

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

Kauana Pizzutti

**Detecção e susceptibilidade do
microrganismo *Streptococcus
pneumoniae* de amostras de Derrame
Pleural**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2017

KAUANA PIZZUTTI

**Detecção e susceptibilidade do
microrganismo *Streptococcus
pneumoniae* de amostras de Derrame
Pleural**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Cícero Armídio Gomes
Dias

Porto Alegre, 2017

Catálogo na Publicação

Pizzutti, Kauana

Detecção e susceptibilidade do microrganismo
Streptococcus pneumoniae de amostras de Derrame Pleural /
Kauana Pizzutti. -- 2017.

69 f. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Cícero Armídio Gomes Dias.

1. Derrame Pleural. 2. Streptococcus pneumoniae. 3.
Antimicrobianos. 4. real-time PCR. 5. BinaxNow
Streptococcus pneumoniae. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado condições de lutar e superar as dificuldades.

Ao professor Cícero Dias pela oportunidade e orientação desta dissertação de mestrado e principalmente pela paciência, compreensão e confiança depositada em mim para conclusão deste trabalho.

Ao professor Pedro d'Azevedo pela ajuda financeira e também proporcionar o uso do Laboratório de Microbiologia Molecular.

Aos amigos do Laboratório de Cocos Gram-Positivos pela parceria neste longo caminho, cessão de materiais e trabalho de vocês.

Ao Vinicius Pieta Perez, Juliana Caierão e Vlademir Vicente Cantarelli pela paciência de me instruir na ciência das técnicas moleculares e auxílio nos momentos de dificuldade.

A toda equipe da pneumologia pediátrica e cirurgia do Hospital da Criança Santo Antônio, especialmente ao Dr. Gilberto Bueno Fischer, que se comprometeram em fornecer subsídios para a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo suporte e por acreditarem em mim mesmo quando os meus ideais pareciam distantes e inatingíveis. A minha irmã Pollyana por todo carinho e força. Ao meu namorado Guilherme Leal meu pilar e refúgio, muito obrigada pela paciência e compreensão.

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

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é um dos microrganismos que causam algumas das principais doenças invasivas como meningite, bacteremia e pneumonia especialmente entre crianças e idosos, sendo considerado um dos maiores contribuintes para a morbidade e mortalidade em todo o mundo. Há ainda a ser considerado o aumento na prevalência de pneumococo não sensível a penicilina (PNSP) e multirresistentes, resultando em um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Após o surgimento das vacinas pneumocócicas conjugadas e sua implementação como parte dos programas de imunização em crianças, pode-se observar a redução dos sorotipos vacinais em portador e conseqüentemente nas doenças invasivas. Na era pós-vacina, em alguns estudos, observou-se que as taxas de derrame parapneumônico (DPP) e empiema aumentaram significativamente.

A detecção de *S. pneumoniae* em líquido pleural é limitada pela baixa sensibilidade da cultura, especialmente quando da utilização prévia de antimicrobianos. Métodos cultura-independentes como testes de detecção de antígenos e *Polymerase Chain Reaction* (PCR) vem sendo usados para aumentar o rendimento da detecção do agente em diferentes matérias clínicos. Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar um teste imunocromatográfico (TIM) para detecção de antígeno pneumocócico e um teste de PCR em tempo real (qPCR) para detecção dos genes *lytA* (detecção do agente) e *pbp2b* (marcador de susceptibilidade aos β -lactâmicos) entre amostras de líquido pleural de crianças que apresentassem cultura negativa para o agente.

Foram obtidas 40 amostras, sendo que em 30 foi possível constatar o uso prévio de antimicrobianos. Para a análise final, 37 amostras foram incluídas. TIM e qPCR para o gene *lytA* apresentaram resultados positivos em 26 (70,3%) e 27 (73,0%) das amostras, respectivamente, com uma concordância moderada ($K=0,535$) entre os métodos. A ausência de *pbp2b*, compatível com potencial falta de susceptibilidade aos β -lactâmicos, foi constada entre 4/27 (14,8%) das amostras.

Os resultados do presente estudo reforçam o conceito de baixa sensibilidade da cultura para *S. pneumoniae* em amostras de líquido pleural, especialmente nos pacientes em uso prévio de antimicrobianos. Métodos cultura-independentes, como TIM e qPCR, embora tenham uma concordância moderada, aumentam a detecção de *S. pneumoniae* de líquido pleural. O uso de qPCR combinando a detecção do gene *lytA* com um marcador de resistência deve ser melhor explorado em estudos clínicos no futuro.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Líquido pleural. Teste imunocromatográfico de antígeno. PCR em tempo-real.

Abstract

Streptococcus pneumoniae is among the most important causes of morbidity and mortality worldwide, mostly in children and the elderly. It causes important invasive infections as meningitis, pneumonia and bacteremia. The increase in the prevalence of β -lactam non-susceptible and multiresistant isolates is a global matter of concern in public health. After the use of conjugate pneumococcal vaccines and the implementation of this strategy in children, a significant decrease in the carrier status and in the incidence of invasive infections was well documented. Some problems, however, remain and in some studies, an increase in the rates of parapneumonic effusion and empyema was described.

The detection of *S. pneumoniae* in pleural fluid is limited by low sensitivity of bacterial culture, especially among individual with previous use of antibiotics. Culture-independent methods as antigens detection tests and polymerase Chain Reaction (PCR) are used to increase the yield of detection of the agent in different clinical specimens. This study aimed to evaluate an immunochromatographic test (IMT) for the detection of pneumococcal antigen and a real time PCR test (qPCR) in the detection of genes *lytA* (agent detection) and *pbp2b* (a marker of sensibility of β -lactam agents) in pleural fluid samples of children with negative results of culture for the agent.

We obtained 40 pleural fluid specimens; in 30 the previous use of antimicrobials was documented. In the final analysis, 37 samples were included. IMT and qPCR presented positive results in 26 (70.3%) and 27 (73.0%) of the samples, respectively, showing a moderate agreement ($K=0.535$) between the two methods. The absence of *pbp2b*, meaning a potential lack of sensibility to β -lactam agents, was verified in 4/27 (14.8%) of the samples.

Results of the present study, however, clearly strength the concept of low sensitivity of culture. Culture-independent methods such as IMT and qPCR, although with a moderate agreement between then, increase the detection of *S. pneumoniae* in PPE. The use of qPCR combining detection of *lytA* and a marker of β -lactam resistance must be better explored in further clinical studies.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Pleural fluid. Immunochromatographic antigen test. Real-time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA A1 – Amplicons do resultado da reação de qPCR para o <i>ermB</i> (98pb). Analisados no gel 1,5% de agarose.....	55
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Primers and probes used in qPCR assays	47
TABELA 2 - General characteristics of children with PPE	48
TABELA 3 - Detection of <i>S. pneumoniae</i> by IMT and qPCR	49
TABELA 4 - Records and results of conflicting samples	50
TABELA A1- <i>Primers e probes</i> usadas no ensaio de qPCR.....	53
TABELA A2 - Perfil genotípico de resistência aos macrolídeos <i>Streptococcus pneumoniae</i> proveniente de LP.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	Center for Disease Control and Prevention
CI	Confidence interval
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPI	Doença pneumocócica invasiva
DPP	Derrame parapneumônico
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IMT	Immunochromatographic membrane test
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDH	Lactato desidrogenase
LP	Líquido pleural
LytA	Autolisina A
<i>lytA</i>	Gene da autolisina A
MDR	Multirresistentes
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
NanA	Neuraminidase A
PAC	Pneumonia adquirida da comunidade
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
PCV	Pneumococcal Conjugate Vaccine
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPE	Parapneumonic effusion
PF	Pleural fluid
Ply	Pneumolisina
PNSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> não suscetível à penicilina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
RNase P	Ribonuclease P
RNAr	Ácido ribonucleico ribossomal
SIREVA	Sistema de redes de Vigilância de Agentes Bacterianos responsáveis por pneumonia e meningite
TPD	Traspeptidase
TIM	Teste imunocromatográfico de membrana
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
1.1.1 Fatores de Virulência	12
1.1.2 Epidemiologia	13
1.2 Pneumonia pneumocócica	14
1.3 Derrame parapneumônico (DPP)	15
1.3.1 Diagnóstico e definição de agentes	16
1.4 Antimicrobianos	17
1.4.1 β -lactâmicos	18
1.4.2 Macrolídeos	19
1.5 Identificação laboratorial do <i>S. pneumoniae</i> : o reconhecimento do agente	20
1.5.1 Cultura	20
1.5.2 Ensaio de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)	21
1.5.3 Detecção de antígenos do <i>S. pneumoniae</i>	23
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVO	33
4.1 Objetivo Geral	33
4.2 Objetivos Específicos	33
5. ARTIGO CIENTÍFICO	34
5.1 Manuscrito	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7. PERSPECTIVAS	51
ANEXO A – Resultado complementar: Perfil genotípico de resistência aos macrolídeos em <i>Streptococcus pneumoniae</i> de líquidos pleurais	52
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido	57
ANEXO C - Parecer de aprovação do CEP do HCSA	60
ANEXO D - Parecer de aprovação do CEP da UFCSPA	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

O microrganismo *Streptococcus pneumoniae* pertence ao Reino Monera, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales, Família Streptococcaceae e Gênero *Streptococcus* e atualmente são reconhecidas 99 espécies pertencentes a este gênero (Thompson et al., 2013).

O pneumococo é um coco Gram-positivo, que apresenta condições de crescimento especiais, pois além de ser anaeróbio facultativo, necessita meio de cultura rico e acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, sua temperatura de crescimento é de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. As características morfológicas celulares e coloniais como determinação do tipo de hemólise, susceptibilidade à optoquina e bile solubilidade servirão de base para a diferenciação do *S. pneumoniae* dos demais integrantes do grupo *viridans*, que inclui diferentes espécies de estreptococos (Spellerberg & Brandt, 2011).

O pneumococo pode pertencer a microbiota da nasofaringe humana, ou seja, reside na superfície da mucosa do trato respiratório superior como colonizador assintomático em humano. Durante sua colonização na nasofaringe, o pneumococo compartilha o seu habitat com uma série de outros microrganismos, podendo permanecer sem sintomas, porém essa colonização é um passo necessário para a doença pneumocócica. A partir da nasofaringe, o pneumococo pode migrar através das trompas de eustáquio para causar otite média, ou alcançar sítios normalmente estéreis configurando Doença Pneumocócica Invasiva (DPI), através do epitélio respiratório, chegar a corrente sanguínea e causar bacteremia, meningite ou descer para o trato respiratório e causar pneumonia. O mecanismo dessa migração que precede a doença não é totalmente compreendido (Sakai et al., 2013).

A colonização é um pré-requisito tanto para a transmissão, que ocorre a partir do contato direto com secreções de indivíduos colonizados, quanto para a evolução da espécie. Apenas uma pequena parte dos portadores desenvolve a doença e alguns fatores contribuem para isso, como o estado imunológico do indivíduo, e presença de comorbidades, a virulência do microrganismo, o sorotipo envolvido, e a carga bacteriana (Simell et al., 2012). A prevalência do carreamento pneumocócico pode chegar a aproximadamente 50-70% nos primeiros anos de vida (Watson et al., 2006; Chien et al.,

2013). As crianças são a principal fonte de transmissão para os adultos e fatores ambientais como temperatura (meses de inverno) e aglomerações também contribuem para a disseminação.

1.1.1 Fatores de virulência

O pneumococo contém diversos fatores de virulência que contribuem de modo multifatorial para a patogenia do microrganismo. No processo de instalação do pneumococo, permanência no hospedeiro e manutenção do processo de patogênese, o principal fator de virulência é a cápsula polissacarídica que é codificada por um único locus *cps* (*Capsular Polysaccharide Synthesis*). A grande diversidade de sorotipos capsulares do pneumococo confere diferentes estruturas e assim, diferentes propriedades ao microrganismo levando ao aumento da capacidade de colonização, tendo como principal função proteger a célula bacteriana contra a resposta imune, evitando a fagocitose do hospedeiro (Mitchell & Mitchell, 2010; Rayner et al., 2015).

As adesinas permitem a ligação das células bacterianas sobre a superfície de células do epitélio respiratório. As proteínas de superfície do pneumococo A e C são as proteínas de ligação mais caracterizadas (Kurola 2011; Ricci et al., 2013). A pneumolisina é uma toxina citoplasmática lançada pela autólise da célula e é um fator de virulência muito importante com vários efeitos e que nesse microrganismo é codificado pelo gene *ply*. Alguns pneumococos podem produzir pili que ajuda a estimular a ligação do pneumococo nas células e também na produção de citocinas pró-inflamatórias (Mitchell & Mitchell, 2010). A neuraminidase (NanA) favorece a manutenção do *S. pneumoniae*, pois atua na clivagem de substâncias do muco respiratório, diminuindo assim sua viscosidade (Normark & Normark, 2010). O microrganismo produz peróxido de hidrogênio que degrada o ácido-hialurônico celular, esse ácido é um dos componentes indispensáveis do tecido conjuntivo do hospedeiro (Pritchard et al. 2004).

