimos identificar a relação entre a presença destes microrganismos na nasofaringe de crianças previamente híidas e o aparecimento de desfechos infecciosos.

A nasofaringe é um local de grande interação entre microrganismos patogênicos. Devido a isso, atualmente, algumas pesquisas têm investigado o grupo de crianças saudáveis para o melhor entendimento das doenças respiratórias. Porém são estudos muito diferentes entre si; idade das populações do estudo, metodologias de identificação destes microrganismos entre outros fatores que dificulta a comparação entre estudos. O nosso estudo tem grande importância nessa construção de informações, especialmente, nessa complexa relação entre microrganismos que ocorre na nasofaringe das crianças.

ANEXO A - Sorotipos pneumocócicos em amostras de codeteccção com diferentes vírus respiratórios

Tabela 1 A- Identificação dos sorotipos pneumocócicos na codeteccção com diferentes vírus respiratórios, crianças de 18-59 meses, Veranópolis/RS, Brasil, 2018-2019.

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	hRV (n=75)	ADV (n=23)	BOV (n=27)	RSV (n=17)	hMPV (n=17)
sorotipos					
003	1	0	0	0	0
013	1	1	0	1	1
034	1	0	0	0	0
037	0	0	0	0	0
06A	12	2	3	4	4
06B	1	0	0	0	0
06C	5	1	2	1	5
10A	2	1	0	0	0
11A	1	0	0	0	0
15A	4	2	1	0	0
15B	2	0	0	0	0
15C	1	0	1	0	0
16F	0	0	0	0	0
19A	12	4	4	2	1
22F	1	0	1	1	0
23A	9	5	3	3	2
23B	1	0	0	0	0
28A	0	0	0	1	0
35B	1	0	1	0	0
NT*	2	2	0	1	0

ANEXO B - Questionário CDC Adaptado

Nome da criança: _____
 ENDEREÇO: _____
 TELEFONE : () _____

ID DO ESTUDO

QUESTIONÁRIO CRIANÇAS 2.0

ANTERIOR AO CONTATO: Revisei se tenho foto da carteira de vacinação? () Sim () Não
VERIFIQUEI: SE TEVE ATENDIMENTO PS OU INTERNAÇÃO? () Sim () Não

IDENTIFICAÇÃO

1. Data da Coleta (DD-MM-AAAA): |__|__|_|-|__|__|_|-|__|__|_|_|_|

2. Iniciais do Entrevistador: _____

Informações colhidas com:

Nome: _____ Relação de
 parentesco: () mãe () pai () outros _____
 Endereço e telefone estão registrados? () sim () não

INFORMAÇÃO CLÍNICA

3. A criança tem ou teve no último ano algumas destas condições?

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Asma | <input type="checkbox"/> Doença no Fígado |
| <input type="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Fibrose Cística |
| <input type="checkbox"/> Doença nos Rins | <input type="checkbox"/> Anemia Falciforme |
| <input type="checkbox"/> Doença no Coração | <input type="checkbox"/> Câncer |

CASO ASMA:

Uso de :
 CORTICÓIDE () Sim () Não
 NEBULIZAÇÃO OU BOMBA () Sim () Não
 INTERNAÇÃO () Sim () Não

4. A criança fez algum tratamento com imunossupressores no último ano? Sim Não

4.a) **Se sim**, com qual medicamento?

Esteróides Quimioterapia Radioterapia

4.b) **Se sim**, qual finalidade, qual dose? _____

5. A criança tem ou teve alguns destas seguintes Infecções **Último ano**?

a) Infecção do trato respiratório superior

Sim Não Não sabe

Quantas vezes?

Se sim, qual infecção? _____

b) Otite Sim Não Não sabe _____

c) Sinusite Sim Não Não sabe _____

d) Pneumonia Sim Não Não sabe _____

6.a) Se sim para qualquer uma das opções, Autoriza a fazer busca de informações de saúde em prontuário de seu filho(a) no consultório médico onde foi atendido, posto de saúde ou hospital?

- Sim Não

Se sim, qual o médico que atendeu a criança? Podemos entrar em contato para maiores informações? _____

7. a) criança esteve internada no hospital no último ano? Sim Não Não sabe

7.a) Se sim, quantas vezes esteve internada no último ano?

- 1 vez 2 vezes >3 vezes

7. b) Se já esteve internada, indicar a(s) causa(s) do último internamento:

- | | |
|---|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Infecção Respiratória Aguda ou Pneumonia | <input type="checkbox"/> Otite |
| <input type="checkbox"/> Bacteremia/Sepse | <input type="checkbox"/> Meningite |
| <input type="checkbox"/> Diarreia | <input type="checkbox"/> Pneumonia |
| <input type="checkbox"/> Outra causa (especifique): _____ | |

7.c) Se já esteve internada, por quantos dias E ONDE ? _____

7.d) Se esteve internada, utilizou:

- | | |
|----------------------|---|
| Oxigênio suplementar | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe |
| Ventilação Mecânica | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe |

8. A criança fez tratamento com antibiótico no último ano? Sim Não

8.a) Se sim, qual(is) antibiótico(s)?

