

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**VERIFICAÇÃO DOS ÍNDICES DE RESISTÊNCIA DO
Streptococcus pneumoniae E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA
DAS CEPAS RESISTENTES A ERITROMICINA**

Fábio Tito Weber
Farmacêutico – UFRGS

Março de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**VERIFICAÇÃO DOS ÍNDICES DE RESISTÊNCIA DO
Streptococcus pneumoniae E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA
DAS CEPAS RESISTENTES A ERITROMICINA**

Fábio Tito Weber
Farmacêutico – UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre (RS)
Março de 2008

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa da Costa pela orientação e confiança.

Aos meus pais pelas críticas construtivas, elogios e incentivos nos momentos de desânimo.

Aos colegas de laboratório Albino Magalhães e Claiton Pens pela amizade e companheirismo.

À amiga Margarone Fialho de Oliveira pela solicitude em momentos de incerteza.

À Yamar Eiras Baptista pelo inestimável auxílio nos momentos finais da dissertação.

E a todos os demais que conheci e convivi nesse período importante e de transição da minha vida.

VERIFICAÇÃO DOS ÍNDICES DE RESISTÊNCIA DO *Streptococcus pneumoniae* E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS CEPAS RESISTENTES À ERITROMICINA

Autor: Fábio Tito Weber
Orientadora: Marisa da Costa
Co-orientador: Cícero Dias

RESUMO

O *Streptococcus pneumoniae* é responsável por altos índices de morbidade e mortalidade pelo mundo. No início do século XX os percentuais de morte causados por essa bactéria atingiram mais de 80%. Com o surgimento da antibioticoterapia, principalmente com o uso da penicilina, o combate ao pneumococo tornou-se mais efetivo. A partir da década de 1980, o combate a essa bactéria começou a ser mais difícil, devido ao aumento da resistência pneumocócica aos antimicrobianos. No Brasil e, de forma geral, no mundo todo são verificados percentuais crescentes de resistência pneumocócica. Tais percentuais variam de um país para outro e, até mesmo, dentro de um mesmo país significativamente. Dessa forma, faz-se necessário o monitoramento desses índices de resistência para se ter conhecimento da efetividade dos antimicrobianos comumente usados contra o pneumococo. A resistência do pneumococo tem origem cromossomal. No caso da eritromicina, os genes de resistência são denominados *erm(B)* e *mef(A/E)*. Como ocorre com os percentuais de resistência, a prevalência dos genes citados também muda de acordo com a região pesquisada. Assim como a verificação da resistência, é importante a pesquisa da origem da resistência antimicrobiana, no caso dos genes *erm(B)* e *mef(A/E)*. O presente trabalho verificou a resistência pneumocócica em 64 cepas obtidas de diferentes hospitais de Porto Alegre. Os resultados obtidos foram de 28% de resistência para a penicilina (8% de resistência plena e 20% de resistência intermediária), 15% de resistência plena para a eritromicina, 18% para a tetraciclina (14% intermediárias), 3% plenamente resistentes para o cloranfenicol, 68% de resistência para a associação trimetropima/sulfametoxazol (64% plenamente resistentes), 1% plenamente resistente à ceftriaxona e 0% de resistência à vancomicina. Pôde-se relacionar a presença dos genes com a resistência à eritromicina. O *erm(B)* mostrou uma predominância maior nessas cepas. Foram 6 cepas com o gene *erm(B)*, 2 com o *mef(A/E)*, uma amostra apresentou os dois genes e apenas uma não apresentou nenhum. Os resultados obtidos nesse trabalho estão relacionados ao período de 2004 e 2005, situando Porto Alegre em relação ao nível de resistência do pneumococo e seus genes de resistência à eritromicina. Cabe salientar que pesquisas subseqüentes devem ser feitas para o monitoramento da resistência do *S. pneumoniae* e dos determinantes dessa resistência.

VERIFICATION OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE RESISTANCE INDICES AND GENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF THE ERYTHROMYCIN RESISTANT STRAINS

Autor: Fábio Tito Weber
Adviser: Marisa da Costa
Co-adviser: Cícero Dias

ABSTRACT

The *Streptococcus pneumoniae* is responsible for high indices of morbidity and mortality around the world. In the beginning of century XX the percentages of death caused by these bacteria had reached more than 80%. With the appearance of the antibiotal therapy, mainly with the use of penicillin, the combat to pneumococcus has become more effective. From the decade of 1980, the combat against these bacteria started to be more difficult due to the increase of the pneumococcal resistance to antimicrobials. In Brazil and, of general form, in the entire world has been verified the increase of pneumococcal resistance. Such percentages vary significantly from a country to another one and even inside of the same country. In this way, it's necessary to have knowledge of the effectiveness of common antibiotics used against pneumococcus through the monitoriment of these resistance's indices. The resistance of pneumococcus originates from the chromosome. In the case of the erythromycin, the resistance genes are called *erm(B)* and *mef(A/E)*. As it occurs with the percentages of resistance, the prevalence of these genes also change in accordance with the searched region. As well as the verification of the resistance, the research of the origin of the antimicrobial resistance is important, in the case of the genes *erm(B)* and *mef(A/E)*. The present work verified the pneumococcal resistance in 64 strains from different hospitals of Porto Alegre. The results were 28% of resistance for penicillin, 14% of resistance for erythromycin, 18% of resistance for tetracyclin, 3% of resistance for chloranphenicol, 68% of resistance for resistance trimetropim/sulfametoxazole association, 1% of resistance ceftriaxone and 0% of resistance to the vancomycin. The presence of the genes with the erythromycin resistance could be related. The *erm(B)* showed a high preponderance in these strains. There were 6 *erm(B)* gene strains, 2 *mef(A/E)*, a sample with the two genes and only one with none gene. It's important to point out that the values found in this work hasn't been constant and subsequent research must be made to monitor the *S. pneumoniae* resistance.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
RELAÇÃO DE TABELAS	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
2.2. Antimicrobianos e Resistência	13
2.2.1. Penicilina	13
2.2.2. Eritromicina	17
2.2.3. Tetraciclina	20
2.2.4. Cloranfenicol	20
2.2.5. Ceftriaxona	21
2.2.6. Trimetropima/Sulfametoxazol	21
2.2.7. Vancomicina	22
2.3. Verificação da Resistência	22
2.4. Genes de Resistência	23
2.5. Pesquisa dos Genes de Resistência	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Locais de realização do Trabalho	29
3.2. Origem e Identificação das Cepas	29
3.3. Teste de Suscetibilidade	29
3.4. Pesquisa dos genes <i>erm</i>(B) e <i>mef</i>(A/E) nos <i>S. pneumoniae</i>	30
3.5. Multiresistência	31
3.6. Controle de Qualidade	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Identificação	33
4.2. Antimicrobianos	33
4.2.1. Penicilina	33
4.2.2. Eritromicina	34
4.2.3. Tetraciclina	35
4.2.4. Cloranfenicol	36
4.2.5. Vancomicina	36
4.2.6. Ceftriaxona	36
4.2.7. Trimetroprima/Sulfametoxazol	37
4.3. Multiresistência	37
4.4. Genes de Resistência à Eritromicina	39
5. CONCLUSÃO	45
6. BIBLIOGRAFIA	47

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Índices atuais de resistência pneumocócica à penicilina nos países europeus.....	15
2. Índices de resistência do pneumococo à penicilina nos Estados Unidos.....	16
3. Resistência pneumocócica à penicilina na América Latina.....	17
4. Percentuais de resistência pneumocócica à eritromicina em países asiáticos.....	18
5. Índices de resistência pneumocócica à eritromicina em países europeus.....	20
6. Índices de resistência pneumocócica à tetraciclina em diferentes países.....	20
7. Índices de resistência do pneumococo à ceftriaxona em diferentes países.....	21
8. Índices de resistência pneumocócica à associação trimetropima/sulfametoxazol em diferentes países.....	22
9. Prevalência mundial dos genes de resistência para a eritromicina.....	27
10. Concentrações dos antimicrobianos pesquisados e interpretação das concentrações inibitórias mínimas (MICs).....	30
11. Oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas seqüências de nucleotídeos utilizadas nesse trabalho.....	31
12. Padrão de resistência das cepas resistentes à penicilina com relação a tetraciclina e a eritromicina.....	39
13. Concentrações inibitórias mínimas (MICs) das cepas pesquisadas e suas correspondentes classificações.....	40
14. Concentração inibitória mínima (MIC) das amostras resistentes à eritromicina.....	43

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Índices de resistência à penicilina na Espanha.....	15
2. Número de antimicrobianos aos quais as cepas foram resistentes..	38
3. Resultado da PCR com cepas de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a eritromicina utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes <i>erm(B)</i> e <i>mef(A/E)</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS

MIC: concentração inibitória mínima

erm: mecanismo de resistência à eritromicina

mef: mecanismo de efluxo

S: cepa sensível

I: cepa com resistência intermediária

R: cepa plenamente resistente

PCR: reação em cadeia da polimerase

NA: não apresentou

Pen: penicilina

Eri: eritromicina

Tet: tetraciclina

Clo: cloranfenicol

Trim/Sulf: trimetoprima/sulfametoxazol

Van: vacomicina

Cef: ceftriaxona

PBP: proteína ligadora de penicilina

1. INTRODUÇÃO

O *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria Gram positiva que tem como característica apresentar-se em forma de diplococo. Também chamada de pneumococo, essa bactéria é uma das principais causadoras de infecções como pneumonia, bacteremia, sinusite, otite média entre outras. O combate ao pneumococo era difícil e apresentava elevados percentuais de morte em humanos até o surgimento da penicilina e demais antimicrobianos. A partir de então, o tratamento de doenças causadas pelo pneumococo tornou-se significativamente facilitado e tais percentuais caíram bruscamente.

No início da década de 1980, com o aumento da quantidade de cepas resistentes à penicilina, à eritromicina e a outros antimicrobianos, o *S. pneumoniae* voltou a ser uma bactéria de controle dificultado. Os índices de resistência começaram a crescer em vários países, inclusive no Brasil. Tais índices variam consideravelmente entre as nações e dentro de um mesmo país. Tendo em vista a variação da sensibilidade das bactérias, em especial do pneumococo, faz-se necessário o monitoramento constante da resistência dessa bactéria para avaliar a capacidade do uso dos antimicrobianos que podem ser usados para combatê-lo. A penicilina é o antimicrobiano padrão para o tratamento de infecções pneumocócicas. Porém, em alguns casos, esse antibiótico não pode ser usado, seja por resistência da cepa ou pelo portador apresentar alguma impossibilidade de usar esse β -lactâmico. Nesses casos a eritromicina é uma importante alternativa de tratamento. Além disso, a eritromicina é um antimicrobiano de amplo espectro e é usada em várias situações no tratamento empírico dos portadores do pneumococo. Assim como ocorre com a penicilina, cepas apresentando resistência à eritromicina têm sido observadas.

O *S. pneumoniae* não apresenta plasmídeos carreadores de genes de resistência, nem age diretamente sobre os antimicrobianos para ser resistente a eles. A resistência do pneumococo aos antimicrobianos é de origem cromossomal, sendo que e a eritromicina não é exceção a esse fato. Principalmente dois genes estão envolvidos na resistência pneumocócica à eritromicina, o gene *erm(B)* e o *mef(A/E)*. O primeiro codifica uma metilase que metila o sítio de ligação dos macrolídeos, dificultando a ligação do antibiótico ao seu alvo. O segundo gene, *mef(A/E)*, confere à bactéria a capacidade de expulsar o antimicrobiano do citosol, o chamado mecanismo de efluxo. Assim como variam os percentuais de

resistência, varia também a predominância dos genes citados nas cepas resistentes à eritromicina. Em termos gerais, a Europa apresenta a maioria das cepas com o gene *erm*(B) e na América do Norte existe predominância dos genes *mef*(A/E).

Em vista do exposto acima, o presente trabalho tem como seus objetivos a verificação dos índices de resistência do *S. pneumoniae* a vários antimicrobianos usados no tratamento das infecções causadas pelo pneumococo, verificar se a resistência à eritromicina está relacionada com os genes *erm*(B) e *mef*(A/E) e a proporção que eles apresentam dentre as cepas resistentes. Uma vez de posse desses dados, o presente trabalho situará Porto Alegre em termos mundiais com relação a resistência pneumocócica e os percentuais dos dois genes citados nas cepas resistentes à eritromicina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Streptococcus pneumoniae*

O *S. pneumoniae* caracteriza-se por ser uma bactéria Gram positiva, que varia de 0,5 a 1,2µm de diâmetro, com forma lanceolada ou oval. A bactéria pode ser observada de forma isolada, formando pequenas cadeias ou ser encontrada na forma de diplococos, que é a sua formação mais comum. Outra característica estrutural é a presença de cápsula nas cepas patogênicas, a qual ajuda na proteção da bactéria contra a ação dos macrófagos. Existem também cepas que não apresentam cápsula, as quais, em geral, são facilmente fagocitadas pelas células de defesa do hospedeiro. A presença de cápsula afeta também a morfologia colonial do pneumococo, sendo que as capsuladas apresentam colônias relativamente grandes e mucóides. Já as colônias das não capsuladas são menores e com superfície plana (Holt *et al.*, 1994).