LytA (N-acetylmuramoyl-L-alanine-amidase) é a principal enzima autolítica do *S. pneumoniae*, esta enzima é necessária para a autólise e sua patogênese. Durante a fase estacionária do crescimento bacteriano a sua ação de lise celular é ativada através do desoxicolato e das Proteína de Ligação à Penicilina (PBPs) (Mellroth et al. 2012). A autolisina LytA faz parte de um grupo amplamente distribuído de enzimas de degradação da parede celular, localizadas no envelope celular desempenham importantes papéis numa variedade de funções fisiológicas e deste modo têm grande importância na clínica (Whatmore & Dowson, 1999). O sequenciamento do locus *lytA* e a alta resolução na

tipagem de DNA do *S. pneumoniae*, mostrou que o gene é altamente preservado dentro da espécie. É considerado um alvo ideal para a identificação específica em estudos epidemiológicos e clínicos por ter uma variação alélica restrita. O *lytA* distingue o *S. pneumoniae* a partir de espécies genotipicamente semelhantes como *Streptococcus mitis* e *S. oralis* (McAvin et al., 2001). Gholamhosseini-Moghaddam et al., 2015 em um estudo com portadores da nasofaringe concluiu que o gene *cpsA* é específico e altamente conservado entre os isolados de *S. pneumoniae*, porém o gene *lytA* mostrou-se mais frequente entre os isolados. Devido a diversos fatores citados, o *lytA* além de ser um marcador de virulência bem caracterizado é um gene alvo específico, ideal para testes de detecção do pneumococo (Carvalho et al.2007; Peters et al., 2009; Albrich et al., 2012).

1.1.2 Epidemiologia

S. pneumoniae encontra-se entre os principais agentes causadores de DPI como meningite, bacteremia e pneumonia especialmente em crianças, idosos e indivíduos com sistema imunológico debilitado (Nuorti & Whitney, 2010; Simell et al., 2012). As infecções por este microrganismo são um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo estimativas mundiais as infecções pneumocócicas causam aproximadamente 1,6 milhões de mortes, sendo que uma parcela importante ocorre em crianças menores de cinco anos (Hajia et al 2014), mais de 90% dessas mortes ocorrem em países de baixa renda onde a pneumonia ainda é a maior causa de morte entre esses indivíduos. Dessa forma é uma das principais doenças bacterianas contribuintes para a morbidade e mortalidade em todo o mundo (Prato et al., 2010; WHO, 2012).

Após o surgimento das vacinas pneumocócicas conjugadas (*Pneumococcal Conjugate Vaccine* – PCV) e sua implementação como parte dos programas de imunização em crianças, pode-se observar a redução dos sorotipos vacinais em portador e conseqüentemente nas DPI, atingindo tanto os indivíduos alvos da vacinação como aqueles que não a recebem, devido ao efeito indireto (Tan, 2012). Nos Estados Unidos (EUA), antes da implementação da PCVs, foram relatados 100 casos a cada 100.000 pessoas em 1998 de DPI em crianças menores de 5 anos de idade, após a introdução das PCVs, nos EUA (PCV7 em 2000 e PCV13 em 2010), diminui para 20 casos para 100.000 pessoas em 2010, e nos mais recentes relatos, 9 casos a cada 100.000 pessoas em 2015 (CDC, 2015a).

No Brasil, entre as DPIs a meningite foi a mais prevalente com 44,8% dos casos, seguida de bacteremias com 34,4%, 19,3% de pneumonias e 1,6% de outras doenças invasivas (SIREVA II, 2012). Porém, a pneumonia bacteriana não é uma doença de notificação compulsória, como nos casos de meningite, sendo assim possível que os dados disponíveis estejam subestimados para as pneumonias. Das infecções causadas pelo *S. pneumoniae*, a pneumonia adquirida na comunidade ainda é a mais frequente, estima-se que 13,8 milhões de casos de pneumonia ocorrem a cada ano em todo o mundo causando 90% de todas as mortes relacionadas com a infecção pneumocócica (Sartori, Soares & Novaes, 2012). No Brasil, a vacina conjugada 10-valente (PCV10) foi introduzida no calendário de vacinação do Ministério da Saúde em 2010, para crianças com menos de dois anos e, por intermédio de um estudo de casos e controles, foi constatado que PCV10 previne doença pneumocócica invasiva causada por sorotipos vacinais (Domingues et al., 2014).

1.2 Pneumonia pneumocócica

As doenças respiratórias são responsáveis por grande parte da mortalidade e morbidade infantil. A doença mais frequente associada ao pneumococo é a pneumonia e a complicação mais comum é o derrame parapneumônico (Eastham et al., 2004), sendo uma infecção grave. Em crianças leva à hospitalização prolongada e ao risco de internação em unidade de terapia intensiva (Rowan-Legg et al., 2012), podendo chegar a casos mais graves ao desenvolvimento de empiema.

Na Europa, os estudos demonstram que o pneumococo é o patógeno mais comumente isolado na pneumonia adquirida da comunidade (PAC), sendo fonte de 35% dos casos em geral, independentemente se os pacientes foram tratados em ambiente ambulatorial ou hospitalar, incluindo pacientes mais jovens e até casos de pneumonia adquirida em casa de repouso (Drikkoningen & Rohde, 2014). Nos EUA, dentro das PAC, aproximadamente 20% a 60% são causadas pelo pneumococo (Bartlett, 2011). Ainda neste país, cerca de 400.000 hospitalizações/ano são devidas a pneumonia pneumocócica. Destes, 25-30% também tiveram DPI, como empiema (infecção do espaço pleural), pericardite (inflamação da membrana que envolve o coração) entre outras (CDC, 2015b).

Tanto nos EUA quanto na Europa houve uma diminuição na incidência da pneumonia bacteriana, provavelmente atribuída a implementação da vacina

pneumocócica conjugada, entretanto, as taxas de derrame parapneumônico (DPP) e empiema aumentaram significativamente (Mohamed & Ibrahim, 2016). Porém, Wiese et al. 2016, em um recente estudo nos EUA, evidenciaram que no período após introdução da vacina PCV-13 está ocorrendo a diminuição tanto do empiema pneumocócico como nos sem causa conhecida.

1.3. Derrame parapneumônico (DPP)

A primeira fase (DPP simples) é caracterizada pelo acúmulo do LP, responsável por aumentar a pressão no espaço intersticial e pleural, dificulta a absorção por vasos linfáticos da pleura e do pulmão, causando assim um derrame pleural. Isto resulta na formação de um LP estéril, não viscoso, com pH e concentração de glicose normais e LDH ligeiramente aumentado (Light & Girard 1980; Sahn 1993).

O DPP durante a fase secundária, conhecida como fibrinopurulenta (2º ao 10º dia do início do processo), quando os microrganismos do processo pneumônico contíguo invadem o espaço pleural e causam o aumento da resposta inflamatória e inibição de atividade fibrinolítica, conduzindo um acúmulo de fibrina no espaço pleural (Alemán et al., 2003). O LP é frequentemente turvo, a cultura é positiva e a citologia demonstra neutrófilos e células degeneradas. Em testes bioquímicos apresenta queda no pH, aumento da glicose e o LDH pleural mais de três vezes o limite superior normal para o soro (Hamm & Light 1997; Light et al., 2006).

Nessa segunda fase, o LP deve ser drenado em conjunto com uma terapia antimicrobiana eficaz, se isso não for realizado o derrame pode avançar para uma terceira fase conhecida por fase de organização, quando ocorre a invasão e proliferação dos fibroblastos no líquido, formando uma camada espessa na pleura visceral e parietal, que ao envolver o pulmão impede a sua expansão completa e assim dificulta a troca de gás. Neste estágio, o LP é espesso, e se o paciente não for adequadamente tratado, o fluído pode ir espontaneamente para o pulmão, produzindo uma fístula broncopleural (Hamm & Light 1997; Davies et al., 2010).

O empiema é caracterizado pela presença de microrganismos e/ou pus no espaço pleural. Macroscopicamente o LP é purulento, espesso e viscoso. Os fatores de risco para infecção pleural são semelhantes aos de pneumonia, pois cerca de 60% dos casos de empiema são decorrentes a um processo pneumônico primário (Smith et al., 1991; Light 2013), os outros 40% incluem complicações após procedimentos cirúrgicos

torácicos, perfuração esofágica, trauma, toracocentese e infecção subdiafragmática (Hamm & Light 1997; Davies et al., 2010).

1.3.1 Diagnóstico e definição de agentes

A primeira avaliação é feita através do resultado da radiografia do tórax, esse exame de imagem permite observar sinais precoces DPP, porém não pode confirmar o diagnóstico. Também é indicada a ultrassonografia e para casos mais graves a tomografia computadorizada (Sahn et al., 1993). A biopsia da pleura é a principal indicação em casos de suspeita de DP tuberculoso ou câncer (Sokolowski et al., 1998).

A toracocentese é um procedimento invasivo, no qual é drenado o líquido pleural do paciente, é um passo essencial no diagnóstico. Desta maneira é possível identificar os microrganismos causadores da doença e também diferenciar o DPP de empiema. A demora na realização da punção pode agravar o estado do paciente, nestes casos a hemocultura é positiva apenas em 10%, sendo de grande importância a análise do LP para confirmação do diagnóstico (Cantó et al., 1977; Letheulle et al., 2015).

Para a confirmação da causa do derrame é importante a análise do líquido pleural; para tanto, devem ser solicitados os seguintes exames: pH, proteínas totais, LDH, glicose, contagem total de células e citológico diferencial. É indicada a solicitação de dosagens de LDH e proteínas séricas do paciente (Light 1997).

Com base nos resultados laboratoriais bioquímicos, Light em 1972 categorizou os derrames em transudatos e exsudatos. O derrame transudativo, é frequentemente referido a um processo não inflamatório (alteração da pressão hidrostática ou osmótica coloidal) e geralmente é pobre em proteínas. Por outro lado, os exsudatos são relacionados ao processo inflamatório com aumento da permeabilidade vascular e efusão de proteínas para o espaço pleural (Balfour-Lynn et al., 2005). A presença de um transudato exclui o diagnóstico de DPP que são exclusivamente exsudato (Light 1997). Quando o derrame é causado por microrganismos, o metabolismo microbiano e a atividade fagocítica dos neutrófilos levam ao aumento da produção de ácido láctico, que proporciona queda do pH e glicose no líquido pleural, ocorre também o aumento da lactato desidrogenase (Psallidas, Corcoran & Rahman 2014). Na última década a *British Thoracic Society* classificou os derrames parapneumônicos através de dados bioquímicos do LP, em DPP simples e complicado (BTS, 2010).

As técnicas usadas no diagnóstico do agente, são cultura do líquido pleural e a coloração de Gram, que são pouco sensíveis e podem ser negativos devido a diversos fatores, incluindo a terapia antimicrobiana prévia a coleta do LP. Relata-se que apenas 30% dos casos produzem culturas positivas (Andreo et al., 2006; Resti et al., 2009). São de grande importância os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, rotineiramente definidos pela concentração inibitória mínima (MIC), determinada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (Cilloniz et al., 2016). Porém, para a execução da MIC é necessário o isolamento microbiano por intermédio da cultura. Com base nessa problemática é de grande importância a utilização de novos testes mais rápidos e sensíveis, sem necessidade de cultura. Devido a isso, os testes moleculares, apresentam-se como uma boa alternativa para diagnóstico diretamente de amostras, identificando o microrganismo e sua suscetibilidade aos antimicrobianos (Srinivasan et al., 2011).

1.4 Antimicrobianos

Nos casos de DPP é indispensável o rápido início ao tratamento, deste modo, a cobertura antimicrobiana é inicialmente empírica, abrangendo os microrganismos mais encontrados, com base em dados de faixa etária e fatores de risco (Marchi et al., 2006).

Ao ser confirmada a presença do *S. pneumoniae*, tanto em casos PAC pneumocócica quanto em pneumonias hospitalares é indicada a utilização das penicilinas, e os macrolídeos são aplicados como alternativa antimicrobiana ou adjunta ao tratamento. Porém o surgimento do *S. pneumoniae* não suscetível à penicilina (PNSP) ou multirresistente (MDR), incluindo a resistência aos macrolídeos, despertou uma preocupação mundial e uma séria ameaça para a repercussão da infecção pneumocócica (Feldman & Anderson 2016).

A resistência do *S. pneumoniae* a algumas classes de antimicrobianos como fluoroquinolonas, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, lincosamidas e cloranfenicol apresentam taxas que ocorrem em frequências diversificadas, dependente da região. Até o momento, não há relatos de resistência aos glicopeptídeos, como a vancomicina (Metcalf et al., 2016).

Devido à maior importância de beta-lactâmicos e macrolídeos no tratamento das infecções pneumocócicas complicadas, estes dois agentes serão apresentados de modo mais detalhado a seguir.

1.4.1 β -lactâmicos

Essa classe de antimicrobianos inclui as penicilinas e cefalosporinas, a principal característica deste grupo é a presença do anel β -lactâmico em sua estrutura molecular. Atuam na inibição da enzima transpeptidase (TPD), impedindo a síntese da parede celular, e assim provocando a lise microbiana. O mecanismo de ação é conferido apenas na presença dos receptores PBPs (proteínas de ligação à penicilina) localizados na membrana interna do microrganismo, sendo essencial para a susceptibilidade à penicilina (Sauvage et al., 2008).