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Amoxicilina | <input type="checkbox"/> Eritromicina/Sulfa |
| <input type="checkbox"/> Amoxicilina/Ác. Clavulânico | <input type="checkbox"/> Fosfomicina |
| <input type="checkbox"/> Ampicilina/ Sulbactam | <input type="checkbox"/> Levofloxacin |
| <input type="checkbox"/> Azitromicina | <input type="checkbox"/> Metronidazol |
| <input type="checkbox"/> Cefaclor | <input type="checkbox"/> Meropenem |
| <input type="checkbox"/> Cefadroxil | <input type="checkbox"/> Norfloxacin |
| <input type="checkbox"/> Cefuroxima | <input type="checkbox"/> Ofloxacin |
| <input type="checkbox"/> Cefalexina | <input type="checkbox"/> Penicilina |
| <input type="checkbox"/> Ciprofloxacina | <input type="checkbox"/> Tetraciclina |
| <input type="checkbox"/> Claritromicina | <input type="checkbox"/> Trimetropim/ Sulfa |
| <input type="checkbox"/> Clindamicina | <input type="checkbox"/> Vancomicina |
| <input type="checkbox"/> Doxiciclina | <input type="checkbox"/> Não sabe/Não tem certeza |
| <input type="checkbox"/> Eritromicina | <input type="checkbox"/> Outros antibióticos: _____ |

INFORMAÇÃO SOBRE O ESTADO DE VACINAÇÃO

9. Nos autoriza a buscar informação de vacinação no Posto de Saúde ou Clínica que seu filho é vacinado?

- Sim Não

10. A criança recebeu a vacina anti-pneumocócica (PCV-10) no último ano? Sim Não
- 10.a) **Se sim**, quantas doses já recebeu? 1 dose 2 doses 3 doses 4 doses
- 10.b) Data da primeira dose da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
- 10.c) Data da segunda dose da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
- 10.d) Data da terceira dose da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
- 10.e) Data do reforço da PCV-10 (DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
11. A criança recebeu a vacina PCV-13 no último ano? Sim Não
- 11.a) **Se sim**, quantas doses da PCV-13 já recebeu: 1 dose 2 doses 3 doses 4 doses
- 11.b) Data da primeira dose de PCV-13 (DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
- 11.c) Data da segunda dose de PCV-13(DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
- 11.d) Data da terceira dose de PCV-13 (DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
- 11.e) Data do reforço da PCV-13(DD-MM-AAAA): |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|
12. Solicitar que pais enviem a carteira de vacina da criança pelo WhatsApp? Sim Não
13. Recebi foto da carteira de vacinação? Sim Não Obs.-_____

FATORES SÓCIO - ECONÔMICOS E DE EXPOSIÇÃO NO ÚLTIMO ANO

14. A criança vai à escolinha ou creche? Sim Não
- Se sim:
Nome da Escola-_____
- Data de início nesta escola - ____/____/____
15. Quantas pessoas vivem na casa (total de agregado familiar, **incluindo a criança**)? _____
16. Quantas crianças menores de 5 anos, vivem na mesma casa (**incluindo esta criança**)? _____
- 15.a) **As demais** crianças frequentam escola ou creche? Sim Não
17. Teve irmão(ã) no último ano? Sim Não
18. A criança dorme sozinha? Sim Não
- 17.a) **Se não**, dorme com:
- Pai Mãe Irmão(s) Tio/Tia Vô/Vó Outros:_____
19. Algum familiar da criança fuma? Sim Não
- 18.a) **Se sim**, qual é relação do fumante com a criança que está participando do estudo:
- Pai Mãe Irmão Tio/Tia Vô/Vó Outros:_____
20. Utilizam fogão a lenha, lareira ou qualquer tipo de combustão de lenha ou carvão em casa?
- Sim Não
- Se sim, com que frequência? _____

ANEXO C – Coleta de informações de prontuários

Data / Local:	Sintomas	Diagnóstico	Antibiótico	Obs.
___/___/___ () PS sem intern. () UBS () Consultório	() Febre () Tosse () Coriza () Náusea () Vômito () Dispneia () Irritabilidade () Apatia / fadiga () Expectoração () Sonolência () Dor de garganta, ouvido ou cefaleia () Gotejamento pós nasal () Hiperemia mem. timp. ou secreção () Outros_____			
___/___/___ () PS sem intern. () UBS () Consultório	() Febre () Tosse () Coriza () Náusea () Vômito () Dispneia () Irritabilidade () Apatia / fadiga () Expectoração () Sonolência () Dor de garganta, ouvido ou cefaleia () Gotejamento pós nasal () Hiperemia mem. timp. ou secreção () Outros_____			
___/___/___ () PS sem intern. () UBS () Consultório	() Febre () Tosse () Coriza () Náusea () Vômito () Dispneia () Irritabilidade () Apatia / fadiga () Expectoração () Sonolência () Dor de garganta, ouvido ou cefaleia () Gotejamento pós nasal () Hiperemia mem. timp. ou secreção () Outros_____			
___/___/___ () PS sem intern. () UBS () Consultório	() Febre () Tosse () Coriza () Náusea () Vômito () Dispneia () Irritabilidade () Apatia / fadiga () Expectoração () Sonolência () Dor de garganta, ouvido ou cefaleia () Gotejamento pós nasal () Hiperemia mem. timp. ou secreção () Outros_____			
___/___/___ () PS sem intern. () UBS () Consultório	() Febre () Tosse () Coriza () Náusea () Vômito () Dispneia () Irritabilidade () Apatia / fadiga () Expectoração () Sonolência () Dor de garganta, ouvido ou cefaleia () Gotejamento pós nasal () Hiperemia mem. timp. ou secreção () Outros_____			

ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)****RESPONSÁVEIS LEGAIS**

Nº do CAAE 66184117500005327

Título do Projeto: **Portadores de *Streptococcus pneumoniae* entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente**

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o número de adultos e crianças que carregam na garganta e nariz (nasofaringe/orofaringe) a bactéria *Streptococcus pneumoniae*. Mas as crianças que vão participar desta pesquisa apenas irão coletar material do nariz. Esta pesquisa está sendo realizada pela Unidade de Geriatria do Serviço de Medicina Interna e Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa de seu dependente legal, os procedimentos envolvidos são os seguintes: Primeiramente haverá o questionamento sobre algumas informações relacionadas a características do paciente (ex: sexo, idade, data de nascimento), informações clínicas (tosse, febre, internação, uso de antibiótico), sobre o estado de vacinação (verificação da carteira de vacinação) e sobre fatores socioeconômicos (nível de escolaridade do responsável pela criança, características da casa, quantas pessoas vivem na mesma casa, frequência em escolinha). E em seguida será coletado apenas um swab do material do nariz, assim um cotonete será inserido no nariz da criança. No decorrer do ano seguinte, entraremos em contato e aplicaremos um novo questionário com cerca de 15 minutos duração, para atualização dos dados clínicos, estado de vacinação e fatores socioeconômicos.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: a coleta pode durar aproximadamente 5 segundos e causa na maioria dos indivíduos tosse ou espirro, devido à coleta do material do nariz. Mas também pode ocorrer sangramento que cessa em poucos minutos. Se ocorrer sangramento, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrem durante a coleta eles são passageiros, mas mesmo assim haverá suporte enquanto os sintomas persistirem. Todas as coletas serão realizadas por membro treinado da equipe do estudo. A coleta será realizada para minimizar os riscos e desconforto.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são apenas indiretos, ou seja, não haverá qualquer benefício pessoal direto por fazer parte da pesquisa. No entanto, os resultados deste estudo podem levar à melhoria no cuidado da população como um todo. Os resultados não serão usados para qualquer decisão de tratamento ou manejo do participante, pois

esta pesquisa tem como objetivo apenas avaliar a epidemiologia da bactéria (*Streptococcus pneumoniae*) que está circulando em nossa região, para verificar se a vacina que é disponibilizada atualmente contra esta bactéria está sendo efetiva.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá ser ressarcido por despesas decorrentes de sua participação (ex.: despesas de transporte), ou devido a indenização diante de eventuais danos que possam ocorrer, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados. Os materiais biológicos ficarão guardados até o encerramento desta pesquisa em freezer -80°C , após serão autoclavados para que seja destruído qualquer material bacteriano ou humano, não havendo nenhuma possibilidade de reconhecer os participantes da pesquisa.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Emílio Moriguchi, pelo telefone (51) 3085-8032, ou com os pesquisadores Cícero Dias ou Mariana Mott, pelo telefone (51) 3303-8742, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h. Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o
Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO E - Parecer Comitê De Ética – CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Portadores de Streptococcus pneumoniae entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente

Pesquisador: EMILIO MORIGUCHI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66184117.5.3001.5345

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.176.785

Apresentação do Projeto:

O projeto submetido é uma versão corrigida do projeto apresentado ao CEP da instituição proponente. Conforme verificou-se na carta-resposta, os ajustes solicitados por aquele CEP foram atendidos. No entanto, não se considera necessário que o projeto seja submetido também ao CEP da UFCSPA, instituição co-participante.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos são coerentes ao que o projeto se propõe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios descritos no projeto e nos termos de apresentação obrigatória estão adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Chama a atenção que o projeto submetido à apreciação deste CEP já foi apresentado à instituição proponente, UFRGS, e inclui resposta ao parecer emitido pelo CEP dessa instituição. Não há necessidade de o projeto passar por dois CEPs; a aprovação do CEP de apenas uma instituição é suficiente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A redação de ambos os TCLs foi ajustada conforme solicitado anteriormente. Contudo, uma

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.176.785

revisão textual deve ser feita para evitar eventuais ambiguidades. Por exemplo: O TCLE dirigido aos responsáveis deve ter a redação revisada em "A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o número de adultos e crianças que carregam na garganta e/ou no nariz (nasofaringe/orofaringe) a bactéria *Streptococcus pneumoniae*. Mas as crianças que vão participar desta pesquisa apenas irão coletar material do nariz." (Nesse caso, pode-se dizer de maneira mais objetiva, e em uma sentença, que só se coletará o material do nariz da criança.) Outro caso de necessidade de revisão ocorre em "Se ocorrer sangramento, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrem durante a coleta eles são passageiros, mas mesmo assim haverá suporte enquanto os sintomas persistirem." (excluir "MAS SE" no início da segunda frase).