A cápsula é uma estrutura importante para a defesa do pneumococo e ela protege, ao menos momentaneamente, a bactéria do sistema imune do hospedeiro. Ela é usada para classificar as cepas pneumocócicas em quarenta e seis sorogrupos e em mais de noventa sorotipos. Essa classificação em diferentes sorotipos baseia-se nas diferentes estruturas presentes na cápsula, principalmente os polissacarídeos. Existem cepas pneumocócicas que não apresentam cápsula as quais são chamadas de não-tipáveis (Henrichsen, 1995). As diferentes composições apresentadas pelas cápsulas conferem diferentes potenciais de invasão à bactéria, ou seja, determinados sorotipos são mais comuns causadores de certas infecções que outros. O mesmo ocorre com relação à aquisição de resistência, alguns sorotipos têm maior capacidade de adquirir genes de resistência que outros. Como exemplo de sorotipos, podemos citar o 1, 3, 14, 5, 6B, 14, 19A e 23F, que são os mais comuns do pneumococo (Sjöstrom *et al.*, 2007; Inostrosa *et al.*, 2007).

A importância do estudo do *S. pneumoniae* deve-se ao fato de que ele é responsável por diversas patologias humanas freqüentes, e muitas vezes graves, como pneumonia, meningite e bacteremia, entre outras infecções menos comuns como artrite e endocardite (Hausdorff *et al.*, 2005). Inicialmente o pneumococo foi identificado como patógeno pulmonar, como seu próprio nome sugere. Posteriormente sua presença começou a ser verificada em outras

infecções, como meningite. As infecções pneumocócicas são bastante comuns em crianças, principalmente ocasionando otite média (Hausdorff *et al.*, 2005).

Em vista disso, o pneumococo torna-se uma bactéria responsável por grandes índices de morbidade e de mortalidade em todo mundo, principalmente em crianças e idosos. A bactéria pode estar presente na microbiota nasofaríngea de indivíduos sem causar doença. Apesar de não originar nenhuma ação patológica no hospedeiro, tal presença como comensal na microbiota nasofaríngea é de grande importância para o estudo do *S. pneumoniae*. Isso porque é como comensal que ele tem contato com outras bactérias, possibilitando a troca de material genético (Ara *et al.*, 1994).

2.2. Antimicrobianos e Resistência

2.2.1. Penicilina

O tratamento das infecções pneumocócicas é baseado na administração de antibióticos, destacando-se o uso da penicilina e da eritromicina. A penicilina é o antibiótico padrão no tratamento contra o pneumococo, enquanto a eritromicina é usada normalmente de forma empírica devido ao seu amplo espectro. Como praticamente todas as bactérias patogênicas, o pneumococo vem adquirindo resistência aos antimicrobianos usados contra ele, sendo que os índices dessa resistência variam mundialmente e até mesmo dentro de um mesmo país de forma significativa (Monaco *et al.*, 2005). O surgimento da resistência está relacionado com a idade diminuída do portador, hospitalização recente, o tempo que a pessoa ficou internada e também falência renal (Sessegolo *et al.* 2003). Em geral, pessoas que vivem em comunidade ou em contato muito próximo com portadores, têm maior possibilidade de ter o pneumococo na sua microbiota nasofaríngea e também de serem, essas cepas, resistentes a antimicrobianos. Isto justifica-se pelo fato de que se um indivíduo for portador de uma cepa resistente, o contato próximo com outras pessoas favorecerá a disseminação dessa cepa, principalmente se o contato for com crianças, uma vez que elas são as principais portadoras de pneumococo (Jones *et al.*, 2003; Ghaffar *et al.*, 1999).

O fator considerado como o mais importante para o desenvolvimento e seleção de cepas resistentes é o uso freqüente de antimicrobianos. Foi observado que tanto crianças como adultos que fizeram tratamento com antimicrobianos,

num período inferior a seis meses, têm possibilidade significativamente maior de possuírem cepas resistentes do que pessoas que não fizeram uso de antimicrobianos nesse período (Hofman *et al.*, 1998). Esse fato pode ser verificado nos países que tem um consumo elevado de antimicrobianos, os quais apresentam, geralmente, maiores índices de resistência que outros onde o uso é menor (Mera *et al.*, 2006). O último fator que favorece o desenvolvimento de resistência no *S. pneumoniae*, é que essa bactéria pode estar presente na microbiota nasofaríngea do indivíduo estando, nesse caso, em contato com outras bactérias e possibilitando a aquisição de genes de resistência, sendo essas bactérias do mesmo gênero ou não do pneumococo (Ghafar *et al.*, 1999).

O primeiro caso significativo de resistência pneumocócica foi relatado em uma paciente australiana, de 25 anos de idade em 1967 (Hasman & Bullen, 1967 apud Klugman, 1990). A partir desses relatos, a presença de cepas resistentes começaram a ser observadas esporadicamente em todo o mundo. Durante a década de 1980 os índices de resistência começaram a aumentar significativamente e a terapia contra o pneumococo começou a apresentar-se mais complexa em algumas partes do mundo, até tornar-se uma questão de preocupação global.

Um dos primeiros países que apresentou níveis significativos de resistência pneumocócica à penicilina foi a França. Em 1984 já apresentava um índice relativamente alto, de 13%, e passou para 48% em 1990 (Klugman, 1990). O índice de resistência continuou aumentando, atingindo um nível bastante elevado em 1998, quando 65% das cepas estudadas apresentaram resistência ao antimicrobiano. Nos anos seguintes, a resistência a penicilina ficou estável apresentou uma pequena queda a partir de 2001, com redução significativa das cepas com resistência plena à penicilina (Sarkis *et al.*, 2006). Fenômeno semelhante ocorreu na Espanha, porém com índices menores de resistência (Figura 1) (Mera *et al.*, 2006).

Cabe salientar que tanto a Espanha como a França são países com um elevado consumo de antimicrobianos, incluindo a penicilina. Na tabela 1, podem-se verificar índices de resistência recentes à penicilina em outros países da Europa.

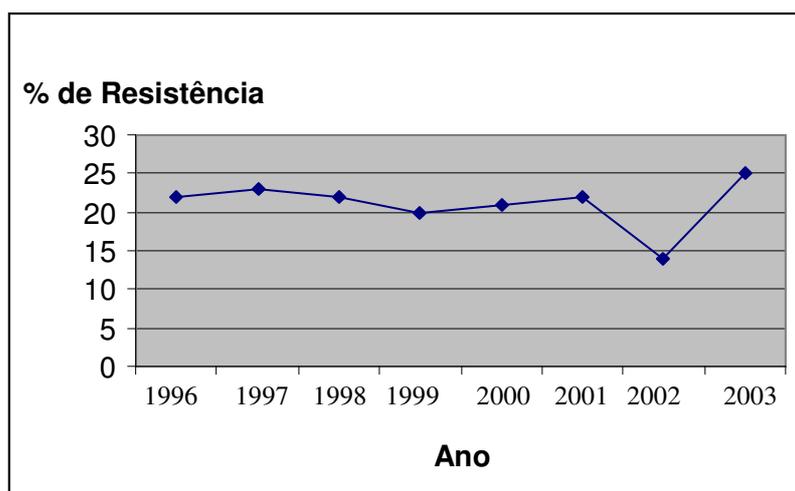


Figura 1. Índices de resistência à penicilina na Espanha. Fonte: Mera *et al.*, 2006.

Tabela 1. Índices atuais de resistência pneumocócica à penicilina nos países europeus.

País	% de Resistência	Referência
Alemanha	2,4	Mera <i>et al.</i> , 2006
Grécia	34,7	Poulakou <i>et al.</i> , 2007
Itália	16,8	Sahn <i>et al.</i> , 2000
Reino Unido	4,3	Mera <i>et al.</i> , 2006

Nos Estados Unidos da América, a exemplo do que ocorreu em outras partes do mundo, começou a crescer significativamente a resistência pneumocócica à penicilina a partir de 1980. Dada a sua grande extensão territorial, os Estados Unidos apresenta uma grande variação dos índices de resistência do pneumococo. Essas diferenças nas regiões norte-americanas podem ser observadas na tabela 2 (Karchmer, 2004).

Em vista dessa variação elevada na suscetibilidade pneumocócica, estudos de monitoramento em cada região são necessários para a verificação do comportamento do pneumococo perante os antimicrobianos, em especial à penicilina nos Estados Unidos.

Mesmo sendo a Austrália o país onde primeiro se verificou resistência do *S. pneumoniae*, não é a localidade onde se encontram os maiores índices de resistência à penicilina. Nesse país da Oceania são observados índices constantes e não muito elevados de resistência pneumocócica ao β -lactâmico, apresentando uma média de 24% entre os anos de 2000 e 2002 (Felmingham *et*

al., 2007). O país onde se encontra os maiores índices de resistência à penicilina é a África do Sul, onde detectou-se 74% de resistência à penicilina, superando os índices apresentados por países asiáticos que na década de 1990 apresentavam os maiores índices de resistência pneumocócica à penicilina do mundo (Felmingham *et al.*, 2007).

Tabela 2. Índices de resistência do pneumococo à penicilina nos Estados Unidos.

Região Norte-americana	% de Resistência
Noroeste	17,3
Sudoeste	36,4
Sul	32,5

Fonte: Karchmer, 2004.

Apesar de não terem mais os maiores índices de resistência à penicilina, os países asiáticos continuam apresentando valores elevados de resistência pneumocócica para esse antimicrobiano. Já nos anos de 1990, foi verificado valor acima de 70% de resistência na Tailândia. Valor esse muito elevado, mesmo sendo um estudo realizado apenas em crianças, que são um grupo de pessoas que normalmente apresentam cepas com resistência maior (Chiou *et al.*, 1998). Atualmente os países da Ásia como um todo, apresentam resistência de aproximadamente 63%, sendo esse valor constante nos últimos três anos (Felmingham *et al.*, 2007).

Na América Latina tem se observado um crescimento nos índices de resistência do *S. pneumoniae* à penicilina. Países como a Argentina, México, Uruguai, Chile e Colômbia apresentavam índices de resistência menores que 10% até 1995. Mas, a identificação de cepas resistentes começou a crescer significativamente em todos os países durante a década de 1990. A partir de então, começou a ser verificada resistência pneumocócica superior a 20% na maioria dos países citados. Na Tabela 3, pode-se verificar os percentuais de alguns países da América Latina (Camargos *et al.*, 2006).

O Brasil teve seu primeiro caso de resistência à penicilina em 1988 na cidade de São Paulo (Marques *et al.*, 1988). Durante a década de 1990 pouca literatura sobre o assunto foi publicada no Brasil, porém sabe-se que no começo da década os índices de sensibilidade diminuída (somatório das cepas resistentes e intermediárias à penicilina) giravam por volta de 5% (Brandileone *et al.*, 1998).

No final da década, em estudos realizados nas regiões sul e sudeste do país, observou-se uma estabilidade da resistência em torno de 13%. Porém, no ano 2000, ocorreu uma elevação nos valores, passando a 17,6% de cepas com suscetibilidade diminuída à penicilina, sendo esse percentual mantido nos dois anos posteriores superado em 2002 e 2003. Em vista desses dados, tem-se o ano de 2000 como um marco para o Brasil em relação a resistência pneumocócica, pois o patamar ficou significativamente mais elevado (Brandileone *et al.*, 2005). Com relação ao Rio Grande do Sul, mais especificamente Porto Alegre, a resistência ao pneumococo não muda significativamente com relação a dados publicados nacionalmente. Em Porto Alegre observou-se resistência de 22,8% à penicilina, sendo a maior parte de cepas com resistência intermediária, 16,3% contra 6,5% de cepas plenamente resistentes (Zettler *et al.*, 2006).

Tabela 3. Resistência pneumocócica à penicilina na América Latina.