A resistência aos β -lactâmicos é conduzida principalmente por alterações nesse domínio das TPDs causadas por mutações no complexo PBPs que é dividido em três, classe A (PBP1a, PBP1b e PBP2a), classe B (PBP2x e PBP2b) e PBP3. As PBPs são sítio ativo da serina peptidase que catalisa a polimerização dos precursores do peptidoglicano na montagem de parede celular microbiana. As mutações nas PBPs podem estar relacionadas tanto as recombinações intra espécie, pois algumas destas mutações são estáveis em clones de PNSP disseminados internacionalmente provocando vantagens evolutivas, como também recombinação entre espécies, sendo retalados eventos envolvendo espécies de *S. mitis* e *S. oralis* (Kumari et al., 2008; Cornick & Bentley 2012). A subsequente recombinação e mutação intra espécie, diversifica ainda mais o *locus pbp*, resultando em grande número de alelos *pbp*. Também já se tem relatos de diferentes PBPs associados a diferentes níveis de MIC para os β -lactâmicos. As alterações em PBP1a, PBP2x, e PBP2b são conhecidas por MIC mais alto da penicilina, já a modificação na PBP2b confere não susceptibilidade às enicilinas e ao mesmo tempo atribui susceptibilidade reduzida a outros β -lactâmicos. Nesse cenário, a ausência do gene *pbp2b* é o principal determinante da não susceptibilidade à penicilina no *S. pneumoniae* (Coffey et al., 1993; Li et al., 2016).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos tem sido uma das principais razões para o surgimento de isolados resistentes. Na atualidade, a resistência aos beta-lactâmicos, é preocupante em casos de *S. pneumoniae* com taxas de MICs muito elevadas (Kim et al., 2016).

1.4.2 Macrolídeos

Este grupo de antimicrobianos é comumente utilizado em infecções respiratórias como pneumonia, sinusite aguda, otites médias, tonsilites e faringites. Tem como principal ação bactericida e bacteriostática em patógenos predominantes envolvidos nestas doenças, como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (Barry et al., 1988).

Os macrolídeos são definidos por uma estrutura macrocíclica complexa, que apresenta um anel lactona com 14, 15 ou 16 membros substituído por grupos neutros ou aminoaçúcares. Este grupo atua diretamente na ligação com a subunidade 50S do RNA ribossomal 23S, interferindo na elongação da cadeia peptídica durante a translação e assim bloqueia a síntese da proteína microbiana. O mecanismo de resistência neste grupo antimicrobiano ocorre principalmente por duas formas: modificação do alvo ribossômico, que é codificado pelo gene *ermB*, ou através do mecanismo de bomba de efluxo do fármaco, que é codificado pelo gene *mef* (Chancey et al., 2015).

A modificação do alvo do ribossoma microbiano, é provocado pelas RNA metilases, tais como, *erm* (A), *erm* (B) e *erm* (C) que modificam nucleotídeos específicos no RNAr 23S. A principal metilase responsável pela resistência aos macrolídeos em *S. pneumoniae* é *erm* (B). Esta metilação leva a transformação estrutural no ribossomo, que resulta na redução da ligação, constituindo o fenótipo chamado MLSB, que inclui todos os macrolídeo, lincosamida e streptogramin B (Schroeder & Stephens 2016). Já está bem estabelecido que a expressão do gene *ermB* é controlada por atenuação, geralmente em nível de tradução (Chancey, Zähler & Stephens, 2012).

A resistência causada por bomba de efluxo é um mecanismo simples. O microrganismo ao receber o fármaco o elimina bombardeando-o para fora do seu citoplasma. No *S. pneumoniae* esse mecanismo é codificado por um dos quatro alelos *mef*: *mef* (A), *mef* (E), *mef* (O) ou *mef* (I), sendo o mais comum o *mef* (E) (Gay & Stephens 2001). Ainda não é muito bem compreendido molecularmente como ocorre a ligação do macrolídeo na membrana microbiana para promover o efluxo (Chancey, Zähler & Stephens, 2012). Este mecanismo de resistência não abrange lincosamidas e estreptogaminas, ficando restrito apenas aos macrolídeos, apresenta MICs menores em relação aqueles produzidos na presença do gene *ermB*.

Devido ao aparecimento e aumento de isolados de *S. pneumoniae* não suscetível aos macrolídeo, há uma preocupação na evidência de falha terapêutica tanto em casos com baixo como em alto nível de resistência. No mesmo isolado podem

ocorrer múltiplos mecanismos ou mecanismos desconhecidos e também a sobreposição de níveis da MIC (Farrell et al., 2002; Low et al., 2013; Cilloniz et al., 2016).

1.5 Identificação laboratorial do *S. pneumoniae*: o reconhecimento do agente

1.5.1 Cultura

O diagnóstico das infecções pneumocócicas é feito através das metodologias clássicas como a cultura bacteriana com cultivo do *S. pneumoniae* em meio acrescido de sangue de carneiro e atmosfera de 5% de nível de CO₂. Após o crescimento, em geral ocorre a formação de uma área alfa-hemolítica (lise parcial dos eritrócitos no meio de cultura), as colônias têm aparência brilhosa, pequenas e coloração cinza. Em isolados com denso encapsulamento, as colônias podem apresentar-se com aspecto mucóide e maior tamanho. A coloração de Gram também é utilizada, o pneumococo apresenta-se na microscopia, em forma de diplococos em arranjos, com diâmetro de 0,5 µm a 1,25 µm (Winn et al. 2012). Há uma grande dificuldade na identificação e detecção do pneumococo, principalmente para diagnósticos de locais respiratórios não estéreis por serem polimicrobianos, e estéreis pela dificuldade do cultivo microbiano. A cultura do LP comumente produz resultados negativos na rotina laboratorial, e isso se deve a fatores como o uso de antimicrobianos previamente à coleta da amostra ou pela própria lise do microrganismo devido à produção da autolisina (Ploton et al., 2006; Casado Flores et al., 2010).

Wiese et al. 2016, fizeram uma análise no banco de dados *Nationwide Inpatient Sample* (NIS) dos EUA, e assim obtiveram dados nacionais de crianças menores de 18 anos, com empiema, no período de 1997 a 2013. Foi observada uma predominância de empiemas com etiologia não especificada, refletindo a dificuldade do diagnóstico com técnicas tradicionais. Assume-se que casos que apresentem cultura negativa sejam devidos a *S. pneumoniae*, embora a proporção desta ocorrência seja indefinida. Nesse estudo, também concluiu-se que os empiemas sem causa comprovada, juntamente com empiemas pneumocócicos, estão em declínio após a implementação da PCV-13 nos EUA.

No estudo de Blaschke et al., 2011, analisou-se LP de crianças com empiema, e 24% das amostras foram positivas pelo método de cultura para *S. pneumoniae*, contudo

ao utilizar técnicas moleculares, 71% foram positivos para este agente. Krenke et al., 2016 conduziram um estudo prospectivo nos EUA, com participação de 64 crianças com DPP ou empiema. Foram utilizadas amostras de LP e sangue para fazer a detecção de diversos microrganismos tanto por cultura microbiana como por PCR; o *S. pneumoniae* foi o microrganismo mais comum, sendo detectado em 17,2% e 40,6 % por cultura e PCR, respectivamente. Portanto menos da metade das amostras positivas são detectadas pela metodologia padrão.

Com base nesses estudos, é plausível concluir que o pneumococo é um dos maiores contribuintes para o empiema com causas indefinidas por metodologias convencionais, também podemos observar o quão importante é a identificação destes patógenos, para assim se ter um tratamento adequado.

De modo geral, as técnicas convencionais são pouco sensíveis e demoradas, sendo assim nos últimos anos, os ensaios diretamente de amostras têm sido propostos, como os testes moleculares, que são mais sensíveis como a PCR em tempo real, e testes rápidos como o de detecção de antígenos (Picazo, et al., 2013; Nikolenko et al., 2015; Perez et al., 2016).

1.5.2 Ensaio de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)

É uma técnica de amplificação de DNA, vastamente utilizada por ser muito sensível. Essa metodologia requer um marcador fluorescente para a detecção do gene alvo. A fluorescência emitida pela ligação com os fragmentos de DNA é detectada pelo equipamento, assim é possível acompanhar a reação em tempo real, proporcionando a detecção e quantificação do DNA presente. Um dos marcadores mais tradicionais é com o corante intercalante SYBRGreen®, este liga-se as fitas duplas do DNA emitindo fluorescência, para a diferenciação das amplificações inespecíficas é necessária a análise das curvas de dissociação (temperaturas de *melting*). Para otimização na análise e maior especificidade, foram criadas outras metodologias baseadas na adição de um terceiro oligonucleotídeo (sonda) marcado com fluoróforo e *quencher*, específico para a sequência, localizado entre os dois *primers*, um dos exemplos dessa metodologia é a TagMan MGB®. Durante a amplificação a sonda liga-se ao fragmento amplificado e libera o fluoróforo e assim é detectado pelo equipamento (Buh et al. 2010).

Na qPCR a análise é feita através de gráficos na fase logarítmica da reação, diferente do ensaio de PCR convencional que a observação é na fase platô (Kellogg et al., 1990), necessitando manipulação pós-PCR, que além de acrescentar tempo à análise, pode levar a contaminação laboratorial. A PCR convencional, amplificação seguida de eletroforese para identificação dos fragmentos, é um método limitado, e não é ideal para testes que exigem alto rendimento das amostras (Heid et al., 1996).

A qPCR é uma ferramenta atraente para o diagnóstico de doenças pneumocócicas (Klugman, Madhi e Albrich; 2008) e com a crescente valorização da associação entre a carga pneumocócica e doença clínica, houve um recente interesse em ensaios pneumocócicos quantitativos, especialmente com a utilização de genes alvos mais específicos, como a autolisina pneumocócica (*LytA*) (Carvalho et al. 2007; Peters et al., 2009; Albrich et al., 2012).

Hajia et al., 2014, avaliou a expressão do gene *lytA*, pela técnica de qPCR, em isolados de pneumococo, proveniente de amostras de LCR, secreção ocular, aspirado traqueal e LP, e verificou 100% de sensibilidade na detecção de *S. pneumoniae*. Concluíram que há uma necessidade de aplicar essa metodologia em genoma extraído diretamente de amostras desconhecidas, sem a necessidade da cultura e isolamento, uma vez que é necessário acesso aos resultados no menor tempo possível em alguns pacientes com condições críticas. Alguns estudos já confirmaram a eficiência da técnica de PCR em tempo real diretamente de amostras como o estudo de Wyllie et al., 2014 em que foi detectado o gene *lytA* em qPCR, para estudar o transporte pneumocócico em saliva coletada de crianças e observaram a efetividade deste ensaio mesmo em amostra de natureza polimicrobiana. Em um estudo recente que utilizou amostras de líquido pleural de 38 crianças com cultura negativa foram obtidos resultado positivos de PCR para o gene *lytA* em 81% dos casos (Perez et al., 2016).

Srinivasan et al 2011, em um estudo com qPCR, detectaram os genes *lytA*, *pbp2b*, *ermB* e *mef* em 180 isolados de *S. pneumoniae*, todos foram positivos para *lytA*, 99% das amostras com MIC não sensíveis a penicilina foram também negativas para o gene de susceptibilidade *pbp2b* e 96,7% das amostras com MIC não sensível a eritromicina e/ou clindamicina também foram positivas para os genes de *ermB* e/ou *mef*. Utilizaram ainda esta mesma metodologia diretamente no líquido cefalorraquidiano (LCR) e líquido pleural (LP), e mesmo em amostras com cultura negativa, demonstraram claramente a capacidade de detecção do *S. pneumoniae* e a susceptibilidade aos antimicrobianos testados. Este ensaio permite o rápido diagnóstico e informações

importantes ao paciente utilizando apenas amostras clínicas, facilitando assim a intervenção terapêutica com antimicrobianos apropriados.

Ainda que a utilização de PCR para detecção de *S. pneumoniae* diretamente de amostras clínicas aumente o rendimento da detecção deste agente, mais estudos são necessários para melhor definir o papel deste procedimento no manejo de pacientes.

1.5.3 Detecção de antígenos do *S. pneumoniae*

Os testes para antígenos solúveis do *S. pneumoniae* foram criados para fornecer uma abordagem complementar e um resultado imediato para identificação do agente das infecções pneumocócicas em fluidos biológicos. A detecção do antígeno também abrange casos em que já se obteve o espécime após a administração de antimicrobianos. O antígeno capsular pneumocócico, detectado pela metodologia de aglutinação em látex em LP demonstrou sensibilidade reduzida quando comparado ao teste imunocromatográfico (Monnier et al., 2006).

O teste imunocromatográfico de membrana (TIM) foi introduzido na última década. Detecta o antígeno C pertencente da parede celular do *S. pneumoniae*. A sua utilização é indicada em conjunto com a cultura e outros métodos para auxiliar no diagnóstico diretamente de amostras de LCR e urina de pacientes, porém não deve ser utilizado para testes de urina em crianças, pela presença de falso-positivos devido a colonização do *S. pneumoniae* (Dowell et al. 2001; Hamer et al. 2002). Estudos tem afirmado que podem ocorrer reações cruzadas com outros *Streptococcus*, também gerando falso-positivos (Casado Flores et al. 2010). Embora concebido para utilização em urina e LCR, o emprego deste procedimento em outros espécimes clínicos vem sendo investigado. Em estudos com LP a sensibilidade do TIM, variou entre 83,8 até 88% e especificidade entre 71% até 93,5% utilizando como base a cultura e PCR convencional (Casado Flores et al. 2010; Strachan et al. 2011; Esposito et al. 2013).

Picazo et al., 2013, analisaram 199 amostras de LP e LCR, destas 18,1% foram positivas para *S. pneumoniae* através da cultura, 68,5% pelo TIM e 74,8% qPCR, concluindo que o TIM pode ser útil para amostras de culturas negativas. Nessa pesquisa também foi investigado o desempenho do TIM em comparação com os resultados da qPCR, a sensibilidade foi de 88% e especificidade de 72,5%. Também observou que a presença de falsos negativos do teste TIM se dá devido a alta sensibilidade da qPCR, sugerindo que espécimes negativos pela pesquisa de antígeno devem ser confirmados

através de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, e os falsos positivos foram relacionados com a presença de integrantes do grupo *viridians* nessas amostras.