Recomendações:

- Recomenda-se que o projeto seja submetido apenas ao CEP (através de emenda) cujo pesquisador responsável faz parte.
- Ajustar a redação dos TCLEs para evitar ambiguidades.
- Incluir nas informações básicas do projeto o nome do orientador da aluna. O atual pesquisador responsável não faz parte da instituição da qual a aluna está vinculada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como a nova versão do projeto submetido ao CEP da UFRGS atende às solicitações feitas, e verificando-se que não há mais novas alterações a serem realizadas, não há pendências que comprometam o prosseguimento do projeto. No entanto, recomenda-se que os ajustes nos TCLEs, de cunho textual, sejam feitos.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853064.pdf	18/05/2017 12:06:58		Aceito
Outros	CRONOGRAMA_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 12:05:40	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	ORCAMENTO_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 11:59:26	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_responsavel.pdf	18/05/2017 11:57:51	Mariana Preussler Mott	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.176.785

Outros	TERMO_RELATORIO_PARCIAL_E_FIN AL.pdf	18/05/2017 11:57:12	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FLUXOGRAMA_DAS_COLETAS_E_PR OCEDIMENTO_DOS_SWABS.pdf	18/05/2017 11:54:11	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_lista_de_pendencias.pdf	18/05/2017 11:52:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	DOCUMENTO_COLABORACAO_ESTR ANGEIRA.pdf	18/05/2017 11:50:39	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsaveis_Legais.pdf	18/05/2017 11:49:53	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_criancas.pdf	18/05/2017 11:49:31	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_adultos.pdf	18/05/2017 11:46:34	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_triagem_adultos.pdf	18/05/2017 11:45:49	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adultos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_PROJETO.pdf	18/05/2017 11:36:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_853064.pdf	23/03/2017 21:09:08		Aceito
Outros	QUESTIONARIO_CRIANCAS.pdf	23/03/2017 21:07:07	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_ADULTOS.pdf	23/03/2017 21:06:32	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_TRIAGEM_ADULTOS .pdf	23/03/2017 21:06:07	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RESPONSAVEIS_LEGAI S_CRIANCAS.pdf	23/03/2017 21:05:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ADULTOS.pdf	23/03/2017 21:05:23	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_MATERIAL_BIO LOGICO.pdf	23/03/2017 21:05:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	23/03/2017 21:04:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FORMULARIO_DELEGACAO_FUNCO ES.pdf	23/03/2017 21:04:09	Mariana Preussler Mott	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.176.785

Orçamento	ORCAMENTO.pdf	23/03/2017 21:03:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	23/03/2017 21:02:16	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	23/03/2017 21:01:58	Mariana Preussler Mott	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_853064.pdf	25/01/2017 17:32:35		Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	12/01/2017 11:10:06	EMILIO MORIGUCHI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Julho de 2017

Assinado por:

**Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)**

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Portadores de *Streptococcus pneumoniae* entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente

Pesquisador: EMILIO MORIGUCHI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66184117.5.3001.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.374.087

Apresentação do Projeto:

Trata-se de carta resposta ao parecer 3.118.341.

Objetivo da Pesquisa:

Definir a prevalência de portadores de *Streptococcus pneumoniae* e distribuição de sorotipos em crianças entre 18 e 59 meses de idade e adultos com idade 65 anos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A coleta do material pode causar espirros ou tosse, bem como sangramento nasal. Há riscos mínimos de desconforto, por parte do responsável, em responder as perguntas. Não há benefícios diretos ao participante, mas a pesquisa pode trazer novos conhecimentos a esse campo de estudos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foi acrescentado o tempo de duração de aplicação do questionário, e ajustes foram feitos no novo TCLE, conforme solicitado. Os pesquisadores afirmam que a assinatura de um TCLE implicaria gastos de deslocamento. Isso poderia ser resolvido pelo envio do documento por e-mail/correio e reenvio também via e-mail. Como alternativa, os pesquisadores sugerem que seja feita leitura de duas questões que envolvem aceite em responder ao questionário e a autorização de uso de dados. No tópico "recomendações", fazemos mais algumas sugestões para serem acrescentadas ao corpo do questionário.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 3.374.057

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores acrescentaram o tempo de duração do questionário a ser aplicado por telefone e fizeram os ajustes solicitados para o novo TCLE aplicado. Por se tratar de um questionário a ser realizado por telefone, os pesquisadores acrescentaram as perguntas 3 (Aceita realizar o questionário a seguir? Sim Não) e 3.a (Autoriza a utilização destes dados para complementação da pesquisa que já está em andamento? Sim Não). É relevante que o participante seja lembrado do objetivo da pesquisa e que saiba que pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Cabe colocar essas afirmações no início do questionário também. Sugere-se, ainda, que o questionário seja encaminhado por e-mail do participante, bem como uma via do TCLE.