País	Ano	% de Resistência à Penicilina
Argentina	1993	9,9
	2005	21,5
Chile	1994	5,0
	2003	18,8
Colômbia	1994	3,1
	2001	25,0
México	1995	22,2
	2001	23,2
Uruguai	1994	5,6
	2001	20,4

Fonte: Camargos *et al.*, 2006.

2.2.2. Eritromicina

A eritromicina é o principal representante dos antimicrobianos da classe dos macrolídeos, assim como a claritromicina e a azitromicina. Ela é alternativa no combate ao *S. pneumoniae* quando a penicilina não é ativa e também em tratamentos empíricos, devido ao seu grande espectro. A eritromicina é um antimicrobiano de baixo custo o que muitas vezes é um importante fator na escolha para o combate aos microrganismos, principalmente em países com uma

população de baixo poder econômico como o Brasil. Por esses motivos é que se faz necessário o controle da suscetibilidade do pneumococo a esse macrolídeo. Assim, como ocorre com a penicilina e outros antimicrobianos usados, os índices de resistência do pneumococo à eritromicina são bastante variáveis pelo mundo. Esses índices variam grandemente entre as nações (Zbiden, 2006).

Os maiores índices de resistência do pneumococo do mundo são verificados no Oriente. Nesse continente é comum serem observados percentuais de resistência superiores a 80% e, mesmo assim, com alguns países apresentando crescimento nos seus percentuais de resistência (Tabela 4) (Song *et al.*, 2004).

Tabela 4. Percentuais de resistência pneumocócica à eritromicina em países asiáticos.

País	% do 1º período ¹	% do 2º período ²
China	35,2	75,6
Coreis do Sul	74,6	85,1
Formosa	89,1	87,2
Hong Kong	NA ³	76,5
Índia	0,0	1,5
Malásia	3,0	36,8
Singapura	28,0	52,9
Sri Lanka	17,0	10,3
Tailândia	32,5	21,9
Vietnam	65,2	88,3

¹Amostras analisadas entre 1996 e 1997; ²Amostras analisadas entre 1998 e 2000; ³Período não analisado.

Fonte: Song *et al.*, 2004.

A África do Sul apresenta índices de resistência um pouco menores se comparados com os países asiáticos, mas também bastante elevados. Cerca de 54% das cepas apresentam susceptibilidade diminuída à eritromicina, sendo esses percentuais de resistência constantes nos últimos três anos (Felmingham *et al.*, 2007).

A Europa é um continente onde se observa uma acentuada variação nos índices de resistência à eritromicina. O país que tem maior índice de resistência do pneumococo é a França e menores índices podem ser observados

no Reino Unido. De forma geral, é observado na Europa uma estabilização nos índices de resistência, principalmente nos países com índices um pouco mais elevados (Tabela 5).

Tabela 5. Índices de resistência pneumocócica à eritromicina em países europeus.

País	% de Resistência à Eritromicina	Referência
Alemanha	19,9	Reinert <i>et al.</i> , 2004
França	56,8	Decousser <i>et al.</i> , 2004
Hungria	43,0	Dobay <i>et al.</i> , 2004
Itália	40,9	Marchese <i>et al.</i> , 2005
Portugal	20,7	Zbinden, 2005
Reino Unido	14,2	Livermore <i>et al.</i> , 2006

Nos Estados Unidos, assim como ocorre com a penicilina, os índices de resistência variam muito nas várias regiões do país. Em números globais, a resistência à eritromicina nas cepas norte-americanas é de 27,9%, variando de 48,2 a 16,7% dentro do país. Assim como ocorre em vários países europeus, a resistência à eritromicina nos Estados Unidos está estável em valores gerais um pouco abaixo de 30% (Farrel & Jenkins, 2004; Jenkins *et al.*, 2005).

A América Latina apresenta uma média de resistência à eritromicina relativamente baixa. Porém, tais índices apresentam crescimento constante nos últimos anos. Na Argentina, por exemplo, em 1998 verificou-se resistência de 9% e aumentou significativamente para 16% em cepas coletadas durante o ano de 2002 (Bonofiglio *et al.*, 2005). No Brasil, no final da década de 1990 foi verificado índice de resistência de 4,3% a esse antimicrobiano e já no início da década de 2000 o índice de resistência à eritromicina aumentou para 10% (Mendonça-Souza, 2004). Os maiores índices foram encontrados no México e na Venezuela, onde 25 e 20%, das cepas, respectivamente, mostraram suscetibilidade diminuída para a eritromicina (Castanheira *et al.*, 2004). Índices pequenos foram observados na Colômbia, apenas 3,3% em cepas hospitalares (Reyes *et al.*, 2007).

2.2.3. Tetraciclina

A tetraciclina é um antimicrobiano comumente usado como alternativa no combate ao pneumococo quando o uso da penicilina não é indicado. Isso

ocorre principalmente quando o paciente é alérgico a esse antimicrobiano. A tetraciclina também pode ser usada como uma importante alternativa em caso de resistência à penicilina. O pneumococo normalmente apresenta níveis de resistência à tetraciclina menores que ao β -lactâmico (Whitney *et al.*, 2000; Riedel *et al.*, 2007). Porém, isso não significa índices sempre baixos para esse antimicrobiano, como ocorre na Índia, onde foi verificado um índice bastante elevado (Goial *et al.*, 2007). Porém, o mais comum é serem observados valores menores pelo mundo (Tabela 6). No Brasil, a resistência à tetraciclina foi verificada em 32%, o que é um valor elevado para o tratamento do pneumococo sem uma análise prévia da resistência da cepa a ser combatida (Levin *et al.*, 1996).

Tabela 6. Índices de resistência pneumocócica à tetraciclina em diferentes países.

País	% de Resistência	Referência
Brasil	32,0	Levin <i>et al.</i> , 1996
Dinamarca	1,1	Riedel <i>et al.</i> , 2007
Estados Unidos	10,5	Whitney <i>et al.</i> , 2000
França	41,1	Riedel <i>et al.</i> , 2007
Índia	61,2	Goial <i>et al.</i> , 2007

2.2.4. Cloranfenicol

O cloranfenicol é um antimicrobiano que não é usado na rotina do combate ao pneumococo, uma vez que ele pode apresentar problemas ao hospedeiro devido a sua toxicidade, principalmente hepática e renal. Essa característica do cloranfenicol limita seu uso, mas não o elimina como alternativa no combate ao pneumococo.

O fato de o cloranfenicol não ser usado de forma intensa, como os outros antimicrobianos, diminui a sua exposição, reduzindo a seleção de cepas resistentes. Isso faz com que os índices de resistência pneumocócicos sejam reduzidos e tornam o cloranfenicol uma importante alternativa em casos de necessidade. Pode-se observar essa pequena resistência ao cloranfenicol na Turquia (5,3%), nos Estados Unidos (5% de cepas resistentes), no México (4%) e no Brasil (3,2%) (Sener *et al.*, 2007, Whitney *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 1997; Magalhães & Pinto, 2003).

2.2.5. Ceftriaxona

A ceftriaxona é um antimicrobiano mais recente. Devido a isso, essa quinolona de 3ª geração está no mercado a menos tempo e, por consequência, teve menos contato com o pneumococo que os demais antimicrobianos presentes nesse trabalho. Devido a isso, o pneumococo apresenta à ceftriaxona índices pequenos de resistência, com raras exceções (Tabela 7). Alguns países têm índices elevados, porém nada que se compare com os maiores valores vistos para outros antimicrobianos, como a penicilina e a eritromicina, para os quais foram observados valores superiores a 80% de resistência (Song *et al.*, 2004; Felmingham, 2007). Poucos estudos foram feitos no Brasil com relação a resistência pneumocócica à ceftriaxona, porém, sabe-se que até o início da década de 1990, ainda não haviam sido verificadas cepas resistentes a esse antimicrobiano em cepas brasileiras.

Tabela 7. Índices de resistência do pneumococo à ceftriaxona em diferentes países.

País	% de Resistência	Referência
Brasil	0,0	Levin <i>et al.</i> , 1996
Egito	6,0	Wasfy <i>et al.</i> , 2005
Formosa	38,5	Hsueh <i>et al.</i> , 1999
França	1,0	Sarkis <i>et al.</i> , 2006
Grécia	1,0	Poulakou <i>et al.</i> , 2007
México	3,0	Miranda <i>et al.</i> , 1997

2.2.6. Trimetoprima/Sulfametoxazol

A associação de uma sulfa, o sulfametoxazol, com um derivado imidazólico, a trimetoprima, é a única associação medicamentos analisada nesse trabalho. O efeito sinérgico desses dois antimicrobianos é muito mais potente do que se forem usados individualmente, devido a resistência desenvolvida pelo pneumococo. Apesar da associação ser mais eficiente do que os antimicrobianos usados sozinhos, a resistência em níveis significativos a ela está presente pelo mundo, principalmente em Formosa (Tabela 8). Aqui no Brasil, no final da década de 1990, verificou-se 32,0% de resistência. Um estudo feito em crianças do estado de Minas Gerais mostrou resistência superior a 58% de cepas resistentes, o que

mostra um indicativo de crescimento da resistência do pneumococo para essa associação (Magalhães & Pinto, 2003).

Tabela 8. Índices de resistência pneumocócica à associação trimetoprima/sulfametoxazol em diferentes países.

País	% de Resistência	Bibliografia
Brasil	58,1	Magalhães & Pinto, 2003
Estados Unidos	57,6	Sahm <i>et al.</i> , 2007
Formosa	87,0	Hsueh <i>et al.</i> , 1999
Itália	42,1	Riedel <i>et al.</i> , 2007
Noruega	8,3	Riedel <i>et al.</i> , 2007

2.2.7. Vancomicina

A vancomicina é um glicopeptídeo considerado como a última alternativa de controle de microrganismos patógenos Gram positivos. Devido a isso, considera-se a vancomicina um medicamento de reserva, o qual somente é usado hospitais e em casos onde seu uso é imprescindível, como por exemplo, em casos de infecção por bactéria multiresistente (Novak *et al.*, 1999). Pelo fato de ser um antimicrobiano relativamente novo, de alto poder antibacteriano e ter o seu emprego criteriosamente analisado, o pneumococo não apresenta resistência a esse antimicrobiano e até hoje não foi relatado nenhum caso de *S. pneumoniae* resistente à vancomicina no mundo. Porém, têm-se relatado casos de cepas que são tolerantes à vancomicina, ou seja, cepas que não se reproduzem na presença desse antimicrobiano, mas permanecem viáveis durante a ação da vancomicina (Sung *et al.*, 2006).

2.3. Verificação da Resistência

A verificação do nível de resistência de uma cepa pode ser feito de diversas maneiras. Uma delas é o Método da Difusão em Ágar, o qual é mais comumente chamado de Método de Kirb-Bauer. Esse método baseia-se na difusão do antimicrobiano em meio sólido a partir de um disco contendo o antimicrobiano. A presença do antimicrobiano sobre o meio vai fazer com que ele se difunda no ágar e crie um gradiente de concentração ao redor do disco, havendo maior concentração do antimicrobiano nas regiões mais próximas do disco e menores nas regiões mais distantes. A presença do antimicrobiano no

meio vai fazer com que ocorra a inibição do crescimento da bactéria em estudo, gerando um halo. De acordo com o tamanho desse halo a cepa será classificada em plenamente resistente, resistente intermediária ou sensível ao antimicrobiano (NCCLS, 2004).

O outro método é o Método da Diluição em Placa. Esse é um método mais trabalhoso e financeiramente mais oneroso que o Método de Kirb-Bauer. Porém, ele é um método quantitativo, fornecendo a Concentração Inibitória Mínima (MIC) da cepa ao antimicrobiano em estudo. O MIC é obtido a partir da semeadura de uma suspensão padronizada da bactéria em estudo em placas com concentrações crescentes e definidas dos antimicrobianos em estudo. O MIC será definido na menor concentração onde houve inibição do crescimento bacteriano. Caso as cepas forem inibidas na menor concentração pesquisado do antimicrobiano, o MIC dessa cepa será definido como menor, ou igual, que a concentração mínima estudada. Do contrário, se a cepa apresentar crescimento na maior concentração estudada de um determinado antimicrobiano, o MIC dessa cepa será definido como maior que a mais alta concentração pesquisada (NCCLS, 2004).

Nesse estudo foi empregado o Método da Diluição em Placa, pois esse método é mais preciso que o de Kirb-Bauer, justamente por ele apresentar um resultado preciso (quantitativo) do comportamento das cepas perante os antimicrobianos em estudo. Dessa forma, pode-se comparar o grau de resistência das cepas, mesmo elas sendo classificadas como plenamente resistente, com resistência intermediária ou sensível, uma vez que duas cepas podem ser plenamente resistentes, mas terem MICs diferentes (NCCLS, 2004).