Perez et al., 2016, avaliaram amostras de 38 LP com cultura negativa e foi analisada a correlação entre o teste TIM e qPCR SYBR-Green, por intermédio do índice Kappa, obtendo-se um valor $K = 0,3 - 0,48$, o que indica uma concordância classificada como sendo de baixa – moderada entre as técnicas. Desta maneira as duas metodologias detectem diferentes produtos provenientes do *S. pneumoniae*, a qPCR (DNA) e TIM (antígeno), a formação e o desaparecimento destes produtos durante o DPP não é bem caracterizado. Ainda que TIM seja uma alternativa promissora na detecção de *S. pneumoniae*, o real papel deste procedimento em espécimes clínicos como LP ainda está por ser definido.

Assim, ponderamos a importância de padronizar e avaliar as novas metodologias propostas para identificação do pneumococo diretamente do líquido pleural proveniente de pacientes com quadros sugestivos de infecção pneumocócica, mas não confirmados pelos métodos convencionais de cultura e isolamento. As metodologias de pesquisas de antígenos e moleculares de amplificação de ácidos nucleicos estão se estabelecendo como alternativas no futuro da microbiologia clínica, contudo o potencial destas ferramentas está criando novos paradigmas e a implementação destas na prática clínica necessita de ampla investigação.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRICH WC, MADHI SA, ADRIAN PV, et al. Use of a Rapid Test of Pneumococcal Colonization Density to Diagnose Pneumococcal Pneumonia **Clin Infect Dis.** 54:601-609, 2012.

ALEMÁN C, ALEGRE J, MONASTERIO J, et al. Association between inflammatory mediators and the fibrinolysis system in infectious pleural effusions. **Clin Sci.** 105:601-7, 2003.

ANDREO F, DOMÍNGUEZ J, RUIZ-MANZANO J, et al. Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural fluid samples by immunochromatographic assay for diagnosis of pneumococcal pneumonia. **Clin Microbiol Infect.** 12:682–684, 2006.

BALFOUR-LYNN IM, ABRAHAMSON E, COHEN G, HARTLEY J, KING S, et al. BTS guidelines for the management of pleural infection in children. **Thorax.** 60:i1e21, 2005.

BARRY AL, JONES RN, THORNSBERRY C. In Vitro Activities of Azithromycin (CP 62,993), Clarithromycin (A-56268; TE-031), Erythromycin, Roxithromycin, and Clindamycin. **Antimicrob Agents Chemother.** 32(5):752-754, 1988.

BARTLETT JG. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. **Clin Infect Dis.** 52(4):296-304, 2011.

BLASCHKE AJ, HEYREND C, BYINGTON CL, et al. Molecular analysis improves pathogen identification and epidemiologic study of pediatric parapneumonic empyema. **Pediatr Infect Dis J.** 30(4):289-94, 2011.

(BTS) British Thoracic Society. Pleural Disease Guideline. **Thorax an international journal of respiratory medicine.** 65(2):1-76, 2010.

BUH GM, TENGS T, LA PAZ JL, et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Anal Bioanal Chem.** 396(6):2023-2029, 2010.

CANTÓ A, BLASCO E, CASILLAS M, et al. Thoracoscopy in the diagnosis of pleural effusion. **Thorax.** 32:550-554, 1977.

CARVALHO MG, TONDELLA ML, MCCAUSTLAND K, et al. Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal. **J Clin Microbiol.** 45:2460-6, 2007.

CASADO FLORES J, MORO MN, BERRON S, et al., Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural effusion for the rapid diagnosis of infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Eur J Pediatr.** 169:581-4, 2010.

_____ (CDC). Atlanta, USA, 2015a. Última revisão da página em 10 de Junho de 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/surveillance.html>> Acesso em: 20.12.2016.

_____ (CDC). Atlanta, USA, 2015b. Última revisão da página em 10 de Junho de 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>> Acesso em: 22.11.2016.

CILLONIZ C, ALBERT RK, LIAPIKOU A, et al. The Effect of Macrolide Resistance on the Presentation and Outcome of Patients Hospitalized for *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**. 191(11):1265–72, 2015.

CILLONIZ C, ARDANUY C, VILA J, TORRES A. What is the clinical relevance of drug-resistant pneumococcus? **Curr Opin Pulm Med**. 22(3):227–34, 2016.

CHANCEY ST, ZÄHNER D, STEPHENS DS. Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. **Future Microbiol**. 7:959–978, 2012.

CHANCEY ST, BAI X, KUMAR N, et al. Transcriptional attenuation controls macrolide inducible efflux and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and in other Gram-positive bacteria containing *mef/mel* (*msr*(D) elements. **PLoS One**. 10(2):e0116254, 2015.

CHIEN YW, JORGE EV, CARLOS GG et al. Density interactions among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx of young Peruvian children. **Pediatr Infect Dis J**. 32(1):72-7, 2013.

COFFEY TJ, DOWSON CG, DANIELS M, SPRATT BG. Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. **FEMS Microbiol Lett**. 110:335-339, 1993.

CORNICK JE, BENTLEY SD. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. **Microbes Infect**. 14:573-583, 2012.

DAVIES HE, DAVIES RJ, DAVIES CW. Management of pleural infection in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. **Thorax**. 65:ii41-53, 2010

DOMINGUES CM, VERANI JR, MONTENEGRO RENOINER EI, DE CUNTO BRANDILEONE MC et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **Lancet Respir Med**. 2(6):464-71, 2014.

DOWELL SF, GARMAN RL, LIU G, LEVINE OS, YANG YH. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. **Clin Infect Dis**. 32:824-5, 2001.

DRIJKONINGEN JJC, ROHDE GGU. Pneumococcal infection in adults: burden of disease. **Clin Microbiol Infect** 20(5):45–51, 2014.

EASTHAM KM, FREEMAN R, KEARNS AM. Clinical features, a etiology and outcome of empyema in children in the north east of England. **Thorax**. 59:522–525, 2004

ESPOSITO S, MARCHESI A, TOZZI AE, et al. DNA bacterial load in children with bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 32(7):877–881, 2013.

- FARRELL D.J, MORRISSEY I, BAKKER S, FELMINGHAM D. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999–2000 study. **J Antimicrob Chemother.** 50:39–47, 2002.
- FELDMAN C, ANDERSON R. Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. **F1000Res.** 14(5):2320, 2016.
- GAY K, STEPHENS DS. Estrutura e divulgação de um elemento de inserção cromossômica que codifica macrólido de efluxo em *Streptococcus pneumoniae* . **J Infect Dis.** 184:56-65, 2001.
- GHOLAMHOSSEINI-MOGHADDAM T, RAD M, MOUSAVI SF, et al. Detection of *lytA*, *pspC*, and *rrgA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children. **Iran J Microbiol.** 7(3):156-60, 2015.
- HAMER DH, EGAS J, ESTRELLA B, MACLEOD WB, et al. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. **Clin Infect Dis.** 34(7):1025-8, 2002.
- HAMM H, LIGHT RW . Parapneumonic effusion and empyema. **Eur Respir J.** 10(5):1150-6, 1997.
- HAJIA M, FARZANEHKHAH M, HAJIHASHEMI B, et al. Real-Time Assay as A Tool for Detecting *lytA* Gene in *Streptococcus pneumoniae* Isolates. **Cell J. Summer.**16:141-146, 2014.
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Real Time Quantitative PCR **Genome Res.** 6:986-994, 1996.
- KELLOGG DE, SNINSKY JJ, KOWK S. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. **Anal. Biochem.** 189:202-208, 1990.
- KIM L, MCGEE L, TOMCZYK S, BEALL B. et al. Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective. **Clin Microbiol Rev.** 29(3):525–52, 2016.
- KLUGMAN KP, MADHI SA, ALBRICH WC. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia. **Clin Infect Dis.** 47:S202–6, 2008.
- KRENKE K, SADOWY E, PODSIADŁY E, HRYNIEWICZ W, et al. Etiology of parapneumonic effusion and pleural empyema in children. The role of conventional and molecular microbiological tests. **Respiratory Medicine.** 116:28-33, 2016.
- KUMARI N, NAVARATNAM P, SEKARAN SD. Detection of *pbp2b* and *ermB* genes in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect Dev Ctries.** 2:193–199, 2008.
- KUROLA P. Role of pneumococcal virulence genes in the etiology of respiratory tract infection and biofilm formation. Oulu-Finland, **Acta Univ Oul D 1098**, 2011.

LETHEULLE J, KERJOUAN M, BÉNÉZIT F, et al. Jouneau Les épanchements pleuraux parapneumoniques : épidémiologie, diagnostic, classification, traitement. **Rev Mal Respir.** 32(4):344-357, 2015.

LI Y, METCALF BJ, CHOCHUA S, LI Z, et al., Penicillin-Binding Protein Transpeptidase Signatures for Tracking and Predicting β -Lactam Resistance Levels in *Streptococcus pneumoniae*. **mBio.** 7(3):756-16, 2016.

LIGHT RW, MCGREGOR MI, LUCHSINGER PC, BALL WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. **Ann Intern Med.** 77:507-513, 1972.

LIGHT RW, GIRARD WM, JENKINSON SG, et al. Parapneumonic effusions. **Am J Med.** 69:507-12, 1980.

LIGHT RW. Diagnostic principles in pleural disease. **Eur Respir J.** 10(2):476-81, 1997.

LIGHT RW. Parapneumonic effusions and empyema. **Proc Am Thorac Soc.** 3(1):75-80, 2006.

LIGHT RW. **Pleural diseases.** 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

LIGHT RW. **Pleural disease.** 6th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2013.

LOW DE. What is the relevance of antimicrobial resistance on the outcome of community acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*? (should macrolide monotherapy be used for mild pneumonia?). **Infect Dis Clin North Am.** 27(1):87-97, 2013.

MARCHI E; LUNDGREN F, MUSSI R. Derrame pleural parapneumônico e empiema Parapneumonic effusion and empyema. **J bras Pneumol.** 32(4)190-196, 2006.

MCAVIN JC, REILLY PA, ROUDABUSH RM, et al. Sensitive and Specific Method for Rapid Identification of *Streptococcus pneumoniae* Using Real-Time Fluorescence PCR. **J Clin Microbiol.** 39:3446-3451, 2001.

MELLROTH P, DANIELS R, EBERHARDT A, et al. LytA, Major Autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, Requires Access to Nascent Peptidoglycan. **J Biol Chem.** 287:11018-1029, 2012.

METCALF BJ, GERTZ REJR, GLADSTONE RA, WALKER H, et al. Strain features and distributions in pneumococci from children with invasive disease before and after 13-valent conjugate vaccine implementation in the USA. **Clin Microbiol Infect.** 22(1)60e9–60e29, 2016.

MITCHELL AM, MITCHELL TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clin Microbiol Infect.** 16:411-8, 2010.

MOHAMED AH, IBRAHIM AJ. Parapneumonic Effusion in Children: An Up-to-Date Review. **Clin Pediatr.** 55(1):10-8, 2016.

NIKOLENKO VV, FELDBLYUM IV, VOROBIEVA NN et al., [EXPERIENCE OF USING IMMUNE CHROMATOGRAPHY TEST FOR DIAGNOSTICS OF PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA]. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.** (3):18-24, 2015.

MONNIER AL, CARBONNELLE E., ZAHAR JR. et al. Microbiological Diagnosis of Empyema in Children: Comparative Evaluations by Culture, Polymerase Chain Reaction, and Pneumococcal Antigen Detection in Pleural Fluids **Clin Infect Dis.** 42 (8):1135-1140, 2006.

NORMARK BH, NORMARK S. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. **Exp Cell Res.** 316(8):1408-14, 2010.

NUORTI JP, WHITNEY CG. Prevention of pneumococcal disease among infants and children-use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep.** 59:1-18, 2010.

PSALLIDAS I, CORCORAN JP, RAHMAN NM. Management of Parapneumonic Effusions and Empyema. **Semin Respir Crit Care Med.** 35(06):715-722, 2014.

PASTEUR I. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de l'âge. **Comptes Rendus.** 92:159-65, 1881.

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.** 86(2):200-4, 2016.

PETERS RP, DE BOER RF, SCHUURMAN T, et al. *Streptococcus pneumoniae* DNA load in blood as a marker of infection in patients with community-acquired pneumonia. **J Clin Microbiol.** 47:3308-12, 2009.

PICAZO JJ, CONTRERAS JR, RIOS E, CULEBRAS E, et al. Rapid diagnosis of invasive pneumococcal disease in pediatric population. **J Microbiol Methods.** 93:116–20, 2013.

PLOTON C, FREYDIERE AM, BENITO Y, et al. *Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema in children: rapid diagnosis by using the BinaxNow immunochromatographic membrane test in pleural fluids. **Pathol Biol.** 54:498–501, 2006.

PRATO R, TAFURI S, FORTUNATO F, MARTINELLI D. Why it is still important that countries know the burden of pneumococcal disease. **Landes Biosci.** 6:918–921, 2010.

PRITCHARD D, DONG S, BAKER JR, ENGLER JA. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. **Microbiology.** 150:2079-2087, 2004.