Recomendações:

Por se tratar de uma nova etapa da pesquisa, e pelo fato de a primeira parte da pesquisa ter feito há bastante tempo, é relevante que o participante tenha ciência dos aspectos éticos que envolvem essa pesquisa. Seria de bom tom lembrar os objetivos da pesquisa e explicar a ele ou a ela que pode desistir de participar a qualquer momento, sem que haja prejuízos, além de explicitar ali os riscos e benefícios envolvidos. Sugere-se, ainda, que o questionário seja encaminhado por e-mail do participante, caso ele desejar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores afirmam que serão acrescentadas duas perguntas no início do questionário, referentes ao aceite em participar da pesquisa e à autorização de uso dos dados. Caberia redigir um texto em que se reproduz elementos do TCLE, como o objetivo da pesquisa e a possibilidade de esse participante poder desistir da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízos para si. Ainda, os pesquisadores podem se comprometer em encaminhar cópia desse questionário ao participante ao e-mail.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1272488.pdf	12/04/2019 18:21:33		Aceito
TCLE / Termos de	TCLECRIANÇAS.pdf	12/04/2019	EMILIO MORIGUCHI	Aceito

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Processo: 3.374.007

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECRIANCAS.pdf	18:19:32	EMILIO MORIGUCHI	Acelto
Outros	QUESTIONARIOCRIANCAS.pdf	12/04/2019 18:18:50	EMILIO MORIGUCHI	Acelto
Outros	CartaaoCEPcoparticipanteGPPG.pdf	12/04/2019 18:03:02	EMILIO MORIGUCHI	Acelto
Outros	Questionario_2_Criancas.pdf	05/12/2018 15:30:29	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	Roteiro_questionario.pdf	05/12/2018 15:28:20	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	Formulario_delegacao_funcao.pdf	05/12/2018 15:15:14	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	Carta_emenda.pdf	05/12/2018 14:55:42	Mariana Preussler Mott	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_amostras_coletadas.pdf	05/12/2018 14:54:55	Mariana Preussler Mott	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsaveis_legais_.pdf	05/12/2018 14:54:08	Mariana Preussler Mott	Acelto
Brochura Pesquisa	Brochura_PROJETO_.pdf	05/12/2018 14:53:37	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	CRONOGRAMA_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 12:05:40	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	ORCAMENTO_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 11:59:26	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	termo_de_anuencia_responsavel.pdf	18/05/2017 11:57:51	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	TERMO_RELATORIO_PARCIAL_E_FINAL.pdf	18/05/2017 11:57:12	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	FLUXOGRAMA_DAS_COLETAS_E_PROCEDIMENTO_DOS_SWABS.pdf	18/05/2017 11:54:11	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	Carta_ao_CEP_lista_de_pendencias.pdf	18/05/2017 11:52:08	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	DOCUMENTO_COLABORACAO ESTRANGEIRA.pdf	18/05/2017 11:50:39	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	Questionario_criancas.pdf	18/05/2017 11:49:31	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	Questionario_adultos.pdf	18/05/2017 11:46:34	Mariana Preussler Mott	Acelto
Outros	Questionario_triagem_adultos.pdf	18/05/2017 11:45:49	Mariana Preussler Mott	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_Adultos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Acelto

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 3.374.007

Justificativa de Ausência	TCLE_Aditos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_PROJETO.pdf	18/05/2017 11:36:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	23/03/2017 21:05:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	23/03/2017 21:04:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FORMULARIO_DELEGACAO_FUNCIONES.pdf	23/03/2017 21:04:09	Mariana Preussler Mott	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 06 de Junho de 2019

Assinado por:
Luciana Dalcanale Moussalle
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Portadores de *Streptococcus pneumoniae* entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente

Pesquisador: EMILIO MORIGUCHI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66184117.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.106.235

Apresentação do Projeto:

As infecções por *Streptococcus pneumoniae* são um problema de saúde pública em todo o mundo, acometendo principalmente os extremos das idades, como crianças e idosos. Com o intuito de controlar a doença pneumocócica várias formulações da vacina contra o pneumococo foram desenvolvidas. O Brasil, em 2010, introduziu a vacina pneumocócica conjugada 10 valente (PCV-10) em seu calendário de vacinação, sendo disponibilizada para crianças menores de 2 anos de idade. Essa vacina tem se demonstrado efetiva na prevenção de doenças invasivas causadas pelos sorotipos vacinais entre as crianças. No entanto, um estudo conduzido no Rio Grande do Sul, a partir de doenças pneumocócica invasiva (DPI), evidenciou um aumento do sorotipo 19A entre os adultos, tornando o manejo das infecções um problema, pois este sorotipo está associado à resistência aos antimicrobianos. O sorotipo 19A não está incluído na formulação da vacina PCV-10, mas está na PCV-13. Este aumento observado de DPI entre os adultos pelo sorotipo 19A pode incluir a falta de proteção cruzada entre o sorotipo 19F presente na PCV-10 e o sorotipo 19A, ou devido à circulação do sorotipo 19A em crianças não imunizadas levando à transmissão para adultos. Vale ressaltar que o *S. pneumoniae* reside na superfície da mucosa do trato respiratório superior como colonizador assintomático, sendo que a colonização é o passo inicial para o processo infeccioso. Assim a melhor compreensão dos sorotipos que estão circulando na

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.106.235

nasofaringe/orofaringe de crianças e adultos poderá informar a política de imunização infantil e adulta no Brasil, para entender o efeito da imunoprofilaxia sobre a distribuição dos sorotipos e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. No Brasil, as vacinas para prevenção de doença pneumocócica são usadas de maneira limitada em adultos e o presente estudo visa determinar a prevalência de colonização pneumocócica entre adultos e em crianças, avaliar fatores de risco para colonização e distinguir o efeito direto da vacina em crianças do efeito indireto (imunidade de rebanho) sobre a colonização em adultos. Serão coletados swabs da nasofaringe de crianças e swabs de nasofaringe e orofaringe de adultos com idade 65 anos. Resultados deste estudo serão importantes para compreender melhor o aumento da prevalência do sorotipo 19A entre os adultos, já que não existe estudo de portadores com esta população no Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Definir a prevalência de portadores de Streptococcus pneumoniae e distribuição de sorotipos em crianças entre 18 e 59 meses de idade e adultos com idade 65 anos.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar os fatores de risco para colonização por S. pneumoniae com ênfase no sorotipo 19A;
2. Fornecer as bases para a introdução da vacina pneumocócica conjugada para prevenção de doença pneumocócica em idosos no Brasil e monitorar o efeito da introdução de PCV10 em crianças de sorotipos não vacinais que causam doença invasiva, como por exemplo, o sorotipo 19A;
3. Verificar a distribuição de sorotipos e padrão de resistência aos antimicrobianos;
4. Avaliar o efeito direto versus indireto da vacinação sobre a colonização; Comparar o desempenho de swab de orofaringe versus nasofaringe na taxa de portadores entre idosos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: a coleta pode durar aproximadamente 5 segundos e causa na maioria dos indivíduos tosse ou espirro. Mas também pode ocorrer engasgamento, mais raramente vômito e sangramento que cessa em poucos minutos. Se o paciente apresentar sangramento, engasgue ou vômito, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrem durante a coleta os sintomas são passageiros, mesmo assim o paciente receberá suporte enquanto os sintomas persistirem. Todos as coletas serão realizadas por membro treinado da equipe do estudo. As coletas serão realizadas para minimizar os riscos e desconfortos.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.106.235

Benefícios:

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são apenas indireto, ou seja, não haverá qualquer benefício pessoal direto por fazer parte da pesquisa. No entanto, os resultados deste estudo podem levar à melhoria no cuidado da população como um todo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo transversal com relevante questão de pesquisa epidemiológica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.010.134 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 18/05/2017. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto e TCLEs de 18/05/2017 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deve estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL**



Continuação do Parecer: 2.106.235

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853064.pdf	18/05/2017 12:06:58		Aceito
Outros	CRONOGRAMA_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 12:05:40	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	ORCAMENTO_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 11:59:26	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_responsavel.pdf	18/05/2017 11:57:51	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_RELATORIO_PARCIAL_E_FINAL.pdf	18/05/2017 11:57:12	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FLUXOGRAMA_DAS_COLETAS_E_PROCEDIMENTO_DOS_SWABS.pdf	18/05/2017 11:54:11	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_lista_de_pendencias.pdf	18/05/2017 11:52:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	DOCUMENTO_COLABORACAO_ESTRANGEIRA.pdf	18/05/2017 11:50:39	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsaveis_Legais.pdf	18/05/2017 11:49:53	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_criancas.pdf	18/05/2017 11:49:31	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_adultos.pdf	18/05/2017 11:46:34	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_triagem_adultos.pdf	18/05/2017 11:45:49	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adultos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_PROJETO.pdf	18/05/2017 11:36:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	23/03/2017 21:05:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	23/03/2017 21:04:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FORMULARIO_DELEGACAO_FUNCOES.pdf	23/03/2017 21:04:09	Mariana Preussler Mott	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	23/03/2017 21:03:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	23/03/2017 21:02:16	Mariana Preussler Mott	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	12/01/2017	EMILIO MORIGUCHI	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.106.235

Folha de Rosto	Folha.pdf	11:10:06	EMILIO MORIGUCHI	Aceito
----------------	-----------	----------	------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 07 de Junho de 2017