2.4. Genes de Resistência

Tão importante como a verificação da resistência é a busca da causa da resistência microbiana para que se possa ter uma nova alternativa de pesquisa para o controle do crescimento das bactérias e também uma possível justificativa para os níveis de resistência apresentados por cada país ou uma determinada região. O *S. pneumoniae* tem genes cromossomais que conferem resistência aos antimicrobianos. Diferente do que ocorre em várias bactérias, onde é verificada a presença de plasmídeos com genes de resistência que codificam enzimas que agem diretamente sobre o antimicrobiano, no pneumococo a resistência é mediada pelos genes cromossomais. Esses genes de resistência são adquiridos

pelo pneumococo quando essa bactéria entra em contato com outras que possuem tais genes. Normalmente essas espécies são de outros estreptococos ou do *Enterococcus faecalis* (Cochetti *et al.*, 2007; Sutcliffe *et al.*, 1996).

Cada gene confere resistência para uma classe diferente de antimicrobianos e recebe uma denominação diferente. Como exemplo, pode-se citar os genes *erm*, que conferem resistência à eritromicina, estreptograminas e lincosaminas, os genes *tet*, que conferem resistência à tetraciclina, os genes *pbp* para os β -lactâmicos, genes *gir*, que conferem resistência as fluoroquinolonas, dentre outros genes (Bean & Klena, 2002; Nagai *et al.*, 2000; Zettler *et al.*, 2006).

A penicilina é um antimicrobiano β -lactâmico que age sobre as transpeptidases e transaminases, inibindo a formação das ligações cruzadas e amínicas envolvendo o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina, componentes da parede celular bacteriana (Grebe & Hakenbeck, 1996). Em várias bactérias, a resistência à penicilina baseia-se na produção de enzimas, chamadas β -lactamases, que degradam a penicilina gerando o ácido penicilóico, inativo contra as bactérias. Porém, o *S. pneumoniae* não possui β -lactamases e seu mecanismo de resistência à penicilina é através da modificação de uma ou mais transpeptidases e transaminases, enzimas fundamentais para a produção do peptídeoglicano. Essas enzimas também são chamadas de proteínas ligadoras de penicilina. São vários os genes envolvidos com a codificação das proteínas ligadoras de penicilina, sendo o *pbp2x*, *pbp1a* e *pbp2a* os principais alvos dos β -lactâmicos (Ubukata *et al.*, 1997). Alteração em cada um desses genes confere diferentes níveis de resistência e quanto mais genes estiverem mutados, maior será esse nível de resistência no pneumococo aos antibióticos β -lactâmicos. Também podem ocorrer diferentes níveis de resistência se um ou outro gene sofrer alteração. Isso se justifica pelo fato de que algumas enzimas realizam apenas a ligação cruzada entre as camadas de peptídeoglicano e outras também realizam a formação do próprio peptídeoglicano (Hiramatsu *et al.*, 2004). A quantidade de mutações em um gene e qual gene está mutado, pode justificar a resistência e a sensibilidade a diferentes β -lactâmicos. Por exemplo, sabe-se que a proteína PBP 2x é a enzima alvo da cefotaxima, enquanto que o alvo da piperacilina é a enzima PBP 2b. Então, se houver mutação no gene *pbp2x* haverá maior resistência à cefotaxima e se houver mutação no *pbp2b* a resistência pneumocócica será maior à piperacilina (Grebe & Hakenbeck, 1996).

Por sua vez, os macrolídeos agem sobre a subunidade 23S do ribossomo, afetando a síntese de proteínas por parte da bactéria. Existem dois principais mecanismos de resistência do pneumococo aos macrolídeos, dentre os quais destacam-se a eritromicina pelo seu uso e facilidade de acesso devido ao baixo custo.

O primeiro mecanismo de resistência aos macrolídeos baseia-se na modificação do sítio de ligação do macrolídeo no ribossomo. Essa alteração consiste na introdução de uma ou duas metilas em um resíduo de adenina (A2058) no domínio V da subunidade 23S do ribossomo bacteriano, o que diminui a afinidade aos macrolídeos, estreptogramina B e lincosamina. A metilação é catalisada por uma metilase que é codificada pelo gene *erm*, que foi assim denominado, pois significa do inglês metilase de resistência à eritromicina (Weilsblum, 1995). São conhecidos oito genes do tipo *erm*. Nos pneumococos são conhecidos apenas dois desses genes, sendo o *erm(B)* mais predominante mundialmente, enquanto o gene *erm(A)* subclasse (TR) é menos comum. Esse segundo gene foi descoberto em cepas do *S. pneumoniae* em cepas da Austrália apenas. Acredita-se que o gene *erm(A)* subclasse (TR) tenha como origem o *Streptococcus pyogenes*. Há também um gene denominado *erm(C)* que foi verificado apenas em *Staphylococcus aureus*, assim como o gene *erm(G)* (Farrel *et al.*, 2001).

O segundo mecanismo de resistência à eritromicina é o de efluxo, que consiste na expulsão do antimicrobiano de dentro da bactéria. Esse mecanismo é conferido pela presença do gene *mef*, que normalmente é da subclasse *mef(A)*. Existe também uma subclasse que mais raramente confere resistência ao pneumococo que é a *mef(E)*. A resistência conferida pelo mecanismo de efluxo assemelha-se àquele apresentado pelas cepas de *Staphylococcus aureus*, o qual é multicomponente, onde estão envolvidas três proteínas, duas ligadoras de ATP (MsrA e Stp) e uma transmembrana (Smp). Porém, sabe-se também que o mecanismo não é idêntico e acredita-se que outras proteínas desempenham a mesma função das citadas no pneumococo (Sutcliffe *et al.*, 1996).

A resistência conferida pelos genes *erm* é mais intensa que aquela conferida pelos genes *mef*, ou seja, as concentrações inibitórias mínimas para os pneumococos contendo genes *erm* são mais elevadas do que as cepas que possuem genes *mef* (Descheemaeker *et al.*, 2000; Nys *et al.*, 2005). Além disso, a metilação, ou dimetilação, no resíduo de adenina A2058 ou A2059, causada pela

metilase codificada pelo gene *erm*, confere resistência a todos os macrolídeos, lincosamina e estreptogramina B, enquanto que as com gene *mef* têm resistência para os macrolídeos do grupo 14 e 15, no qual está classificada a eritromicina (Bonofiglio *et al.*, 2005).

A coexistência dos genes *erm* e *mef* pode causar maior nível de resistência ao pneumococo contra os macrolídeos, mas essa associação ocorre em proporção menor se comparada a presença dos genes de forma isolada. Assim como ocorre com a resistência aos antimicrobianos, o percentual de descrição da presença desses genes varia de acordo com a região estudada. De acordo com o local, a resistência aos macrolídeos pode ser decorrência principalmente da presença de um ou de outro gene, como pode ser observado na Tabela 9. Em geral, existe predominância do gene *erm(B)* nas cepas resistentes à eritromicina ao redor do mundo, sendo essa predominância mais ou menos elevada. Porém, em alguns países, como Estados Unidos e Alemanha, existe maior frequência de resistência mediada pelo gene *mef*. No Brasil, mais especificamente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, foi verificado prevalência de 92,5% do gene *erm(B)* nas cepas resistentes à eritromicina (Mendonça-Souza *et al.*, 2004). Fato raro são índices elevados de cepas com ambos os genes. Porém, tal fato foi verificado na Nova Zelândia, onde 62,1% do total de cepas resistentes tinham tanto *erm(B)* e *mef(A)* (Bean & Klena, 2002).

2.5. Pesquisa dos Genes de Resistência

A pesquisa dos genes de resistência *erm(B)* e *mef(A/E)* baseia-se na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é uma técnica rápida, de custo relativamente baixo, precisa e específica, a qual baseia-se na polimerização do DNA por uma enzima termoestável mediante a presença de oligonucleotídeos específicos para o fragmento genômico ao qual se quer amplificar (Saiki *et al.*, 1988).

A pesquisa via PCR dos genes *erm(B)* e *mef(A/E)* começou a ser realizada com mais frequência a partir da metade da década de 1990, quando Sutcliffe e colaboradores (1996) verificaram a presença de genes codificadores de mecanismo de efluxo nos pneumococos e publicaram os oligonucleotídeos iniciadores para a pesquisa de genes responsáveis por esse comportamento nos pneumococos (gene *mef*). Segundo eles o tamanho do fragmento do gene

mef(A/E) é de 348pb, enquanto que dos genes *erm* são de, aproximadamente, 650pb. Outros trabalhos feitos com o gene *erm(B)* em pneumococos mostraram que o tamanho desse gene é de 640pb (Zettler *et al.*, 2005; Rachdi *et al.*, 2007). De posse dessas informações a respeito do tamanho dos fragmentos dos genes em questão, pôde-se pesquisar a presença dos genes de forma isolada ou em conjunto nas cepas de pneumococo, gerando informações importantes a respeito dos percentuais de presença desses genes nas cepas pneumocócicas. A verificação desses percentuais faz-se necessária, pois se houver maior percentual de cepas do pneumococo apresentando o gene *mef(A/E)* elas ainda podem ser combatidas com os macrolídeos devido a menor resistência conferida por esses genes, enquanto que as cepas com o gene *erm(B)*, normalmente, apresentam maior nível de resistência para os macrolídeos (Zettler *et al.*, 2005).

Tabela 9. Prevalência mundial dos genes de resistência para a eritromicina.

País	% <i>mef(A/E)</i>	% <i>erm(B)</i>	Referência
Alemanha	62,5	37,5	Reinert <i>et al.</i> , 2004
Argentina	68,0	21,5	Bonofiglio <i>et al.</i> , 2005
Brasil	7,5	92,5	Mendonça-Souza <i>et al.</i> , 2004
Estados Unidos	68,7	16,8	Farrel & Jankins, 2004
Holanda	27,15	57,6	Nys <i>et al.</i> , 2005
Itália	36,1	64,3	Monaco <i>et al.</i> , 2005
Japão	42,5	52,5	Inoue <i>et al.</i> , 2002

A descoberta da presença do gene *mef(A/E)* é mais recente que a observação do gene *erm(B)* nas cepas de *S. pneumoniae*. A partir da publicação da presença do gene *mef(A/E)* nos pneumococos codificando o mecanismo de efluxo, foi justificada a presença do fenótipo M nessas cepas, o qual significa que a cepa apresenta resistência para os grupos 15 e 16 dos macrolídeos (Descheemaeker *et al.*, 2000). Antes dessa descoberta, sabia-se apenas a origem do fenótipo MLS_B, o qual é conferido por genes *erm*, no caso dos pneumococos *erm(B)*. Esse fenótipo MLS_B é o fenótipo caracterizado pela resistência aos macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas (Farrel *et al.*, 2002). A manifestação de um fenótipo MLS_B é mais preocupante, pois gera uma resistência maior e a uma quantidade maior de antimicrobianos (Reinert *et al.*, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de Realização do Trabalho

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

3.2. Origem e Identificação das Cepas

As 64 cepas de *S. pneumoniae* desse trabalho foram obtidas do Hospital Santa Casa, do Hospital de Clínicas e Hospital Conceição, todos situados em Porto Alegre. Essas cepas tiveram origem de diferentes amostras, principalmente sangue, líquido e secreções do trato respiratório superior e inferior de pacientes provenientes dos hospitais acima citados durante os anos de 2004 e 2005.

As cepas ficaram armazenadas em *Skin-milk*, a -20°C e vieram previamente identificadas dos laboratórios dos hospitais de origem. Porém, a confirmação da identificação das cepas fez-se necessária. Esse procedimento foi feito em todas as cepas, seguindo os métodos propostos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) publicados em 2004. Para o isolamento e identificação das cepas de *S. pneumoniae*, as mesmas foram cultivadas em ágar-sangue, a 37°C , em microaerofilia por 24 horas. Os testes de identificação do pneumococo consistiram na verificação de estreptococos Gram positivos de cadeia curta, principalmente diplococos, na sensibilidade à optoquina, na morfologia colonial e na produção de α -hemólise.