RAYNER RE, SAVILL J, HAFNER LM, et al. Modified MLVA for Genotyping Queensland Invasive *Streptococcus pneumoniae*. **PLOS ONE.** 10(4):1-15, 2015.

RESTI M, MICHELI A, MORIONDO M, BECCIOLINI L, 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.** 31(6):1266-73, 2009.

RICCI S, GERLINI A, PAMMOLLI A, CHIAVOLINI D, et al. Contribution of different pneumococcal virulence factors to experimental meningitis in mice. **BMC Infect Dis.** 13:444, 2013.

ROMANELLI RMC, THOME EE., FABÍOLA M.C. DUARTE, et al. Diagnóstico das meningites através de fitas reagents. **J.Pediatr.** 77:3, 2001.

ROWAN-LEGG A, BARROWMAN N, SHENOUDA N, et al. Community-acquired lobar pneumonia in children in the era of universal 7-valent pneumococcal vaccination: a review of clinical presentations and antimicrobial treatment from a Canadian pediatric hospital. **BMC Pediatr.** 12:133, 2012.

SAHN SA. Management of complicated parapneumonic effusions. **Am Rev Respir Dis.** 148:813—7, 1993.

SAKAI F, TALEKAR SJ, KLUGMAN KP, VIDAL JE. Expression of *Streptococcus pneumoniae* virulence-related genes in the nasopharynx of healthy children. **PLoS One.** 8:e67147, 2013.

SARTORI AMC, SOAREZ PC, NOVAES HMD. Cost-effectiveness of introducing the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine into the universal immunization in Brazil. **J Epidemiol Community Health.** 66:1–8, 2012.

SAUVAGE E, KERFF F, TERRAK M, AYALA J, CHARLIER P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiol Rev.** 32: 234– 258, 2008.

SCHROEDER, MR, STEPHENS DS. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Front Cell Infect Microbiol.** 6:98, 2016.

SIMELL B, AURANEN K, KAYHTY H, et al. Pneumococcal Carriage Group. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert Rev Vaccines.** 11:841-855, 2012.

SMITH MD, SHEPPARD CL, HOGAN A, HARRISON TG, et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary antigen detection. **J Clin Microbiol.** 47:1046–1049, 2009.

SMITH JA, Mullerworth Empyema thoracis: 14-year experience in a teaching center MH, Westlake GW, Tatoulis J. **Ann Thorac Surg.** 51(1):39-42, 1991.

SOKOLOWSKI JW JR, BURGHER LW, JONES FL JR, PATTERSON JR, SELECKY PA. Guidelines for thoracentesis and needle biopsy of the pleura. This position paper of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, June 1988. **Am Rev Respir Dis.** 1989;140(1):257-8.

SPELLERBERG B, BRANDT C. Streptococcus. In: Versalovic J, Carrole K, Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock D. **Manual of Clinical Microbiology.** 10th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, p 331-349, 2011.

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.** 71:453–456, 2011.

Sistema de Redes de Vigilância de Agentes Bacterianos Responsáveis por Pneumonia e Meningite (SIREVA II) **Informe Regional de SIREVA II, 2011.** Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Washington, D.C.: OPS, 2012. Documentos técnicos. Regulaciones Sanitarias Internacionales, Alerta y Respuesta y Enfermedades Epidémicas (HSD/IR).

STERNBERG GM. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human salina. An experimental research. **National Board of Health Bull.** 2:781-3, 1881.

STRACHAN RE, CORNELIUS A, GILBERT GL, GULLIVER T, et al. A bedside assay to detect *Streptococcus pneumoniae* in children with empyema. **Pediatr Pulmonol** 46(2):179-183, 2011.

TAN TQ. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. **Clin Microbiol Rev.** 25(3): 409-419, 2012.

TOMCZYK S, LYNFIELD R, SCHAFFNER W, et al. Prevention of Antibiotic-Nonsusceptible Invasive Pneumococcal Disease With the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. **Clin Infect Dis.** 62(9):1119–25, 2016.

THOMPSON CC, EMMEL VE, FONSECA EL, et al. Streptococcal taxonomy based on genome sequence analyses. **F1000 Research.** 2:67, 2013.

WATSON K, CARVILLE K, BOWMAN J, JACOBY P, RILEY TV, et al. Kalgoorlie Otitis Media Research Project Team. **Pediatr Infect Dis J.** 25(9):782-90. 2006.

WHATMORE AM, DOWSON CG. The autolysin- encoding gene (*lytA*) of *Streptococcus pneumoniae* displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes. **Infect Immun.** 67:4551–4556, 1999.

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.** 7;34(50):6243-6249, 2016.

WINN W, ALLEN A, JANDA W, KONEMAN E, et al. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 6a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

World Health Organization (WHO). **Pneumococcal vaccines, 2012.** Disponível em:<http://www.who.int/immunization/position_papers/PP_pneumococcal_April_2012_summary.pdf.> Acesso em: 22.11.2016.

3. JUSTIFICATIVA

O *Streptococcus pneumoniae* é um microrganismo de grande importância epidemiológica tanto mundialmente quanto regionalmente, e mais estudos sobre o papel deste agente são necessários na era pós-introdução da vacina pneumocócica. Esse microrganismo é comumente associado a derrames parapneumônicos e empiemas, e nesses casos, as taxas de culturas negativas são muito elevadas. Este fato indica a necessidade da investigação de métodos cultura-independentes que possibilitem o diagnóstico sensível e específico do agente, realizado dentro de um período de tempo que permita tomada de decisão sobre o manejo dos pacientes. Métodos cultura-independentes como PCR já foram avaliados em diversos estudos e os resultados indicam um rendimento superior à cultura, o que também é verificado em teste de detecção de antígenos, como TIM. A correlação entre PCR e TIM é imperfeita e necessita melhor investigação proveniente de estudos adicionais, especialmente para espécimes como LP. Estudos com este objetivo podem melhor definir o papel deste procedimento no manejo de pacientes com derrame pleural, especialmente na era pós-vacina conjugada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar *Streptococcus pneumoniae* em líquido pleural de pacientes menores de 18 anos, através de métodos independentes de cultura e compará-los.

4.2 Objetivos Específicos

Detecção do microrganismo *Streptococcus pneumoniae* de amostras de líquido pleural, através da técnica de PCR real-time.

Determinar a susceptibilidade do *S. pneumoniae* de amostras de líquido pleural, através da técnica de PCR real-time.

Avaliar o desempenho do teste imunocromatográfico para antígeno C do *S. pneumoniae* em líquidos pleurais na investigação da etiologia de derrames parapneumônicos.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 MANUSCRITO

Detection of *Streptococcus pneumoniae* by culture-independent methods and prediction of penicillin resistance in pleural fluid of children. Será submetido à revista, Jornal de pediatria, cujas normas para a publicação estão no link: <https://www.elsevier.com/journals/jornal-de-pediatria/0021-7557/guide-for-authors>

2015 Impact Factor: 2.062

- 1 **Detection of *Streptococcus pneumoniae* by culture-independent methods and**
- 2 **prediction of penicillin resistance in parapneumonic pleural effusion of children**

- 3 **Detection of *S. pneumoniae* in PPF of children**
- 4

5 **Abstract**

6 *Objective:* The increase in the prevalence of β -lactam non-susceptible and
7 multiresistant *Streptococcus pneumoniae* is a global matter of concern in public health. After
8 the use of conjugate pneumococcal vaccines and the implementation of this strategy in
9 children, a significant decrease in the incidence of invasive infections was well documented.
10 Some problems, however, remain and in some studies, an increase in the rates of
11 parapneumonic effusion and empyema was described.

12 *Method:* Detection of *S. pneumoniae* in pleural fluid by culture-independent methods
13 such as immunochromatographic test (IMT) for the detection of pneumococcal antigen and a
14 real time PCR test (qPCR) in the detection of genes *lytA* (agent detection) and *pbp2b* (a
15 marker of sensitivity of β -lactam agents) in pleural fluid samples of children with negative
16 results of culture for the agent.

17 *Results:* We obtained 40 pleural fluid specimens; in 30 the previous use of
18 antimicrobials was documented. In the final analysis, 37 samples were included. IMT and
19 qPCR presented positive results in 26(70.3%) and 27(73.0%) of the samples, respectively,
20 showing a moderate agreement ($K=0.535$) between the two methods. The absence of *pbp2b*,
21 meaning a potential lack of sensibility to β -lactam agents, was verified in 4/27(14.8%) of the
22 samples.

23 *Conclusion:* This study strength the concept of low sensitivity of culture. The methods
24 IMT and qPCR, although with a moderate agreement between then, increase the detection of
25 *S. pneumoniae* in PPE. The use of qPCR combining detection of *lytA* and a marker of β -
26 lactam resistance must be better explored in further clinical studies.

27

28

29

30

31

32

33

34

35 **Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*. Pleural fluid. Immunochromatographic antigen
36 test. Real-time PCR. *lytA* gene. *pbp2b* gene.

37

38 Introduction

39 *Streptococcus pneumoniae* is a common bacterial cause of respiratory disease. Pleural
40 effusion is a common finding in patients with pneumonia and pneumococci remain among
41 the most frequent agent of community acquired pneumonia with parapneumonic effusion
42 (PPE) and empyema. Currently, there are indications that the incidence of pleural infection
43 is increasing in both pediatric and adult populations without a clearly identifiable reason [1,
44 2, 3].

45 Bacteriological cultures of pleural fluid (PF) are indicated for the detection of causative
46 agents and to determine antimicrobial susceptibility. However, pneumonia can be
47 surprisingly difficult to confirm microbiologically in patients with PPE. The growing of
48 pneumococcus is inherently difficult [4], and the previous treatment with antibiotics seems
49 to be the major cause of false negatives. These elements lead to a low rate of positive
50 cultures [5, 6] and only 18% to 33% of cases have the etiological agent confirmed [7, 8]

51 Culture-independent assays are an interesting alternative in PPE. The
52 immunochromatographic membrane test (IMT) (Binax Now *S. pneumoniae* antigen test;
53 Alere, Scarborough, ME, USA) device detects the C polysaccharide wall antigen, with
54 results obtained in 15 minutes. Currently, it is indicated for use in urine (not for children)
55 and cerebrospinal fluid [9,10,11]. In other clinical specimens as PF, the use of this
56 diagnostic device has not been completely investigated. The use of polymerase chain
57 reaction (PCR) is highly indicated [12,13,14]. The *lytA* gene by qPCR detection of *S.*
58 *pneumoniae*, this methodology is particularly useful for culture-negative specimens [15].
59 Several studies have suggested that the molecular technique applied directly to clinical
60 specimen has potential to detect the causative agent and determine the presence of
61 resistance mechanisms [15, 16, 17, 18].

62 Pneumococcal resistance to β -lactams is due to the mutation in complex PBPs (penicillin
63 binding proteins), being the PBP2B the most frequently associated with resistance to
64 penicillin for *S. pneumoniae*; therefore the absence of *pbp2b* gene correspond to penicillin-
65 non-susceptible *S. pneumoniae* [19].

66 The aims of this study were to evaluate the use of culture-independent procedures
67 (immunochromatography and qPCR) in the detection of *S. pneumoniae* and to investigate
68 penicillin-non-susceptible *S. pneumoniae* directly from pleural fluid, through the qPCR
69 assay.

70

71 **Methods**

72 **Patient inclusion and exclusion criteria**

73 This is a prospective study performed from January 2014 to August 2016, evaluating
74 children with PPE and negative microbiology culture of the PF for *S. pneumoniae*, less
75 than 18 years old, who attended the pneumology unit of a pediatric hospital in Porto
76 Alegre, Brazil. Children with diagnosis of pneumonia and undergoing thoracocentesis had
77 their medical records reviewed, and were included in this study. This research study was
78 approved by the ethics committee and the parents gave consent for their children's
79 participation.

80 **PF sample**

81 Convenience samples of PF obtained during thoracocentesis were sent for routine
82 microbiology culture. During the procedure, at least 2 mL of specimens were collected and
83 frozen at -70°C for further analysis. For each child only one sample was included.

84 **Pneumococcal antigen detection**

85 The immunochromatographic membrane test (IMT) (Binax Now *S. pneumoniae* antigen
86 test; Alere, Scarborough, ME, USA) was used to detect pneumococcal antigen in PF. The
87 assay was applied following recommendations of manufacturer for urine.

88 **Pneumococcal qPCR**

89 DNA was extracted from 0.2 mL of the specimens using the QiAamp DNA Mini Kit
90 (QIAGEN; Valencia, CA, USA) as previously described [20], and stored at -20°C .

91 The *lytA* primers, probe and the cycling parameters were previously described [16].
92 Primers and probes for wild-type alleles of *pbp2b*, associated with penicillin susceptibility,
93 were previously designed [15] (table1).

94 The assays with *pbp2b* were carried out in a final 10- μl reaction volume and were
95 performed by use of the TaqMan Universal Master Mix kit (Applied Biosystems), according
96 to the instructions of the manufacturer, with 2.5 μl of sample DNA. using the following
97 cycling parameters: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1
98 min. The concentration for each primer and probe were optimized, and optimal

99 concentration was used. The fluorescence of probe was simulated, wavelength (nm) for
100 normalized absorbance, and optimal fluorescence.

101 The amplification data and threshold cycle (Ct) of *lytA* and *pbp2b* were analyzed by 7500
102 Software v2.0.6 (Applied Biosystems). During each analysis, positive and negative controls
103 were included. *S. pneumoniae* ATCC 49619 was used as positive control. Ultrapure water
104 was used as negative control. All samples were run in duplicate and tested twice for
105 confirmation, before scoring the results.