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Portadores de *Streptococcus pneumoniae* entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente

Pesquisador: EMILIO MORIGUCHI

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 66184117.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.063.051

Apresentação do Projeto:

As infecções por *Streptococcus pneumoniae* são um problema de saúde pública em todo o mundo, acometendo principalmente os extremos das idades, como crianças e idosos. Com o intuito de controlar a doença pneumocócica várias formulações da vacina contra o pneumococo foram desenvolvidas. O Brasil, em 2010, introduziu a vacina pneumocócica conjugada 10 valente (PCV-10) em seu calendário de vacinação, sendo disponibilizada para crianças menores de 2 anos de idade. Essa vacina tem se demonstrado efetiva na prevenção de doenças invasivas causadas pelos sorotipos vacinais entre as crianças. No entanto, um estudo conduzido no Rio Grande do Sul, a partir de doenças pneumocócica invasiva (DPI), evidenciou um aumento do sorotipo 19A entre os adultos, tornando o manejo das infecções um problema, pois este sorotipo está associado à resistência aos antimicrobianos. O sorotipo 19A não está incluído na formulação da vacina PCV-10, mas está na PCV-13. Este aumento observado de DPI entre os adultos pelo sorotipo 19A pode incluir a falta de proteção cruzada entre o sorotipo 19F presente na PCV-10 e o sorotipo 19A, ou devido à circulação do sorotipo 19A em crianças não imunizadas levando à transmissão para adultos. Vale ressaltar que o *S. pneumoniae* reside na superfície da mucosa do trato respiratório superior como colonizador assintomático, sendo que a colonização é o passo inicial para o processo infeccioso. Assim a melhor compreensão dos sorotipos que estão circulando na nasofaringe de crianças e na nasofaringe/orofaringe de adultos poderá informar a política de imunização infantil e adulta no Brasil, para entender o efeito da imunoprofilaxia sobre a

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.063.051

distribuição dos sorotipos e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. No Brasil, as vacinas para prevenção de doença pneumocócica são usadas de maneira limitada em adultos e o presente estudo visa determinar a prevalência de colonização pneumocócica entre adultos e em crianças, avaliar fatores de risco para colonização como a presença de outros microrganismos na nasofaringe, e distinguir o efeito direto da vacina em crianças do efeito indireto (imunidade de rebanho) sobre a colonização em adultos. Serão coletados swabs da nasofaringe de crianças e swabs de nasofaringe e orofaringe de adultos com idade 65 anos. Resultados deste estudo serão importantes para compreender melhor o aumento da prevalência do sorotipo 19A entre os adultos, já que não existe estudo de portadores com esta população no Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Definir a prevalência de portadores de Streptococcus pneumoniae e distribuição de sorotipos em crianças entre 18 e 59 meses de idade e adultos com idade 65 anos.

Objetivos Específicos

Avaliar os fatores de risco para colonização por S. pneumoniae com ênfase no sorotipo 19A; Fornecer as bases para a introdução da vacina pneumocócica conjugada para prevenção de doença pneumocócica em idosos no Brasil e monitorar o efeito da introdução de PCV10 em crianças de sorotipos não vacinais que causam doença invasiva, como por exemplo, o sorotipo 19A; Verificar a distribuição de sorotipos e padrão de resistência aos antimicrobianos; Avaliar o efeito direto versus indireto da vacinação sobre a colonização; Comparar o desempenho de swab de orofaringe (OF) versus nasofaringe (NF) na taxa de portadores entre idosos, para avaliar qual o melhor material clínico para a pesquisa de pneumococo entre os idosos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação dos adultos na pesquisa são: a coleta pode durar aproximadamente 5 segundos e causa na maioria dos indivíduos tosse ou espirro (devido à coleta do material do nariz – nasofaringe). Mas também pode ocorrer engasgamento, mais raramente vômito (devido à coleta do material da garganta - orofaringe) e sangramento que cessa em poucos minutos. Se você apresentar sangramento, engasgue ou vômito, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrem durante a coleta os sintomas são passageiros, mesmo assim você receberá suporte enquanto os sintomas persistirem. Todos as coletas serão realizadas por membro treinado da equipe do estudo. As coletas serão realizadas para minimizar os riscos e desconforto. Os possíveis

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.063.051

riscos ou desconfortos decorrentes da participação das crianças na pesquisa são: a coleta pode durar aproximadamente 5 segundos e causa na maioria dos indivíduos tosse ou espirro, devido à coleta do material do nariz. Mas também pode ocorrer sangramento que cessa em poucos minutos. Se ocorrer sangramento, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrem durante a coleta eles são passageiros, mas mesmo assim haverá suporte enquanto os sintomas persistirem. Todas as coletas serão realizadas por membro treinado da equipe do estudo. A coleta será realizada para minimizar os riscos e desconforto.