3.3. Teste de Suscetibilidade

O método utilizado para a verificação da resistência das cepas identificadas como pneumococo foi o método de diluição em placa de acordo com o NCCLS, 2004. As cepas foram analisadas para os seguintes antimicrobianos da marca Sigma Chemical (Steinhal, Alemanha): penicilina, cloranfenicol, trimetoprima/sulfametoxazol, ceftriaxona, vancomicina, tetraciclina, além da eritromicina, todos diluídos com água a partir de uma solução-mãe. Para cada antimicrobiano foram feitas diversas placas de ágar-sangue (Muller-Hinton a 5% de sangue de carneiro) com concentrações crescentes dos mesmos. A

classificação de cada cepa em plenamente resistente, resistente intermediária e sensível foi feita com base no MIC apresentado pela cepa para cada antimicrobiano. Na Tabela 10 podem ser verificadas as diferentes concentrações para cada um dos antimicrobianos pesquisados nesse estudo assim como a interpretação dos MICs.

Tabela 10. Concentrações dos antimicrobianos pesquisados e interpretação das concentrações inibitórias mínimas (MICs).

Antimicrobiano	Concentração (µg/mL)							
Penicilina	0,03 ^a	0,06 ^a	0,12 ^b	0,25 ^b	0,50 ^t	1,0 ^b	2,0 ^c	4,0 ^c
Eritromicina	0,12 ^a	0,25 ^a	0,50 ^b	1 ^c	2 ^c	4 ^c	8 ^c	
Tetraciclina	0,50 ^a	1 ^a	2 ^a	4 ^b	8 ^c	16 ^c		
Ceftriaxona	0,12 ^a	0,25 ^a	0,5 ^a	1 ^b	2 ^c	4 ^c		
Cloranfenicol	1 ^a	2 ^a	4 ^a	8 ^c	16 ^c	32 ^c		
Trim/Sulfam*	0,50/9,5	1,0/19 ^b	2,0/38 ^b	4,0/76 ^c				
Vancomicina	0,25 ^a	0,5 ^a	1 ^a					

*Trimetoprima/Sulfametoxazol; ^aMIC de cepas sensíveis; ^bMIC de cepas com resistência intermediária; ^cMIC de cepas plenamente resistentes; Fonte: NCCLS, 2004.

3.4. Pesquisa dos genes *erm(B)* e *mef(A/E)* nos *S. pneumoniae*

Após o crescimento em ágar-sangue, as cepas foram repicadas para 2mL de caldo BHI por um período de 48 horas, seguindo-se a extração do DNA bacteriano e a reação de polimerase em cadeia (PCR). A extração do DNA foi realizada mediante o protocolo de Sambrook e colaboradores (1989), o qual emprega lisosima na concentração final de 1mg/mL e SDS (CF 4%) para a lise bacteriana, uma solução de fenol/clorofórmio para a retirada do DNA da suspensão e isopropanol para a precipitação do material genético.

A PCR das cepas foi realizada com um volume final de 20µL dos reagentes envolvidos. Esse volume final englobava 1U da enzima Taq polimerase (marca Invitrogen), 0,2mM de desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1µM do oligonucleotídeo iniciador direto e reverso do gene *erm(B)* ou *mef(A/E)* (Tabela 11), 1µL de tampão 10x da enzima Taq, 1,5mM de solução de MgCl₂ e água suficiente para completar o volume de 20µL (Mendonça-Souza *et al.*, 2004).

A amplificação dos genes foi realizada no termociclador da marca Eppendorf, modelo Mastercycler personal. Inicialmente foi realizada uma desnaturação do DNA a 93°C por cinco minutos, seguindo-se 35 ciclos de 1 minuto a 93°C de desnaturação, 1 minuto a 54°C de anelamento e 1 minuto a 72°C de polimerização. Por fim, foi programada uma extensão final por 5 minutos a 72°C.

Tabela 11. Oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas seqüências de nucleotídeos utilizadas nesse trabalho.

Oligonucleotídeo Iniciador	Seqüência de Nucleotídeos	Tamanho do Fragmento
<i>erm</i> (B) direto	5´- GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA – 3´	640pb
<i>erm</i> (B) reverso	5´- AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC- 3´	
<i>mef</i> (A/E) direto	5´- AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGG- 3´	350pb
<i>mef</i> (A/E) reverso	5´- TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG – 3´	

Fonte: Sutcliffe *et al.*, 1996.

O resultado da amplificação dos genes foi verificado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultra-violeta. A captura da imagem foi feita por uma câmera digital da marca Kodac (DC 120 Zoom Digital Picture Transfer Application, versão 1.0.2) e analisada pelo programa Kodac 1D, versão 3.5.2, utilizando-se como padrão de peso molecular um marcador Ladder de 50pb.

3.5. Multiresistência

Nesse trabalho foi considerada como multiresistente a cepa que apresentou resistência a três ou mais antimicrobianos.

3.6. Controle de Qualidade

Foi utilizada uma cepa padrão de *S. pneumoniae* ATCC 49619 de acordo com o NCCLS durante a realização dos MICs e como controle negativo nas PCRs. Como controle positivo duas cepas de pneumococo, a cepa 2005 com o gene *erm*(B) e a 1721 com o gene *mef*(A/E). Essas cepas foram previamente pesquisadas e identificadas como portadoras dos referidos genes no

Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

As cepas que não apresentaram nenhum dos genes pesquisados tiveram seu DNA submetido a uma outra PCR nas mesmas condições que para os genes de resistência. Para verificar a presença de inibidores da PCR nos extratos de DNA, utilizou-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (BS1 e BS2) específicos do gene de RNA ribossomal 16S procarioto (desenhado por J. F. Guillou, França).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação

Das 64 cepas identificadas como *S. pneumoniae*, algumas cepas apresentaram um comportamento que chamou a atenção com relação a morfologia colonial. Após a primeira repicagem, do Skim-milk para o ágar sangue, as colônias, em geral, apresentaram-se mucóides e relativamente grandes, o que é característico de cepas de pneumococo. Nos casos onde houve a necessidade de outra repicagem, para a obtenção de maior quantidade de células para novo armazenamento das cepas, as colônias, em alguns casos, apresentaram um aspecto diferente. Elas estavam menores e sem a aparência mucóide característica, apresentando um aspecto seco. Esse fato foi ocasionado, possivelmente, pela perda da cápsula durante o processo. Isso pode ocorrer quando o pneumococo está fora do hospedeiro. Não havendo a necessidade de se proteger do sistema imunológico, ele não precisa da cápsula para se defender e, sem ela, a morfologia colonial altera (Allegrucci & Sauer, 2007).

4.2. Antimicrobianos

Os MICs das 64 cepas pesquisadas do pneumococo estão presentes na Tabela 13 e os resultados obtidos foram classificados em plenamente resistente (R), resistência intermediária (I) ou sensível (S) de acordo com os valores de referência preconizados pelo NCCLS, 2004.

4.2.1. Penicilina

A penicilina apresentou um percentual de 28% de cepas com sensibilidade diminuída, sendo 8% com resistência plena e 20% com resistência intermediária.

O percentual de 28% de resistência é um valor que está inferior aos maiores índices de resistência observados pelo mundo, principalmente se compararmos com valores observados na França (50%), Tailândia (70,3%) e África do Sul (74%), por exemplo (Felmingham, 2007; Chiou *et al.*, 1998). Por outro lado, Porto Alegre apresenta um percentual de resistência superior a um valor que é considerado seguro para o combate das infecções pneumocócicas, como ocorre no Reino Unido (4,3%) e na Alemanha (2,4%) (Mera *et al.*, 2006).

Comparando os 28% de resistência verificados com resultados obtidos por outros estudos feitos no Brasil, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, pode-se dizer que a tendência de crescimento se manteve. Isso porque, o valor obtido está um pouco mais elevado que os resultados verificados por Brandileone *et al.*, 2005. Eles verificaram índices crescentes de resistência na década de 1990 e 2000 chegando a aproximadamente 26% em cepas do ano de 2003. Como as cepas desse trabalho foram oriundas dos anos de 2004 e 2005, a tendência de crescimento permanece, porém, pequena.

Índices de resistência como esses observados em Porto Alegre, assim como na Grécia (34,7%) e Espanha (25%) não dão tranquilidade para o uso do antimicrobiano no combate ao pneumococo sem a possibilidade de falha do tratamento, diferente do que ocorre com os índices observados em alguns países, como Alemanha e Inglaterra, que são bastante inferiores (Tabela 1) (Mera *et al.*, 2006). Em vista disso, o combate ao *S. pneumoniae* em Porto Alegre com a penicilina merece cuidados devido a esse índice de 28%, mesmo sendo a maior parte desse percentual composto por cepas de resistência intermediária, essas cepas também podem apresentar maior dificuldade em serem combatidas com doses usuais da penicilina, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Kristiansen *et al.*, 2007).

4.2.2. Eritromicina

A resistência a eritromicina foi verificada em dez das 64 cepas, o que representa 15% de resistência plena. Diferentemente do que foi observado com a penicilina, onde a maioria das cepas resistentes apresentou resistência intermediária ao β -lactâmico, todas as cepas com susceptibilidade diminuída a eritromicina apresentaram-se plenamente resistentes ao antimicrobiano. O fato de existir um percentual zero ou próximo de zero de cepas com resistência intermediárias à eritromicina é bastante comum em âmbito mundial. Estudo publicado por Felmingham e colaboradores (2007), englobando cepas de todo o mundo, mostraram apenas 0,1% de cepas com resistência intermediária ao antimicrobiano em questão.

O percentual de resistência à eritromicina observado foi pequeno se comparado a resistência apresentada à penicilina, o que sugere uma maior segurança no combate ao pneumococo com o emprego da eritromicina do que com a penicilina. Comparando os dados obtidos com os valores encontrados em

outros países, pode-se dizer que em Porto Alegre a resistência à eritromicina é baixa. Pode-se dizer isso, lembrando que a resistência à eritromicina em vários países da Ásia é superior a 80% (Song *et al.*, 2004). Se compararmos com os valores da resistência com países europeus, o valor encontrado nesse trabalho é inferior aos menores índices daquele continente, como o Reino Unido (14,6%) (Felmingham *et al.*, 2007).

O valor obtido de 15% neste trabalho é um pouco maior que os índices previamente verificados no Brasil. Pode-se dizer que as cepas de Porto Alegre estão em um patamar um pouco superior ao observado por Mendonça-Souza e colaboradores (2004), uma vez que nesse ano foi publicado resistência de 10%, sendo que nem todas as cepas foram totalmente resistentes à eritromicina. Porém, esse valor não está muito distante dos 10% observados previamente e não chama a atenção para um crescimento em alto grau da resistência desse microrganismo para a eritromicina, fato esse já observado em outros países, como a Malásia onde foi verificado um aumento de 3,0% para 36,8% na resistência à eritromicina em um período de apenas dois anos (Song *et al.*, 2004).

4.2.3. Tetraciclina

Para a tetraciclina, as cepas estudadas apresentaram um nível de resistência inferior ao esperado. Previamente, foi observado no Brasil, mais especificamente no estado de São Paulo, durante a década de 1990, um valor de 32,0% de cepas resistentes a esse antimicrobiano (Levin *et al.*, 1996). No presente trabalho, verificou-se 18% das cepas com sensibilidade diminuída à tetraciclina, sendo a maioria (14%) com resistência intermediária e 4% das cepas mostraram-se plenamente resistentes ao antimicrobiano em questão.

Pelo fato de a tetraciclina ser uma alternativa importante à penicilina quando essa não pode ser empregada, o relativamente baixo índice de resistência encontrado para a tetraciclina foi satisfatório e esse antimicrobiano permanece como uma alternativa útil no combate ao pneumococo. Também foi satisfatório o pequeno percentual de cepas com resistência plena. Apesar de uma cepa com resistência intermediária poder apresentar uma maior dificuldade em ser eliminada nas dosagens usuais do antimicrobiano, ainda assim a bactéria pode ser combatida com tal antimicrobiano.

Em âmbito mundial, a resistência à tetraciclina em Porto Alegre está entre os menores valores observados pelo mundo. Como comparação, podemos observar que na França a resistência a esse antimicrobiano chegou a 31% em 2002, entre cepas resistentes e intermediárias (Sarkis *et al*, 2006).

4.2.4. Cloranfenicol

O cloranfenicol apresentou uma atividade grande sobre o pneumococo. A sensibilidade foi de 97%, com apenas 3% das cepas plenamente resistentes. Nenhuma amostra apresentou-se como intermediária a esse antimicrobiano. O baixo índice de resistência verificado para o cloranfenicol confirma o baixo índice esperado e é comparável ao observado no mundo. Esse índice mantém o cloranfenicol como uma alternativa eficiente no combate ao pneumococo (Whitney *et al.*, 2000; Magalhães & Pinto, 2003).