106 RNase P amplification was conducted as a positive amplification control in order to exclude
107 PF with PCR inhibitors. TaqMan Copy Number Reference Assay RNase P (Applied
108 Biosystems) was conducted following the manufacturer's instructions.

109 **Analysis of patient's records**

110 Patient-s medical history includes, the previous use of antibiotics and results of viral tests
111 (immunofluorescent staining for respiratory virus in nasopharyngeal swab), and
112 microbiological cultures (from PF, and blood) were obtained from patient's charts.

113 **Statistical analysis:**

114 Comparisons between the assays were analyzed using the Kappa coefficient, in the SPSS
115 software, version 21. A P-value < 0.05 was considered to be significant.

116 **Results**

117 **Sample characteristics**

118 Forty children with PPE were enrolled in this study (table 2). The average age was 5 years
119 (range 1 to 17 years), 54% were male, and half patients were attended at emergency room
120 and basic health units, and the other half from regional hospitals. By the time that PFs
121 were collected only three patient had not been treated with antibiotics, seven has no data
122 of antibiotics, of the 30 patient treated with antibiotics 26 (86.6%) had β -lactam antibiotics
123 administered empirically and ampicillin was the most frequently used, 13/40 (32.5%). In
124 only one culture of PF, a positive result was obtained, for *Streptococcus intermedius*, blood
125 cultures were negative for all of the children, and one sample had sputum culture positive
126 for *Moraxella* sp. One children presented a positive result for Adenovirus.

127 **Pneumococcal detection by antigen test and qPCR**

128 In the test for pneumococcal antigen, thirty-nine samples were included and a positive
129 result was observed in 26 (66.6%). All PFs were tested by qPCR for RNase P; three
130 samples did not amplify RNase P and were therefore excluded from the qPCR assays.
131 Thirty-seven PFs were included in qPCR for pneumococcus; of these 27 (73.0%) were
132 positive.

133 The comparison between results of qPCR and antigen test is shown in table 3. Among the
134 two methods, there was a disagreement in seven samples, four were positive by qPCR
135 and negative in antigen test, and three were negative by qPCR and positive in antigen test.
136 A moderate agreement rate was obtained when compared the two methods measure by κ
137 coefficient = 0.535 [P=0,001]. The IMT showed a sensitivity of 85.2% (CI 67% - 94%), and
138 specificity of 70.0% (CI 39% - 89%). In table 4 the samples with conflicting results are
139 shown.

140 **Detection of *pbp2b***

141 All samples positive for pneumococcal qPCR (*lytA*) were evaluated for gene *pbp2b*. The
142 absence of *pbp2b* in 14,8% (4/27). Four samples were negative for *pbp2b*, through this
143 result; these samples are considered non-susceptibility penicillin.

144

145 **Discussion**

146 PPE is a common finding in patients with pneumonia, and more than 60% of children fewer
147 than 5 years with pneumococcal pneumonia develop PPE. Empirical treatment with
148 antibiotics leads to resolution in most patients; however, some children develop severe
149 cases with empyema, necrosis, fistula, and lung abscess. In the last years the rates for
150 PPE and empyema of unknown etiology increased in children with no apparent reasons
151 [21, 22, 23]. The microbiological diagnoses is difficult, culture is slow and can be negative
152 due previous antibiotic therapy. In this study, only three children have not been treated
153 before PF analysis and the qPCR methodology is well characterized for detecting *lytA* of *S.*
154 *pneumoniae* in samples with negative culture [15].

155 When qPCR is available, it is well described that pneumococcus is the most prevalent
156 agent among children. Some studies demonstrated the presence of pneumococcal DNA in

157 PF of 71% of the children with PPE [24]. When culture negative samples were exclusively
158 investigated, the presence of pneumococcus was observed in 81% of PF samples by
159 qPCR [20]. In this study, we observed that culture has a limited sensitivity, 73% of culture
160 negative samples were reported as positive for the agent.

161 Alternatively, the use of culture-independent method IMT is proposed in PF, presenting a
162 promising increment of sensitivity compared with culture. In the present study, analysis of
163 PF samples showed a positive antigen test in 70.3%, with sensitivity of 85.2% and
164 specificity of 70.0% when compared to qPCR. Consistent with these findings, other
165 researchers analyzed 199 samples of PF and CSF, 18.1% positive by culture to *S.*
166 *pneumoniae*, while 68.5% and 74.8% were positive by IMT and qPCR, respectively. In the
167 same study, IMT in PF showed sensitivity of 88% and specificity of 72.5% [10]. Other
168 studies comparing IMT with culture or conventional PCR, showed sensitivity of 83.8% to
169 88%, and specificity 71% to 93.5% [25,26,27]. These findings indicate that analysis of PF
170 by IMT is a useful tool in diagnosis of *S. pneumoniae* in PPE. Few studies compare the
171 performance of IMT and qPCR in culture-negative PF. Until now a fairly agreement
172 between the two methodologies ($k = 0.3$ to 0.48) was demonstrated [20], although in this
173 research we obtained a moderate agreement between the two methods ($k = 0.535$). It
174 seems that the agreement rate was related with the bacterial DNA load an. On the other
175 hand, unlike the previously study that used SYBR-Green dye, in this study we use a probe
176 methodology (FAM dye for *lytA* gene), which theoretically presents greater specificity, and
177 this may have contributed to a higher agreement rate between the qPCR and IMT.

178 In the present study, three in cases presented positives results by IMT and a negative
179 qPCR result. These results can be related to possible cross reaction with some viridians
180 streptococci group, as reported in some studies [6,8]. It is also important to emphasize that
181 in the case with positive culture *S. intermedius* both IMT and qPCR presented negative
182 results, which tells about the specificity of both tests. In addition, four cases positive by
183 qPCR and negative by IMT were obtained, and could be related to high dilution of C
184 polysaccharide wall antigen in PF [8,20]. Therefore, negative results by IMT would require
185 confirmation by a more sensitive test, such as qPCR. However a study indicated that *lytA*
186 qPCR may result in false positive results with *Streptococcus pseudopneumoniae* [28] point
187 out the need for a careful analysis of pneumococcal diagnosis. Nevertheless the *lytA* target
188 is still a suggested culture-independent method to pneumococcal diagnosis.

189 Empirical antibiotic therapy remains a necessary step in the treatment of PPE. However,
190 due the increased global concern about bacterial resistance, pneumococcal resistance
191 could be underestimated. We must consider that most of the data about the prevalence of
192 resistance were generated from epidemiology isolates obtained from cultures of the agent.
193 In the literature, isolates reported as penicillin resistant pneumococcus obtained from
194 community-acquired pneumonia, vary from 8.4–20.7 % [29]. In addition, it is well described
195 that antimicrobial resistance rates are depend on the source region of the isolate. A
196 research conducted in southern of Brazil, with 159 *S. pneumoniae* isolates from invasive
197 sites (only five isolates from PF) among all samples only 4% of the isolates presented
198 higher minimal inhibitory concentrations to β -lactam agents [30]. In our study, we
199 emphasize the need to recognize the presence of a resistance marker associated with
200 penicillin in PPE. We observed the absence of *pbp2b* gene 14.8%, suggesting non-
201 susceptibility to penicillin. This prevalence of non-susceptibility is higher when compared
202 with previous results obtained by culture in our region; however, we must consider that our
203 patients represent a population of higher risk to the development of resistance, since
204 selection due to previous treatment is quite obvious in these children. This finding shows
205 the need of studies that investigate culture negative from pleural fluid samples for *S.*
206 *pneumoniae* resistance to β -lactams. All samples are from debilitated patients and the wide
207 diversity of antimicrobials used is surprising, showing the confusion that the physician has
208 on treatment and necessitate more information about the really situation by patients for
209 correct treatment.

210 In conclusion, culture-independent methods such as IMT and qPCR, although with a
211 moderate agreement between then, increase the detection of *S. pneumoniae* in PPE, also
212 showing these methods can improve the ability to detect pneumococci in PF negative
213 culture. The use of qPCR combining detection of *lytA* and a marker of β -lactam resistance
214 must be better explored in further clinical studies.

215

216

217

218

219

220

221

222 **References**

- 223 [1] Li ST, Tancredi DJ. Empyema hospitalizations increased in US children despite
224 pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*. 2010;125: 26–33.
- 225 [2] Grijalva CG, Nuorti JP, Zhu Y, Griffin MR. Increasing incidence of empyema
226 complicating childhood community-acquired pneumonia in the United States. *Clin Infect*
227 *Dis*. 2010;50:805e13.
- 228 [3] Mohamed AH, Ibrahim AJ. Parapneumonic Effusion in Children: An Up-to-Date
229 Review. *Clin Pediatr*. 2016;55(1):10-8.
- 230 [4] Petti CA, Woods CW, Reller LB *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive
231 blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. *J*
232 *Clin Microbiol*.2005;43(5):2510-2.
- 233 [5] Hendrickson DJ, Blumberg DA, Joad JP, Jhawar S, McDonald RJ. Five-fold in-crease in
234 pediatric parapneumonic empyema since introduction of pneumococcal conjugate vaccine.
235 *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:1030e2.
- 236 [6] Ploton C, Freydiere AM, Benito Y, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema
237 in children: rapid diagnosis by using the BinaxNow immunochromatographic membrane
238 test in pleural fluids. *Pathol Biol*. 2006;54:498–501.
- 239 [7] Menezes-Martins LF, Menezes-Martins JJ, Michaelsen VS, Aguiar BB, Ermel T.
240 Machado DC. Diagnosis of parapneumonic pleural effusion by polymerase chain reaction
241 in children. *J Pediatr Surg*. 2005;40:1106–10.
- 242 [8] Picazo JJ, Contreras JR, Rios E, Culebras E, et al. Rapid diagnosis of invasive
243 pneumococcal disease in pediatric population. *J Microbiol Methods*. 2013;93:116–20.
- 244 [9] Charkaluk ML, Kalach N, Mvogo H, Dehecq E, Magentie H, et al. Assessment of a rapid
245 urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of
246 pneumococcal infection in children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;55:89–94.
- 247 [10] Navarro D, Garcia-Maset L, Gimeno C, Escribano A, Garcia-de-Lomas J. Performance
248 of the BinaxNow *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay for diagnosis of
249 pneumonia in children with underlying pulmonary diseases in the absence of acute
250 pneumococcal infection. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4853–5.
- 251 [11] Samra Z, Shmueli H, Nahum E, Paghis D, Ben-Ari J. Use of the NOW *Streptococcus*
252 *pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal
253 meningitis. *Diagn. Microbiol Infect Dis*. 2003;45, 237–240.
- 254 [12] Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, et al. Molecular detection
255 methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic
256 sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus*
257 *pneumoniae* in Italian children. *J Med Microbiol*. 2008; 57:1205–1212.
- 258 [13] Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, Hogan A, George RC. Autolysin-targeted
259 LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus*
260 *pneumoniae* DNA in clinical samples. *J Med Microbiol*. 2004;53:189-95.

- 261 [14] Smith, M.D., Sheppard, C.L., Hogan, A., Harrison, T.G., Dance, D.A., Derrington, P.,
262 et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections in adults with bacteremia and
263 community-acquired pneumonia: clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary
264 antigen detection. J Clin Microbiol. 2009;47:1046–1049.
- 265 [15] Srinivasan V, Du Plessis M, Beall BW, McGee L. Quadriplex real-time polymerase
266 chain reaction (lytA, mef, erm, pbp2b(wt)) for pneumococcal detection and assessment of
267 antibiotic susceptibility. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71:453–456
- 268 [16] Carvalho MG, Tondella ML, Mccaustland K, et al. Evaluation and Improvement of
269 Real-Time PCR Assays Targeting lytA, ply, and psaA Genes for Detection of
270 Pneumococcal. J Clin Microbiol. 2007;45:2460-6.
- 271 [17] Harris KA, Turner P, Green EA, Hartley JC. Duplex real-time PCR assay for detection
272 of *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples and determination of penicillin
273 susceptibility. J Clin Microbiol. 2008; 46: 2751–2758
- 274 [18] Kumari N, Navaratnam P, Sekaran SD. Detection of pbp2b and ermB genes in clinical
275 isolates of *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dev Ctries. 2008;2:193–199.
- 276 [19] Smith AM, Klugman KP. Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-
277 resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother.
278 1995;39(4):859-67.
- 279 [20] Perez VP, Caierão J, Fischer GB, Dias CAG, d'Azevedo PA. Pleural effusion with
280 negative culture: a challenge for pneumococcal diagnosis in children Diagn Microbiol Infect
281 Dis. 2016;86(2):200-4.
- 282 [21] Sakran W, Ababseh Zel D, Miron D, Koren A. Thoracic empyema in children: clinical
283 presentation, microbiology analysis and therapeutic options. J Infect Chemother. 2014;
284 20:262e5.
- 285 [22] Byington CL, Korgenski K, Daly J, Ampofo K, Pavia A, et al. Impact of the
286 pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumonic empyema. Pediatr
287 Infect Dis J. 2006;25:250–4.
- 288 [23] Gupta R, Crowley S. Increasing paediatric empyema admissions. Thorax 2006;
289 61:179–80.
- 290 [24] Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, et al. Molecular analysis improves pathogen
291 identification and epidemiologic study of pediatric parapneumonic empyema. Pediatr Infect
292 Dis J. 2011;30(4):289-94.
- 293 [25] Casado Flores J, Nieto Moro M, Berron S, Jimenez R, Casal J. Usefulness of
294 pneumococcal antigen detection in pleural effusion for the rapid diagnosis of infection by
295 *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Pediatr. 2010;169:581–4.
- 296 [26] Strachan RE, Cornelius A, Gilbert GL, Gulliver T, Martin A, McDonald T, et al.
297 Wainwright and A. Jaffe. A bedside assay to detect *Streptococcus pneumoniae* in children
298 with empyema. Pediatr Pulmonol. 2011;46(2):179-183.