Benefícios:

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são apenas indireto, ou seja, não haverá qualquer benefício pessoal direto por fazer parte da pesquisa. No entanto, os resultados deste estudo podem levar à melhoria no cuidado da população como um todo. Os resultados não serão usados para qualquer decisão de tratamento ou manejo do participante, pois esta pesquisa tem como objetivo apenas avaliar a epidemiologia da bactéria (*Streptococcus pneumoniae*) que está circulando em nossa região, para verificar se a vacina que é disponibilizada atualmente contra esta bactéria está sendo efetiva. Como mencionado anteriormente como este estudo tem objetivo epidemiológico, para saber os sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* que estão circulando em nossa comunidade, para assim avaliar a efetividade da vacina que é oferecida atualmente a população. E como ter a bactéria não significa que o indivíduo irá desenvolver a doença, pelo contrário estudos mostram que apenas uma pequena porcentagem desenvolve infecção. Portanto os resultados deste estudo não tem implicações clínicas e pensamos que o retorno dos resultados aos participantes talvez gere apenas ansiedade desnecessária já que não terá nenhuma implicação clínica ou modificação em tratamento ou manejo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda 01 submetida em 05/12/2018.

Justificativa:

"Este projeto está em execução e todas as amostras já coletadas estão armazenadas em um biofreeer a -80°C na UFCSPA.

Uma emenda será realizada com a intenção de adicionar novas análises nas amostras, a presença de outros microrganismos, como vírus respiratórios, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus aureus* e *haemophilus influenzae*; para observarmos os fatores de risco em portadores de *Streptococcus pneumoniae*. Também um novo questionário será realizado via telefone com os participante após um ano da coleta para a relação fator de risco/desfecho, o pesquisador responsável por esta etapa

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.063.051

tem formação na área da saúde e é extremamente capacitado com embasamento para esclarecer quaisquer dúvida que o responsável pela criança terá. Dentro do roteiro para execução do Questionário 2.0 iremos perguntar se o responsável está disposto a participar desta segunda etapa. Portanto, esta emenda não é intervencionista e dispensa nova coleta de amostra (nasofaringe) direta com o sujeito de pesquisa. Adicionamos um Pedido de dispensa de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) das amostras já coletadas pois não modifica o objetivo do projeto nem interfere no cuidado já recebido pelo paciente. Para os participantes que ainda estão sendo recrutados será utilizada nova versão do TCLE. E por fim adicionamos mais um formulário de delegação de função para novos participantes da pesquisa."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram incluídos os seguintes documentos:

- Questionario_2_Criancas.pdf
- Roteiro_questionario.pdf
- Formulario_delegacao_funcao.pdf
- Carta_emenda.pdf
- Dispensa_TCLE_amostras_coletadas.pdf
- TCLE_responsaveis_legais_.pdf
- Brochura_PROJETO_.pdf

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda 01 submetida em 05/12/2018 aprovada, inclui nova versão do Projeto e 05/12/2018 e nova versão do TCLE de 05/12/2018.

Parecer liberado Ad-Referendum anterior à data prevista de relatoria, a pedido dos pesquisadores.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_122024_9_E1_.pdf	05/12/2018 15:42:32		Aceito
Outros	Questionario_2_Criancas.pdf	05/12/2018	Mariana Preussler	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL**



Continuação do Parecer: 3.063.051

Outros	Questionario_2_Criancas.pdf	15:30:29	Mott	Aceito
Outros	Roteiro_questionario.pdf	05/12/2018 15:28:20	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Formulario_delegacao_funcao.pdf	05/12/2018 15:15:14	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Carta_emenda.pdf	05/12/2018 14:55:42	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_amostras_coletadas.pdf	05/12/2018 14:54:55	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsaveis_legais_.pdf	05/12/2018 14:54:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_PROJETO_.pdf	05/12/2018 14:53:37	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	CRONOGRAMA_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 12:05:40	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	ORCAMENTO_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 11:59:26	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_responsavel.pdf	18/05/2017 11:57:51	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_RELATORIO_PARCIAL_E_FINAL.pdf	18/05/2017 11:57:12	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FLUXOGRAMA_DAS_COLETAS_E_PROCEDIMENTO_DOS_SWABS.pdf	18/05/2017 11:54:11	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_lista_de_pendencias.pdf	18/05/2017 11:52:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	DOCUMENTO_COLABORACAO_ESTRATEGICA.pdf	18/05/2017 11:50:39	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_criancas.pdf	18/05/2017 11:49:31	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_adultos.pdf	18/05/2017 11:46:34	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_triagem_adultos.pdf	18/05/2017 11:45:49	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adultos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_PROJETO.pdf	18/05/2017 11:36:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_MATERIAL_BIOLÓGICO.pdf	23/03/2017 21:05:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	23/03/2017	Mariana Preussler	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.063.051

Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	21:04:36	Mott	Aceito
Outros	FORMULARIO_DELEGACAO_FUNCOES.pdf	23/03/2017 21:04:09	Mariana Preussler Mott	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	23/03/2017 21:03:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	23/03/2017 21:02:16	Mariana Preussler Mott	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	12/01/2017 11:10:06	EMILIO MORIGUCHI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 06 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br