4.2.5. Vancomicina

Como esperado não foi verificado nenhum grau de resistência à vancomicina. Esse resultado é bastante satisfatório, pois a vancomicina é considerada um antimicrobiano de reserva e, de acordo com o resultado obtido, pode-se dizer que ela ainda pode ser usada como tal em Porto Alegre (Novak *et al.*, 1999).

4.2.6. Ceftriaxona

A ceftriaxona é uma quinolona de terceira geração e apresentou uma ação extremamente eficiente contra o pneumococo nas cepas de Porto Alegre. Ela foi efetiva contra 63 das 64 cepas estudadas. Apenas uma amostra mostrou-se resistente a esse antimicrobiano.

A atividade da ceftriaxona foi comparável a ação do cloranfenicol, porém seu uso não apresenta os problemas de toxicidade como o cloranfenicol. Dessa forma, a ceftriaxona é uma alternativa muito eficiente e útil no combate ao pneumococo em Porto Alegre. Em geral os índices de resistência a ceftriaxona são baixos. Pode-se citar a Grécia com 5,4% de cepas resistentes a esse antimicrobiano como um dos países europeus com maior índice de resistência à ceftriaxona (Poulakou *et al.*, 2007). O fato de existirem índices baixos a ceftriaxona pode ser justificado por ele ser um antimicrobiano relativamente novo

e estar em contato por um período de tempo menor que a eritromicina e a penicilina, por exemplo (Chiu *et al.*, 1998).

4.2.7. Trimetoprima/Sulfametoxazol

Essa associação de antimicrobianos foi a alternativa de combate ao pneumococo pesquisada nesse trabalho que apresentou os mais altos índices de resistência. Foi observada que 68% das cepas apresentaram suscetibilidade diminuída à associação. Desse percentual a grande maioria foi de cepas com resistência plena (61% plenamente resistentes e 7% com resistência intermediária). Tais valores estão acima da maioria dos índices observados pelo mundo e inviabilizam o uso dessa associação contra o *S. pneumoniae* em Porto Alegre. Um fato que pode justificar tão elevado índice para essa associação é o alto consumo, pois ela é de fácil aquisição no comércio farmacêutico, possui baixo custo e comumente confundido como um medicamento antigripal pela população (Magalhães & Pinto, 2003; Sahm *et al.*, 2007; Hsueh *et al.*, 1999).

4.3. Multiresistência

O comportamento das cepas com relação ao número de antimicrobianos aos quais elas apresentam suscetibilidade diminuída pode ser observado na Figura 2. Foi verificado que 7 cepas (11%) apresentaram-se como multiresistentes, sendo que, apenas 12 (19%) apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos. Nenhuma delas mostrou-se resistente a todos, sempre havendo a possibilidade de combate a bactéria com pelo menos dois antimicrobianos testados. A amostra que mostrou o maior grau de resistência foi uma cepa resistente a cinco antimicrobianos, a cepa 1603. Essa foi a única cepa resistente a ceftriaxona, a qual mostrou-se sensível a vancomicina e à associação sulfametoxazol/trimetoprima. Fato merecedor de destaque, pois a associação em questão foi a alternativa de tratamento menos efetiva contra o pneumococo. As cepas que tiveram resistência plena a penicilina foram resistentes a pelo menos mais um antimicrobiano e todas as cepas multiresistentes apresentaram algum nível de resistência à esse β -lactâmico.

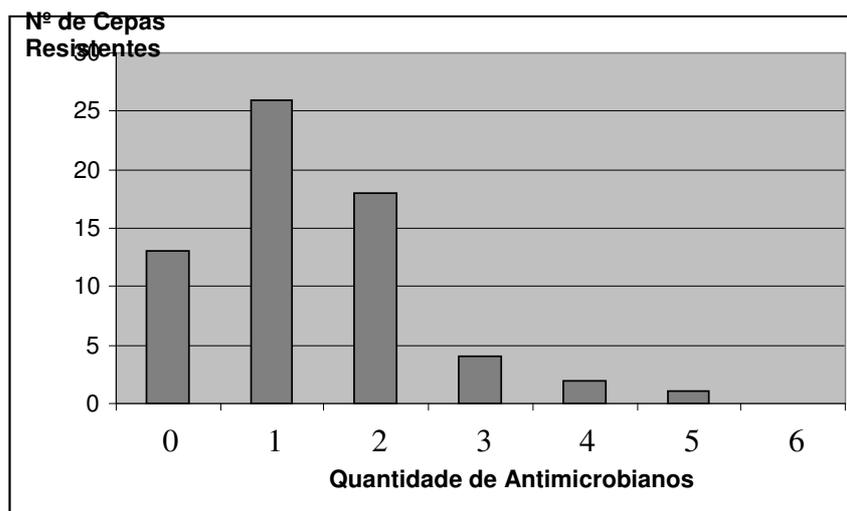


Figura 2. Número de antimicrobianos aos quais as cepas foram resistentes.

Tem-se eritromicina e a tetraciclina como opções para se combater o pneumococo nos casos em que não é possível o uso da penicilina. Essa afirmação tem valor de acordo com o nível de resistência dessas cepas para esses antimicrobianos. Nas cepas resistentes à penicilina, verificou-se que aproximadamente um terço delas apresentou algum nível de resistência concomitante aos dois antimicrobianos em questão. Dessa forma, pode-se dizer que a eritromicina e a tetraciclina não são antimicrobianos que possam ser empregados com tranquilidade como alternativa à penicilina (Tabela 12).

Têm-se sugerido a transmissão de resistência da eritromicina e da tetraciclina conjuntamente em cepas do pneumococo mediante a transmissão concomitante dessas resistências via transposons (Wu *et al.*, 1999). Esse fato é relevante em alguns países, pois a aquisição desses transposons afetam significativamente os níveis de resistência do pneumococo aos dois antimicrobianos em questão (Cochetti *et al.*, 2007). Existem alguns transposons identificados que são responsáveis por essa dupla resistência, a qual pode ser transmitida entre espécies de estreptococos e entre outros gêneros bacterianos. Como exemplo desses transposons, podemos citar o Tn916, o Tn1545 e o Tn3872 (Wu *et al.*, 1999). No presente trabalho, três amostras mostraram-se resistentes à eritromicina e a tetraciclina ao mesmo tempo. Essas cepas podem ter adquirido um dos transposons citados anteriormente. Porém, tal fato não pode ser verificado como constante em Porto Alegre, pois a maioria das 19 cepas que apresentaram susceptibilidade diminuída à eritromicina ou à tetraciclina não possuíam essa dupla resistência.

Tabela 12. Padrão de resistência das cepas resistentes à penicilina com relação a tetraciclina e a eritromicina.

Cepas Identificadas	Penicilina ($\mu\text{g/mL}$)	Tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$)	Eritromicina ($\mu\text{g/mL}$)
1510	0,25	<0,5	<0,12
1520	2	>16	>8
1527	4	<0,5	<0,12
1530	0,25	2	4
1540	0,25	16	<0,12
1543	2	<0,5	<0,12
1558	0,12	1	>8
1562	0,5	<0,5	<0,12
1574	0,5	8	1
1575	2	<0,5	>8
1588	0,25	<0,5	<0,12
1591	0,12	<0,5	<0,12
1594	0,5	<0,5	<0,12
1603	1	4	4
1609	0,25	4	<0,12
1650	2	1	<0,12
1663	1	<0,5	<0,12
1664	1	<0,5	<0,12

4.4. Genes de Resistência à Eritromicina

Como citado anteriormente, as cepas estudadas apresentaram uma resistência de 14%, o que corresponde a dez cepas. Essas e outras dez cepas sensíveis à eritromicina foram submetidas a realização da PCR para a verificação da presença dos genes *erm(B)*, responsável pela metilação do sítio de ligação da eritromicina no ribossomo, e *mef(A/E)*, responsável pelo mecanismo de efluxo na bactéria. O resultado da PCR mostrou a presença do gene *erm(B)* em sete cepas, do gene *mef(A/E)* em três e apenas uma amostra com resistência à eritromicina não apresentou nenhum dos dois genes. Dessa forma, pôde-se relacionar a resistência à eritromicina com a presença dos genes *erm(B)* e *mef(A/E)*. Pode-se dizer isso, pois 90% das cepas resistentes apresentaram pelo menos um dos

genes. Apenas uma cepa resistente não apresentou nenhum dos dois genes pesquisados (cepa 1520), assim como nenhuma das dez cepas sensíveis ao antimicrobiano.

Tabela 13. Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) das cepas pesquisadas e suas correspondentes classificações.

Cepas	Pen ¹	Cef	Van	Tet	Clo	T/S	Eri
1649	<0,03 ²	<0,12	1	<0,5	<1	>4/76	<0,12
1536, 1537, 1651	<0,03	<0,12	1	<0,5	2	4/76	<0,12
1646	<0,03	<0,12	1	<0,5	2	>4/76	<0,12
1652	<0,03	<0,12	1	<0,5	2	>4/76	>8
1565, 1615	<0,03	<0,12	1	<0,5	2	1/19,5	<0,12
1561	<0,03	<0,12	1	1	<1	1/19,5	<0,12
1598	<0,03	<0,12	1	1	2	1/19	<0,12
1653, 1665	<0,03	<0,12	1	4	2	4/76	<0,12
1323, 1519	<0,03	<0,12	0,5	<0,5	2	4/76	<0,12
1525	<0,03	<0,12	0,5	<0,5	2	>4/76	<0,12
1544, 1595	<0,03	<0,12	0,5	<0,5	2	1/19,5	<0,12
1598	<0,03	<0,12	0,5	<0,5	<1	1/19,5	<0,12
1542, 1655	<0,03	<0,12	0,5	1	2	>4/76	<0,12
1602	<0,03	<0,12	0,5	1	2	4/76	<0,12
1613	<0,03	<0,12	0,5	1	2	1/19,5	<0,12
1517, 1518	<0,03	<0,12	0,5	4	2	1/19,5	<0,12
1582	<0,03	<0,12	0,5	4	2	>4/76	<0,12
1657	<0,03	<0,12	0,5	4	2	2/38	<0,12
1528	<0,03	<0,12	<0,25	<0,5	2	4/76	<0,12
1532, 1554, 1590	<0,03	<0,12	<0,25	<0,5	2	>4/76	<0,12
1592	<0,03	<0,12	<0,25	<0,5	2	<0,5	<0,12
1555	<0,03	<0,12	<0,25	<0,5	2	1/19,5	<0,12
1581	<0,03	<0,12	<0,25	1	2	2/38	<0,12
1600	<0,03	<0,12	<0,25	1	2	>4/76	<0,12
1514	0,06	<0,12	0,5	1	<1	4/76	1
1637	0,06	<0,12	<0,25	1	2	>4/76	<0,12
1534	0,06	<0,12	0,5	<0,5	<1	1/19,5	<0,12

1: Cef: ceftriaxona; Van: vancomicina; Tet: tetraciclina; Clo: cloranfenicol, T/S: trimetoprima e sulfametoxazol, Eri: eritromicina. Células com fundo sombreado cinza médio: cepas sensíveis. 2: Células com fundo sombreado cinza escuro: cepas com resistência intermediária; Células sem sombreado do fundo: cepas com resistência plena.

Continuação Tabela 13. Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) das cepas pesquisadas e suas correspondentes classificações.

Cepas	Pen ¹	Cef	Van	Tet	Clo	T/S	Eri
1557	0,06	<0,12	0,5	<0,5	<1	1/19,5	2
1556	0,06	<0,12	0,5	<0,5	2	>4/76	<0,12
1612	0,06	<0,12	0,5	1	2	1/19,5	<0,12
1526	0,06	<0,12	1	<0,5	8	>4/76	<0,12
1553, 1644	0,06	<0,12	1	<0,5	2	>4/76	<0,12
1614	0,06	<0,12	1	<0,5	2	1/19,5	2
1607	0,06	<0,12	1	4	2	1/19,5	<0,12
1535	0,06	0,5	0,5	<0,5	<1	>4/76	0,25
1558	0,12	<0,12	1	1	2	1/19,5	>8
1591	0,12	<0,12	0,5	<0,5	2	4/76	<0,12
1609	0,25	<0,12	1	4	2	>4/76	<0,12
1530	0,25	<0,12	0,5	2	2	4/76	4
1510	0,25	<0,12	<0,25	<0,5	2	4/76	<0,12
1540	0,25	<0,12	<0,25	16	2	>4/76	<0,12
1588	0,25	0,25	1	<0,5	2	>4/76	<0,12
1562, 1594	0,5	0,5	1	<0,5	2	>4/76	<0,12
1574	0,5	0,25	0,5	8	2	>4/76	2
1603	1	4	<0,25	4	8	<0,5	4
1663, 1364	1	0,5	1	<0,5	2	>4/76	<0,12
1520	2	0,5	1	>16	2	>4/76	>8
1543	2	0,5	1	<0,5	2	>4/76	<0,12
1575	2	0,5	0,5	<0,5	<1	>4/76	>8
1650	2	1	1	1	2	>4/76	<0,12
1527	4	0,5	1	<0,5	2	>4/76	<0,12

1: Cef: ceftriaxona; Van: vancomicina; Tet: tetraciclina; Clo: cloranfenicol, T/S: trimetoprima e sulfametoxazol, Eri: eritromicina. Células com fundo sombreado cinza médio: cepas sensíveis. 2: Células com fundo sombreado cinza escuro: cepas com resistência intermediária; Células sem sobreamento do fundo: cepas com resistência plena.