299 [27] Esposito S, Marchese A, Tozzi AE, Rossi GA, Da Dalt L, et al. DNA bacterial load in
300 children with bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia. Eur J Clin
301 Microbiol Infect Dis. 2013; 32(7):877-81.

302 [28] Simões AS, Tavares DA, Rolo D, Ardanuy C, Goossens H, et al. *lytA*-based
303 identification methods can misidentify *Streptococcus pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect
304 Dis. 2016;85(2):141-8.

305 [29] Torres A, Blasi F, Peetermans WE, et al.:The aetiology and antibiotic management of
306 community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. Eur J Clin
307 Microbiol Infect Dis. 2014;33(7):1065–79.

308 [30] Mott M, Caierão J, Rosa da cunha G, et al. Susceptibility profiles and correlation with
309 pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal
310 conjugate vaccine in Brazil. Int. J. Infect. Dis. 2014;20:47-51.

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

Table 1- Primers and probes used in qPCR assays

Target	Sequence (5'-3')	nM	Nucleotide position	GenBank no.	References
<i>lytA</i> -F	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA	200	1841014	AE005672	Carvalho et al., 2007
<i>lytA</i> -R	TCGTGCGTTTTAATTCCAGCT	200	1840961		
<i>lytA</i> -Probe	5'-FAM-TGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG -3'-BHQ1	250	1840985		Srinivasan et al.,2011
<i>pbp2b</i> -F	CTGTTTGGACCATATAGGTATTT	600	1494906	AE007317	
<i>pbp2b</i> -R	CAATTCTTGGTATACTCAGGCT	600	1494976		
<i>pbp2b</i> -Probe	5'-Cy5-TCCAGAGCTTGGACCGCTGTGATA-3'-BHQ3	250	1494938		

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

Table 2 - General characteristics of children with PPE

Characteristic	n = 40
Age (years)	5 (± 3)*
Male sex	22 (54%)
Admission	
Emergency	20 (50%)
Other	20 (50%)
Previous antibiotics	
Yes	30 (75%)
No	3 (7.5%)
No data	7 (17.5%)
Amoxicillin	2 (5%)
Amoxicillin+Clavulanate	3 (7.5%)
Ampicillin	13 (32.5%)
Ampicillin+Sulbactam	1 (2.5%)
Azithromycin	3 (7.5%)
Cefepime	2 (5%)
Ceforuxime	2 (5%)
Cefotaxime	1 (2.5%)
Ceftriaxone	6 (15%)
Chloramphenicol	3 (7.5%)
Ciprofloxacin	1 (2.5%)
Clarithromycin	1 (2.5%)
Clindamycin	2 (5%)
Oxacillin	3 (7.5%)
Penicillin	5 (12.5%)
Piperacillin+Tazobactam	1 (2.5%)
Vancomycin	6 (15%)
Bacteriologic analysis of pleural fluid	
Positive culture (<i>S. intermedius</i>)	1 (2.5%)
<i>lytA</i> qPCR of pleural fluid	
Positive	27 (73%)**
Antigen test (IMT) of pleural fluid	
Positive	26 (66.6%***)

* Average and standard deviation

** Of 37 samples analyzed.

*** Of the 39 samples analyzed.

354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366

Table 3 - Detection of *S. pneumoniae* by IMT and qPCR

Antigen test (IMT)	<i>lytA</i> qPCR		Total
	Negative	Positive	
Negative	7 (18.9%)	4 (10.8%)	11 (29.7%)
Positive	3 (8.1%)	23 (62.2%)	26 (70.3%)
Total	10 (27.0%)	27 (73.0%)	37 (100%)

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

Table 4 – Records and results of conflicting samples

Identification	Culture of PF	Antigen test	<i>lytA</i> qPCR (Ct)	Antibiotic
PF23	-	-	26	AMP
PF30	-	-	16	AMP
PF33	-	-	20	AMX, SAM
PF37	-	-	15	ND
PF03	-	+	-	AMX, AZI, CRO, PEN
PF24	-	+	-	CRO, OXA, VAN
PF32	-	+	-	AMX, SAM
PF36	<i>S. intermedius</i>	-	-	CIP

AMC = amoxicillin+clavulanate; AMI= Amikacin ;AMP = ampicillin; AMX = amoxicillin; AZI = azithromycin; CFR= chloramphenicol; CIP=ciprofloxacin; CLA = Clarithromycin; CLI = clindamycin; CPM = cefepime; CRO = ceftriaxone; CRX = ceforuxime; CTX = cefotaxime; ND = no data; OXA = oxacillin; PEN = penicillin; PPT= piperacillin+tazobactam; SAM = ampicillin+sulbactam; VAN = vancomycin

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- qPCR detectou DNA de *Streptococcus pneumoniae* em 72% de amostras de líquido pleural com cultura negativa;
- qPCR detectou o gene de susceptibilidade a penicilina (*pb2b*) nas amostras com DNA de *Streptococcus pneumoniae*;
- A utilização de testes de pesquisa de antígenos por imunocromatografia em LP contribui para determinação da etiologia em amostras com cultura negativa, no entanto, resultados negativos devem ser confirmados por qPCR.

7. PERSPECTIVAS

- Aperfeiçoar a técnica PCR em tempo real, para o formato multiplex, detectando *lytA*, *ermB*, *mef*, *pbp2b* em uma mesma reação;
- Determinar a sorotipagem do *Streptococcus pneumoniae* dessas amostras e assim relacionar os sorotipos com amostra de derrames pleurais com cultura negativa.
- Determinar os sorotipos *Streptococcus pneumoniae* mais prevalentes através da técnica de PCR em tempo real.
- Avaliar o qPCR para *lytA* e *pbp2b* no manejo clínico de crianças com derrame parapneumônico.

ANEXO A – Resultado complementar: Perfil genotípico de resistência aos macrolídeos *Streptococcus pneumoniae* de líquidos pleurais

INTRODUÇÃO

O *Streptococcus pneumoniae*, em crianças é um dos microorganismos mais frequente em doenças invasivas como o derrame parapneumônico (DPP) (Eastham et al., 2004). Para o tratamento, ainda se utiliza a penicilina como antimicrobiano de primeira escolha, já os macrolídeos começaram a ser utilizados como alternativa antimicrobiana ou adjunta ao tratamento. Porém, a resistência aos macrolídeos disseminou-se conjuntamente com os PNSP (pneumococo não suscetível à penicilina). Devido ao aparecimento e aumento de isolados de *S. pneumoniae* não suscetível aos macrolídeos, tornou-se uma preocupação pela possibilidade de falha terapêutica (Low et al., 2013; Cilloniz et al., 2016). Um mesmo isolado pode conter múltiplos mecanismos de resistência e também a sobreposição de níveis da MIC; portanto, a utilização da MIC como único determinante de resistência, nem sempre é confiável (Farrell et al., 2002). Os testes moleculares apresentam-se como uma boa alternativa para diagnóstico diretamente de amostras, identificando o microorganismo e sua susceptibilidade aos antimicrobianos (Srinivasan et al., 2011).

METODOLOGIA

40 amostras de LP provenientes de hospital pediátrico de Porto Alegre, destas, em 27 foi confirmada a presença do gene *lytA*, indicando a presença de *S. pneumoniae*. Tais espécimes foram incluídas no estudo para detecção dos genes de resistência aos macrolídeos (*ermB* e *mef*). Utilizamos *primers* e *probes* previamente descrito (Srinivasan et al., 2011), porém com algumas modificações nos fluoróforos (tabela A1).

Tabela A1 *Primers* e *probes* usadas no ensaio de qPCR

Alvo	Sequência (5'-3')	nM	Posição do Nucleotídeo	No. GenBank.	Referências
<i>mef-F</i>	TATGGAGCTACCTGTCTGGA	300	291	AF227520,	Srinivasan
<i>mef-R</i>	GGTACTAAAAGTGGCGTAACC	600	375	U83667	et al., 2011
<i>mef-Probe</i>	5'-JOE-CCGTAGCATTGGAACAGCTTTTC-3'-BHQ1	250	333		
<i>ermB-F</i>	CTTGGATATTCACCGAACAC	300	766	AB111455	Srinivasan
<i>ermB-R</i>	TTGGTTTAGGATGAAAGCAT	300	844		et al., 2011

Para o ensaio com gene *mef* foi utilizado TaqMan® Universal Master Mix kit (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, o volume final da reação de 10 µl e 2.5 µl de DNA. Utilizando os seguintes parâmetros: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Para o gene *ermB* foi utilizado SYBR-Green® dye, com GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation; Madison, WI, USA), a reação foi de acordo com informações do fabricante com 12 µL de volume final de reação e 2 µL de DNA. Foram utilizados os seguintes parâmetros: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os dados de amplificação e *threshold cycle* (Ct) do *mef*, e a curva de melting do *ermB* foram analisados pelo 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems). Os controles positivos das reações foram isolados de *S. pneumoniae* provenientes de amostras clínicas, com *mef* e *ermB* previamente confirmados por PCR convencional. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e repetidas através de uma nova reação para confirmação dos resultados. Os produtos com Ct 30 ou mais, foram analisados através de gel de eletroforese para confirmação da amplificação.

RESULTADOS

O perfil genotípico de resistência aos macrolídeo de 27 líquidos pleurais está especificado na tabela 2. 62% (17/27) foram positivos para o *ermB* e 29% (5/27) para o *mef*. As amostras LP9, LP12, LP16, LP27 e LP37 foram positivas para os dois genes (Tabela A2). Algumas amostras confirmadas pela análise do gel de eletroforese, devido aos resultados com Cts elevados estão expostas na Figura 1.

Tabela A2 – Perfil genotípico de resistência aos macrolídeos *Streptococcus pneumoniae* proveniente de LP.

Genes detectados qPCR	Nº de amostras
Somente <i>ermb</i>	12
Somente <i>mef</i>	0
<i>ermb</i> e <i>mef</i>	5
Negativas	10
Total	27

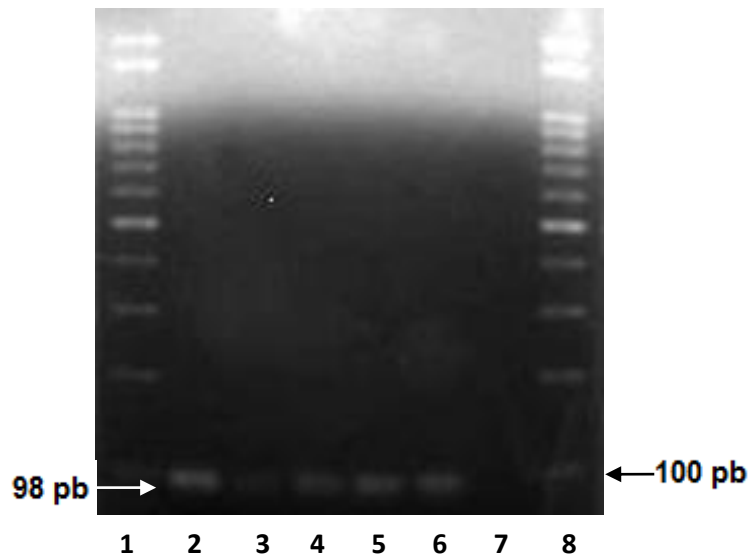


Figura A1 – Amplicons do resultado da reação de qPCR para o *ermB* (98pb). Analisados no gel 1,5% de agarose. (1) Marcador de 100pb; (2) Controle positivo; (3) LP25 ct=34; (4) LP22 ct=31; (5) LP28 ct=30; (6) LP13 ct=30; (7) Controle negativo; (8) Marcador de 100pb

DISCUSSÃO

Os macrolídeos não são a primeira escolha de tratamento para *S. pneumoniae*, porém o surgimento da resistência aos antimicrobianos gerou uma crescente preocupação global e muitos estudos tem analisado essa problemática em isolados *S. pneumoniae*.

Em uma revisão da literatura na Europa observou que a resistência aos macrolídeos varia entre 14.7 e 17.1 % de isolados de *S. pneumoniae* provenientes de pneumonia adquirida da comunidade (CAP) (Torres et al., 2014). Já é bem descrito que a resistência aos antimicrobianos é dependente a região de origem do espécime. Segundo SIREVA 2012, isolados de *S. pneumoniae* de sítios de doença invasiva, provenientes de diversos locais do Brasil, observou a resistência a eritromicina de 15.7% para crianças menores de 5 anos. Em uma pesquisa no sul do Brasil, também com isolados de *S. pneumoniae* de sítios de doença invasiva, foi observada prevalência de 8.2% de resistência à eritromicina. Destas amostras 46.1% foram positivas somente para o gene *mefA* e 30.8% somente o gene *ermB* e 23% para os dois genes, resultados obtidos através da PCR convencional (Mott et al., 2014).

Srinivasan et al 2011, estudo com 180 isolados de *S. pneumoniae*, positivos para *lytA*, 96,7% das amostras com MIC não sensível a eritromicina e/ou clindamicina também foram

positivas para os genes de *ermB* e/ou *mef*, detectados através da técnica e qPCR. O estudo empregou a mesma metodologia em qPCR diretamente no líquido cefalorraquidiano (LCR) e líquido pleural (LP), e mesmo em amostras com cultura negativa, demonstraram claramente a capacidade de detecção do *S. pneumoniae* e a susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

No nosso estudo enfatizamos a necessidade de detecção dos mecanismos de resistência dos macrolídeos em DPP. Contudo, a prevalência de amostras contendo genes de resistência aos macrolídeos (62%) superou em muitos valores observados em outros estudos obtidos de isolados oriundos de culturas. É nosso entender que estes dados merecem uma melhor análise, evidenciando ainda a necessidade de mais investigações com resultados obtidos diretamente de espécimes como líquido pleural. Sequenciamento do DNA amplificado seria necessário para confirmação destes achados.

Os ensaios moleculares independentes de cultura propostos para determinação da susceptibilidade aos macrolídeos do *S. pneumoniae* diretamente do material clínico proveniente de pacientes com quadros sugestivos de infecção pneumocócica, nos possibilita uma boa alternativa na identificação da resistência do agente e proporcionou dados imperceptíveis na rotina clínica e laboratorial.

REFERÊNCIAS

CILLONIZ C, ARDANUY C, VILA J, TORRES A. What is the clinical relevance of drug-resistant pneumococcus? **Curr Opin Pulm Med.** 22(3):227–34, 2016.

EASTHAM KM, FREEMAN R, KEARNS AM, Clinical features, a etiology and outcome of empyema in children in the north east of England. **Thorax.** 59:522–525, 2004.

FARRELL D.J, MORRISSEY I, BAKKER S, FELMINGHAM D. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999–2000 study. **J Antimicrob Chemother.** 50:39–47, 2002.

LOW DE. What is the relevance of antimicrobial resistance on the outcome of community acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*? (should macrolide monotherapy be used for mild pneumonia?). **Infect Dis Clin North Am.** 27(1):87-97, 2013.

MOTT M, CAIERÃO J, ROSA DA CUNHA G, et al. Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases.** 20:47-51, 2014.

Sistema de Redes de Vigilância de Agentes Bacterianos Responsáveis por Pneumonia e Meningite (SIREVA II) **Informe Regional de SIREVA II, 2011**. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Washington, D.C.: OPS, 2012. Documentos técnicos. Regulaciones Sanitarias Internacionales, Alerta y Respuesta y Enfermedades Epidémicas (HSD/IR).

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**. 71:453–456, 2011.

TORRES A, BLASI F, PEETERMANS WE, et al.:The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 33(7):1065–79, 2014.

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido.

Detecção e susceptibilidade do microrganismo *Streptococcus pneumoniae* de amostras e isolados de doença invasiva

Prezado (a), _____

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa sobre características do *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococo) porque o seu filho (a) apresenta manifestações clínicas de doença que podem estar associadas à presença deste microrganismo. Este é um dos principais agentes causadores de doença grave (invasiva) na população infantil. Portanto é importante que venhamos a conseguir informações sobre sua detecção rápida e seus mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos.

Este documento foi elaborado para fornecer todas as informações que julgamos necessárias e aquelas que o (a) Sr. (Sra.) julgue importante acerca desta pesquisa. Antes de autorizar é extremamente importante que você saiba a razão pela qual a pesquisa está sendo desenvolvida e o que ela irá envolver. Você pode questionar os pesquisadores com quantas perguntas julgar necessário para que tenha uma plena compreensão do que irá ocorrer.

Por que é importante fazer esta pesquisa? (Objetivo da pesquisa)

Com esta pesquisa pretendemos avaliar a presença de Pneumococo em pacientes pediátricos portadores de quadros suspeitos de infecção invasiva localizadas no pulmão ou no sistema nervoso, por uma técnica de biologia molecular denominada PCR quantitativo. Este é um exame muito mais sensível que as técnicas convencionais de cultura e possibilita também identificar características de resistência antimicrobiana do agente infeccioso.

Quais procedimentos estarão atrelados à participação na pesquisa?

Nenhum procedimento além daqueles já indicados pela sua condição clínica serão realizados. Por apresentar manifestações clínicas de doença invasiva, é de extrema importância que realize colheita de líquido espinhal (se suspeita de meningite) ou líquido pleural (se suspeita de empiema). Tais exames são de extrema importância para nortear o seu tratamento. Uma vez que você realize colheita de um destes materiais biológicos, separaremos uma pequena quantidade em frasco individualizado, para análise

complementar laboratorial pela técnica de PCR quantitativo. Portanto, o estudo não tem nenhuma modificação no tratamento que seu filho (a) deve vir a receber.

Riscos e Desconfortos

Não há nenhum risco adicional, dor ou sofrimento atrelado ao desenvolvimento desta pesquisa. Todos os procedimentos a serem realizados estão indicados pela condição clínica presente. A colheita de exames (líquido espinhal ou pulmonar) faz parte do tratamento indicado para as manifestações clínicas associada à doença de seu filho (a).

Os benefícios que poderá obter:

Ao participar desta pesquisa você aumentará a possibilidade de determinação da presença de Pneumococo como agente infeccioso associado às manifestações clínicas presentes. Além disso, poderá obter informações adicionais sobre resistência bacteriana atrelada a presença do Pneumococo. Tais informações podem ser úteis na determinação do melhor esquema de antibiótico a ser utilizado e na própria determinação das características deste agente infeccioso na comunidade.

Custos

É importante lembrar que não haverá gastos nem ganhos financeiros com a participação nesta pesquisa.

Privacidade / Confidencialidade

Os pesquisadores se comprometem em utilizar os dados coletados no estudo somente para fins da pesquisa. Não haverá divulgação de imagens. Você não poderá ser identificado pelos testes.

Quem já revisou este estudo?

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde, que revisa todos os estudos desenvolvidos por seus pesquisadores. O mesmo aprovou este documento e todo o projeto relacionado ao desenvolvimento do estudo que você está sendo convidado a participar.

Contatos para maiores informações

Você receberá uma cópia deste documento (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE) e poderá solicitar quaisquer informações adicionais, a qualquer momento do estudo, entrando em contato com a Dra. Kauana Pizzutti pelo telefone (55) 81317199.

Você ainda poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde, pelo telefone (51) 3303-8804 se você tiver qualquer dúvida com relação aos seus direitos de participação na pesquisa.

Ao fornecer meu consentimento assinando este formulário, eu concordo que fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada. Minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e esclareci todas as minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar.

Declaro que concordo com os termos desse documento (TCLE), e AUTORIZO minha participação no estudo acima citado.

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador a ser preenchido no momento do consentimento

___/___/___

Data

ANEXO C - Parecer de aprovação do CEP do HCSA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Detecção e susceptibilidade do *Streptococcus pneumoniae* de amostras e isolados de doença invasiva

Pesquisador: Cicero Armidio Gomes Dias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51805315.1.0000.5683

Instituição Proponente: Hospital da Criança Santo Antônio - Santa Casa/RS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.487.130

Apresentação do Projeto:

Detecção do *Streptococcus pneumoniae* através da técnica de PCR em lactentes até 18 meses no Hospital Criança Santo Antônio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Detectar o microrganismo *Streptococcus pneumoniae* através da técnica de PCR real-time de amostras hospitalares de Porto Alegre, RS.

Objetivos Específicos

Detectar o microrganismo *S. pneumoniae* diretamente de amostras clínicas através da técnica de PCR real-time.

Determinar os sorotipos de *S. pneumoniae* de amostras e isolados clínicos através da técnica de PCR real-time.

Avaliar a resistência aos antimicrobianos dessas amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A investigação e o desenvolvimento do projeto não trará nenhuma modificação na terapêutica e tratamento dos pacientes envolvidos assim como a coleta fará parte do protocolo de investigação

Endereço: Av. Independência, 155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

HOSPITAL DA CRIANÇA SANTO ANTÔNIO



Continuação do Parecer: 1.487.130

estabelecido no serviço de emergência do hospital.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante e factível e está bem estruturado do ponto de vista metodológico e de análise de dados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão em conformidade com as normas estabelecidas para apresentação de projetos do Hospital da Criança Santo Antônio.

Recomendações:

n/c

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram esclarecidas e atendidas .

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_685910_E1.pdf	24/03/2016 13:08:16		Aceito
Outros	estrategiaTCLE.pdf	24/03/2016 13:05:35	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	Adenoas.pdf	24/03/2016 13:03:31	Kauana Pizzutti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLELP.docx	24/03/2016 13:01:54	Kauana Pizzutti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLELCR.docx	24/03/2016 13:01:34	Kauana Pizzutti	Aceito
Folha de Rosto	folharostoHCST.pdf	10/12/2015 18:34:06	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	riscosbeneficios.pdf	07/12/2015 14:22:15	Kauana Pizzutti	Aceito

Endereço: Av. Independência,155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

HOSPITAL DA CRIANÇA SANTO ANTÔNIO



Continuação do Parecer: 1.487.130

Outros	puplicdados.pdf	07/12/2015 14:21:14	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	onus.pdf	07/12/2015 14:17:44	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	dadosprontua.pdf	07/12/2015 14:16:48	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	confidencialidade.pdf	07/12/2015 14:15:39	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	CAPinsc.pdf	07/12/2015 14:14:25	Kauana Pizzutti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CAPsetor.pdf	07/12/2015 14:13:47	Kauana Pizzutti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOASSMENOR.docx	07/12/2015 14:12:51	Kauana Pizzutti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	07/12/2015 14:12:24	Kauana Pizzutti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCEP.pdf	07/12/2015 14:11:50	Kauana Pizzutti	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	dadosmateriais.pdf	07/12/2015 14:10:46	Kauana Pizzutti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	rpelaarea.pdf	07/12/2015 14:09:53	Kauana Pizzutti	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	07/12/2015 14:08:05	Kauana Pizzutti	Aceito
Orçamento	orc.docx	07/12/2015 14:07:31	Kauana Pizzutti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Independência,155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cepchsa@santacasa.tche.br

HOSPITAL DA CRIANÇA
SANTO ANTÔNIO



Continuação do Parecer: 1.487.130

PORTO ALEGRE, 11 de Abril de 2016

Assinado por:
Catiane Zanin Cabral
(Coordenador)

Endereço: Av. Independência, 155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

ANEXO D - Parecer de aprovação do CEP da UFCSPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção e susceptibilidade do microrganismo *Streptococcus pneumoniae* de amostras e isolados de doença invasiva

Pesquisador: Cicero Armidio Gomes Dias

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50463215.2.0000.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.332.971

Apresentação do Projeto:

Detecção e susceptibilidade do microrganismo *Streptococcus pneumoniae* de amostras e isolados de doença invasiva

Objetivo da Pesquisa:

Detectar o microrganismo *S. pneumoniae* diretamente de amostras clínicas através da técnica de PCR real-time. Detecção o microrganismo *S. pneumoniae* diretamente de amostras clínicas por BinaxNOW® *S. pneumoniae* Antigen Card Determinar os sorotipos de *S. pneumoniae* de amostras e isolados clínicos através da técnica de PCR real-time. Perfil Fenotípico de Suscetibilidade Antimicrobiana

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há nenhum risco adicional, dor ou sofrimento atrelado ao desenvolvimento desta pesquisa. Todos os procedimentos a serem realizados estão indicados pela condição clínica presente. A colheita de exames (líquido cefalorraquidiano ou pulmonar) faz parte do tratamento indicado para as manifestações clínicas associada à doença do paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância para a área de estudo que poderá contribuir para Aumentar a possibilidade de determinação da presença do microrganismo *S. pneumoniae* como agente infeccioso associado

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.050-170

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.332.971

às manifestações clínicas específicas. Além disso, poderá obter informações adicionais sobre resistência bacteriana atrelada a presença do *S. pneumoniae*. Tais informações podem ser úteis na determinação do melhor esquema de antimicrobiano a ser utilizado e na própria determinação das características deste agente infeccioso na comunidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_608341.pdf	23/10/2015 10:43:26		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	23/10/2015 10:40:58	Kauana Pizzutti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Kauana2.docx	15/10/2015 15:59:55	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	UFCSPA_relatorio.pdf	15/10/2015 15:54:23	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	riscos_beneficios.pdf	15/10/2015 15:50:49	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	dados.pdf	15/10/2015 15:47:12	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	onus.pdf	15/10/2015 15:46:10	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	dados_prontuarios.pdf	15/10/2015 15:43:31	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	confidencialidade.pdf	15/10/2015 15:41:39	Kauana Pizzutti	Aceito
Outros	CAPinsc.pdf	15/10/2015 15:40:21	Kauana Pizzutti	Aceito
Declaração de	usomateriais.pdf	15/10/2015	Kauana Pizzutti	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: 1.332.971

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	usomateriais.pdf	15:25:14	Kauana Pizzutti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CAP_setor.pdf	15/10/2015 15:24:49	Kauana Pizzutti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	responsavelpelaarea.pdf	15/10/2015 15:16:00	Kauana Pizzutti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	UFCSPA_responsavelpelo setor.pdf	15/10/2015 15:09:59	Kauana Pizzutti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_ASSENTIMENTO_MENOR.do Cx	15/10/2015 15:09:04	Kauana Pizzutti	Aceito
Orçamento	o.docx	15/10/2015 15:07:10	Kauana Pizzutti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCEP.pdf	15/10/2015 15:05:21	Kauana Pizzutti	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	15/10/2015 15:02:00	Kauana Pizzutti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 23 de Novembro de 2015

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