Os extratos de DNA das cepas sensíveis e da cepa 1520 foram testados com oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da subunidade ribossomal 16S procariótica para a verificação da presença de inibidores da reação. Houve amplificação dos fragmentos esperados, fato que confirmou a ausência dos genes *erm(B)* e *mef(A/E)* nessas cepas.

Os resultados de algumas PCRs estão presentes na Figura 3 e os MICs de todas as amostras resistentes à eritromicina na Tabela 14. Os

fragmentos obtidos apresentaram o tamanho próximo aos esperados conforme Rachdi *et al.*, 2007.

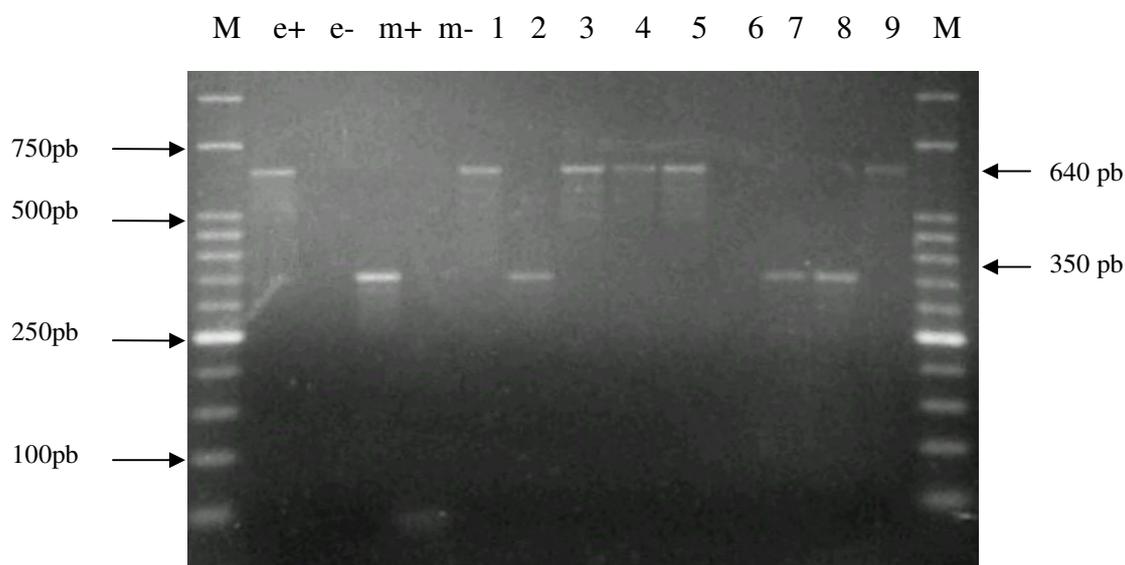


Figura 3. Resultado da PCR com cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes *erm(B)* e *mef(A/E)*. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. M: marcador de 50pb DNA Ladder; e+: controle positivo (cepa 2005) *erm(B)*; e-: controle negativo (ATCC 49619) *erm(B)*; m+: controle positivo (cepa 1721) *mef(A/E)*; m-: controle negativo (ATCC 49619) *mef(A/E)*; posições 1 e 2: cepa 1558; posição 3: cepa 1603; posição 4: cepa 1652; posição 5: cepa 1530; posição 6: cepa 1520; posição 7: 1557; posição 8: cepa 1514; posição 9: cepa 1614.

Verificou-se a presença de uma amostra com os dois genes de resistência, a qual apresentou um elevado MIC ($>8\mu\text{g/mL}$). De acordo com estudos anteriores, cepas com os dois genes tem maior possibilidade de terem elevados índices de resistência, situação observada nessa cepa (Toltzis, *et al.*, 2006). Tal fato não pode ser estudado mais detalhadamente nesse trabalho, uma vez que apenas uma amostra apresentou duplicidade dos genes. Porém é possível afirmar que a duplicidade gênica não é fato comum e que não existe predominância desse padrão nas cepas estudadas. A presença dos dois genes concomitantemente em uma amostra é inferior a de um gene isoladamente, mas, nos últimos anos, está aumentando o percentual dessa concomitância. Já existem países que têm esse padrão como principal em seus estudos, como a Coreia do Sul, onde 40,8% dos pneumococos resistentes à eritromicina apresentam o gene *erm(B)* e o *mef(A)*, e a África do sul que tem 46,4% dos pneumococos nessa situação (Song *et al.*, 2004) Outras três cepas apresentaram MICs $>8\text{mg/ml}$ e as três cepas continham o gene *erm(B)*. Um fato que pode justificar esse elevado

grau de resistência nessas cepas é a possibilidade de uma dupla metilação no sítio de ligação da eritromicina no ribossomo, mais precisamente no resíduo de adenina chamado A2058. Essa dupla metilação apresenta um maior impedimento à ligação da molécula do antimicrobiano em questão e, conseqüentemente, aumentando o MIC da bactéria (Weilsblum, 1995).

Tabela 14. Concentração inibitória mínima (MIC) das amostras resistentes à eritromicina.

Identificação da Cepa	Gene Presente	MIC (µg/mL)
1603	<i>erm(B)</i>	4
1652	<i>erm(B)</i>	>8
1530	<i>erm(B)</i>	4
1614	<i>erm(B)</i>	2
1574	<i>erm(B)</i>	2
1575	<i>erm(B)</i>	>8
1558	<i>erm(B)/mef(A/E)</i>	>8
1557	<i>mef(A/E)</i>	2
1514	<i>mef(A/E)</i>	1
1520	NA ¹	>8

¹Não apresentou gene de resistência.

A cepa 1520, sem os genes de resistência pesquisados, mas com elevado grau de resistência à eritromicina, possui outros mecanismos de resistência diferentes dos codificados pelos genes *erm(B)* e *mef(A/E)*. Um possível mecanismo nessa bactéria é a presença de mutação em regiões altamente conservadas nas proteínas ribossomais L4 e L22 (Wierzbowski, *et al.*, 2007). Essa mutação pode ser variável, ou seja, pode ocorrer em local e em quantidade de aminoácidos diferentes. De acordo com essas características mutagênicas, a bactéria adquire um padrão de resistência diferente. Por exemplo, uma mutação na proteína L4 nos três aminoácidos ⁶⁹TPS₇₁ para GTG conferiu resistência à eritromicina e a estreptograminas, mas não para as lincosaminas (Wierzbowski *et al.*, 2007; Tait-Kamradt *et al.*, 2000). Outra justificativa pode ser alterações nos genes que codificam a subunidade 23S ribossomal, resultando em uma ou mais alterações em um dos quatro aminoácidos presentes no domínio V da subunidade 23S ribossomal. Exemplo dessa mutação é a troca da adenina na posição 2059

do domínio V por um resíduo de guanina. Essa alteração conferiu resistência às três classes de antimicrobianos citados. Assim como ocorre com as mutações nas proteínas L4 e L22, as mutações nesse gene ribossomal podem afetar o número de aminoácidos e por quais eles são substituídos, fazendo com que o padrão de resistência da bactéria também varie (Tait-Kamradt *et al.*, 2000). Essas duas modificações têm sido verificadas com alguma constância em alguns países da Europa e nos Estados Unidos, sendo a mutação na subunidade 23S ribossomal a mais comum das três alterações e mutações na proteína L4 mais comuns que na L22 (Wierzbowski *et al.*, 2007). Outra justificativa seria a presença de um outro gene de resistência para a eritromicina presente na cepa, como o gene *erm(A)* suclasse *ermTR*. Porém, esse gene não apresenta disseminação global, sendo encontrado apenas na Austrália e, recentemente, na Grécia nas cepas do *S. pneumoniae* (Farrel *et al.*, 2002).

Foi observado que as cepas com a presença do gene *erm(B)* apresentaram MICs maiores que as cepas com o gene *mef(A/E)* (Tabela 16). Dessa forma, os resultados obtidos aqui vão ao encontro do que está na literatura no que diz respeito a maior resistência conferida contra os macrolídeos pelo gene *erm(B)* em comparação com as que apresentam o gene *mef(A/E)* (Descheemaeker *et al.*, 2000; Nys *et al.*, 2005). Tal observação pode ser feita apenas se considerarmos o resultado dos MICs. Já, se levássemos em consideração apenas o resultado qualitativo, ou seja, a classificação das cepas como plenamente resistentes, resistentes intermediárias ou sensíveis, essa conclusão não poderia ser feita, pois todas as cepas estudadas são plenamente resistentes à eritromicina, independentemente dos seus MICs.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou o comportamento do *S. pneumoniae* perante alguns antimicrobianos comumente usados no seu controle. Pôde ser observado que o pneumococo apresenta crescentes índices de resistência em comparação com trabalhos realizados previamente, principalmente à penicilina e à eritromicina.

O elevado valor da resistência observado para a penicilina, considerado o antibiótico padrão para as infecções causadas pelo pneumococo, faz com que o emprego desse β -lactâmico no combate a bactéria seja feito com mais cautela. Já o uso da eritromicina é mais seguro, pois ela apresenta uma resistência significativamente menor que a penicilina. Porém, o emprego do macrolídeo como alternativa à penicilina não é recomendado porque uma grande parte das cepas resistentes ao β -lactâmico também apresentou resistência ao macrolídeo. Em casos como esse, verificou-se que uma alternativa é o emprego da ceftriaxona, uma vez que ela apresentou um índice de resistência baixo nas cepas pesquisadas.

A eritromicina, devido ao seu percentual de resistência, é uma boa alternativa no tratamento empírico do portador de infecção pneumocócica. Porém, cabe salientar que o tratamento empírico não é recomendável, pelo fato de ser uma ação sem a garantia da eficácia do tratamento. Isso ocorre uma vez que não se tem certeza de que a bactéria é ou não sensível ao antimicrobiano empregado. Outra justificativa para o não uso do tratamento empírico é que esse ato favorece a disseminação de cepas resistentes, não só do pneumococo, mas também de outras espécies bacterianas. Por esses motivos é importante a realização de antibiograma para que se possa empregar o antimicrobiano mais apropriado para o combate da infecção, diminuindo assim consideravelmente o risco na falha do tratamento e o aumento nos índices de resistência.

O emprego da associação trimetoprima/sulfametoxazol, de acordo com os dados obtidos nesse trabalho, foi muito pouco eficiente contra o pneumococo, pois foi observado que 61% das cepas mostraram-se plenamente resistentes. Diferentemente do que foi verificado com o cloranfenicol e a ceftriaxona, os quais têm sua utilização no combate ao pneumococo plenamente justificada se levarmos em consideração os baixos percentuais de resistência

verificados. Por fim, a vancomicina permanece um medicamento de reserva, pois nenhuma amostra apresentou algum nível de resistência.

Nas cepas resistentes à eritromicina, observou-se a presença predominante do gene *erm*(B). Esse fato vai ao encontro do que é verificado na maioria dos países europeus e difere do que é visto nos países da América do Norte. Confirmaram-se os dados da literatura com relação ao nível de resistência das cepas com o gene *erm*(B) e *mef*(A/E), ou seja, as cepas com o gene *erm*(B) apresentaram maiores MICs do que as cepas contendo *mef*(A/E).

O presente trabalho gerou dados com relação ao comportamento do *S. pneumoniae* mediante a presença de antimicrobianos usados no seu combate e a presença dos genes de resistência à eritromicina em cepas obtidas durante os anos de 2004 e 2005. Cabe salientar que esses resultados não são fixos e eles variam anualmente. Em vista disso, o controle deve ser contínuo tanto para a verificação dos índices de resistência como para a verificação dos determinantes de resistência do pneumococo, no caso, aos genes de resistência à eritromicina.

6. BIBLIOGRAFIA

ALLEGRUCCI, M. & SAUER, K. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus pneumoniae* Biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington. 189(5); 2030-38, 2007.

ARA, J.; CIA, P. ; ARRIBAS, S. L.; AGUIRRE, J. M.; DEJUAN, F.; TELLO, A. M. Clinicoepidemiologic Study of Bacterial-meningitis in Aragon (Spain). **Medicina Clinica**, Barcelona; 103(16): 611-614, 1994.

BEAN, D. C. & KLENA, J. D. Prevalence of *erm(A)* and *mef(B)* Erythromycin Resistance determinants in Isolates of *Streptococcus pneumoniae* from New Zealand. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 50(4); 597-599, 2002.

BONOFILIO, L.; OJEDA, M. I.; MIER, C. ; VAY, C.; FAMIGLIETTI, A.; GUTKIND, A.; MOLLERAC, M. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from adult patients with community-acquired pneumonia in an Argentinian teaching hospital. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam; 25(3); 260-3, 2005.

BRANDILEONE, M. C. C.; DI FABIO, J. L.; VIEIRA, V. S. D.; ZANELLA, R. C.; CASAGRANDE, S. T.; PIGNATARI, A. C.; TOMAZ, A. Geographic Distribution of Penicillin Resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: Genetic Relatedness. **Microbial Drug Resistance**, New York; 4(3); 209-217, 1998.

BRANDILEONE, M. C. C.; CASAGRANDE, S. T.; GUERRA, M. L.; ZANELLA, R. C.; DE ANDRADE S., A. L. S.; DI FABIO, J. L. Increase of penicillin resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil after 1999. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 10; 437-439, 2005.

CAMARGOS, P.; FISCHER, G. B.; MOCELIN, H.; DIAS, C.; RUVINSKY, R. Penicillin Resistance and Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. **Paediatric Respiratory Reviews**, London; 7; 209-214, 2006.

CASTANHEIRA, M.; GALES, A. C.; MENDES, R. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin América: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris; 10; 645-651, 2004.

CHIOU, C. C.; LIU, Y.; HUANG, T.; HWANG, W.; WANG, J.; LIN, H.; YEN, M.; HSEIH, K. Extremely High Prevalence of Nasopharyngeal Carriage of Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among Children in Kaohsiung, Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington; 36: 1933-37, 1998.

COCHETTI, I.; TILI, E.; VECCHI, M.; MANZIN, A.; MINGOIA, M.; VARALDO, P. E.; MONTANARI, M. P. New Tn916-related elements causing *erm(B)*-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible pneumococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 60; 127-30, 2007.

DECOUSSER, J.; PINA P.; VIGUIER F.; F. PICOT,; COURVALIN P.; ALLOUCH, P. Invasive *Streptococcus pneumoniae* in France: Antimicrobial Resistance,

Serotype, and Molecular Epidemiology Findings from a Monthly National Study in 2000 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda; 48(9); 3636–3639, 2004.

DESCHEEMAER, P.; CHAPELLE, S.; LAMMENS, C.; HAUCHECOME, M.; WIDOOGHE, M.; VANDAMME, P. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 45; 167-173, 2000.

DOBAY, O.; ROZGONYI, F.; HAJDÚ E.; NAGY E.; KNAUSZ M.; AMYES, S. G. B. Antibiotic susceptibility and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from Hungary. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 51; 887-93, 2003.

FARREL, D. J. & JENKINS, S. G. Distribution across the USA of Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected from patients with respiratory tract infections: PROTEC US 2001-2002. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 54; 17-22, 2004.

FARREL, D. J.; MORRISSEY, I.; BAKKER, S.; FELMINGHAM, D. Detection of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* using a multiplex rapid cycle PCR with microwell-format probe hybridization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 48; 541-544, 2001.

FARREL, D.; MORRISSEY, I.; FELMINGHAM, D. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999-2000 study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London. 50; 39-47, 2002.

FELMINGHAM, D.; CANTÓN, R. & JENKINS, S.G. Regional Trends in β -Lactam, Macrolide, Fluoroquinolone and Telithromycin Resistance among *Streptococcus pneumoniae* Isolates 2001-2004. **The Journal of Infection**, Amsterdam; 55(2); 111-118, 2007.

GHAFFAR, F.; FRIEDLAND, I. R. & MCKACKEN, G. H. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Paediatric Infectious Diseases Journal**, Baltimore; 18:638-46, 1999.

GOIAL, R.; SING, N. P.; KAUR, M.; TALWAR, V. Antimicrobial resistance in invasive and colonizing *Streptococcus pneumoniae* in North India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi; 25(3); 256-259, 2007.

GREBE, T & HAKENBECK, R. Penicillin-Binding Proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* Are Primary Resistance Determinants for Different Classes of β -Lactamics Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, London; 40(4); 829-34, 1996.

HAUSDORFF, W. P.; FEIKIN, D. R. & KLUGMANN, K. P. Epidemiological Differences Among Pneumococcal Serotypes. **Lancet Infectious Diseases**, London; 5; 83-93, 2005.

HENRICHSEN, J. Six Newly Recognized Types of *Streptococcus pneumoniae*. Copenhagen, Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington; 33(10); 2759-62, 1995.

HIRAMATSU, K.; OHAMA, M.; MIJAJIMA, Y.; KISHI, K.; MIZUNOE, S.; TOKIMATSU, I.; NAGAI, H.; KADOIA, J.; SAIKAMA, T.; NASU, M. Antimicrobial susceptibilities and analyses of genes related to penicilin or macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam; 24; 125-129, 2004.

HOFMAN, J.; CETRON, M. S.; FARLEY, M.; BAUGMAN, W. S.; FACLAM, R. R.; ELLIOT, J. A.; DEEVER B. A. & BREIMAN, R. F. The Prevalence of Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **The New England Journal of Medicine**, Boston; 333:1933-37, 1998.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1994.

HSUEH P.; TENG L.; LEE L.; YANG P.; HO S.; LUH K. Extremely High Incidence of Macrolide and Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance among Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington; 37(4); 897-901, 1999.

INOSTROZA, J.; ILLESCA, V.; REYDET, P.; VINET, A. M.; OSSA, G.; MUÑOZ, S.; THOMPSON, T.; SORENSEN, R. U. Ten-years Surveillance of Pneumococcal Infections in Temuco, Chile: Implications for Vaccination Strategies. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington; 14(6); 660-664, 2007.

INOUE, M.; KOHNO, S.; KAKU, M.; YAMAGUCHI, K.; IGARI, J.; YAMANAKA, K. PROTEC 1999-2000: a multicentre study of the antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan. **International Journal Infectious Disease**, Amsterdam; 9(1); 27-36, 2002.

JENKINS, S. G.; FARREL, D. J.; PATEL, M.; LAVIN, B. S. Trends in anti-bacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA, 2000-2003. **Journal of Infection**, London; 51; 355-63, 2005.

JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J.; BEACH, M. L. Influence of patient age on susceptibility pattern of *Streptococcus pneumoniae* isolates in North America (2000-2001): report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York; 46; 77-80, 2003.

KARCHMER, A. W. Increased antibiotic resistance in respiratory tract pathogens: PROTEC US. **Clinical Infectious Disease**, Chicago; 1(39); 142-50, 2004.

KLUGMAN, C. P. Pneumococcal Resistance to Antibiotics. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington; 3:171-96, 1990.

KRISTIANSEN, J. E.; HENDRICKS, O.; DELVIN, T.; BUTTERWORTH, T. S.; AAGAARD, L.; CHISTENSEN, J. B.; FLORES, V. C.; KEYZER, H. Reversal of

resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda; 59; 1271-79, 2007.

LEVIN, A. S.; TEIXEIRA, L. M., SESSEGOLO, J. F.; BARONE, A. A. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to Antimicrobials in São Paulo, Brazil: Clinical Features and Sorotypes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo. 38(3); 187-192, 1996.

LIVERMORE, D. M.; REYNOLDS R.; STEPHENS P.; DUCKWORTH G.; FELMINGHAM D.; JOHNSON A. P.; MURCHAN S.; MURPHY O.; GUNGABISSOON U.; WAIGHT P.; PEBODY R.; SHACKCLOTH J.; WARNER M.; WILLIAMS L.; GEORGE R. C. Trends in penicillin and macrolide resistance among pneumococci in the UK and the Republic of Ireland in relation to antibiotic sales to pharmacies and dispensing doctors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam; 28; 273–279, 2006.

MAGALHÃES, A. P. G. O. & PINTO A. S. Antimicrobial resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolated from pediatric patients in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo; 34(3);1517-22, 2003.

MARCHESE, A.; GUALCO, L.; COCHETTI, I.; MONTANARI, M. P.; SPECIALE, A. M.; MUSUMECI, S. R.; VARALDO, P. E.; NICOLETTI, G.; SCHITO, G. C. Antibiotic susceptibility and serotype distribution in *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the SEMPRES surveillance study (2000-2002). **International Journal of Antimicrobial**, London; 26; 138-145, 2005.

MARQUES, H. H. S.; YAMAMOTO, M.; SAKANE, P. T.; CAIFA-FILHO, H.; MENDES, C. M. F.; Relatively penicillin-resistant pneumococcal meningitis in a Brazilian infant. **Journal of Pediatric Infectious Diseases**, Amsterdam; 7;433-434, 1988.

MENDONÇA-SOUZA, C. R. V.; CARVALHO, M. G. S.; BARROS, R. R.; DIAS, A. D.; SAMPAIO, J. L. M.; CASTRO, A. C. D.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. Occurrence and Characteristics of Erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated in Three Major Brazilian States. **Microbial Drug Resistance**, New York; 10(4); 313-320, 2004.

MERA, R. M.; MILLER, L. A.; WHITE, A. Antibacterial Use and *Streptococcus pneumoniae* Penicillin Resistance: A Temporal Relationship Model. **Microbial Drug Resistance**, New York; 12(3); 158-163, 2006.

MIRANDA, M. G.; SOLORZEMO, S. F.; GALLARDO, G. H.; LEAÑOS, M. B.; PALAFOX, T. M. Low frequency of penicillin resistance and high resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole in nasopharyngeal isolates from children in a rural area in Mexico. **Archives Medicals Research**, S. I.; 28(4); 559-63, 1997.

MONACO, M.; CAMILLI, R.; D'AMBROSIO, F.; GROSSO, M. D.; PANTOSTI, A. Evolution of Erythromycin Resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 55(2): 256-259, 2005.

NAGAI, Y. K.; DAVIES, T. A.; PANKUCH, G. A.; DEWASSE, B. E.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. *In vitro* selection of resistance in clinafloxacin,

ciprofloxacin and trovafloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda; 44; 2740-2746, 2000.

NCCLS. National Committee of Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance standards for antimicrobial testing. Wayne, 2004.

NOVAK, R.; HENRIQUES, B.; CHARPENTIER, E.; NORMARK, S.; TUOMANEN, E. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. **Nature**, London; 399; 590-593, 1999.

NYS, S.; TJHIE, J. H. T.; BARTELD, A. J. T.; HEIJNEN, M. L. A.; PEETERS, M. F.; STOBBERINGH, E. E. Erythromycin resistance in commensal throat flora of patients visiting the general practitioner: a reservoir for resistance genes for potential pathogenic bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam; 26; 133-137, 2005.

POULAKOU, G.; KATSAROLIS, I.; MATTHAIPOULOU, I.; TSIODRAS, S.; HATZAKI, D.; ROILIDES, E.; SOFIANOU, D.; KAVALIOTIS, I.; KANSOUZIDOU, A. Nationwide surveillance of *Streptococcus pneumoniae* in Greece: patterns of resistance and serotype epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam; 30, 87-92, 2007.

RACHDI, M.; BOUBAKER I. B.; MOALLA S.; SMAOUI H.; HAMMAMI A.; KECHRID A.; REDJEB S. B. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* in Tunisia. **Pathologie et Biologie**, Paris; 1; 2508-13, 2007.

REINERT, R. R.; FRANKEN, C.; LINDEN, M.; LÜTTICKEN, R.; CIL, M.; AL-LAHHAM. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002-2003. **International Journal of Experimental and Clinical Chemotherapy**, Landsberg; 50(4); 184-9, 2004.

RIEDEL S.; BEEKMANN S. E.; HEILMANN K. P.; RICHTER S. S.; GARCIA-DE-LOMAS J.; FERECHE M.; GOOSENS H.; DOERN G. V. Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Wiesbaden; 26:485-490, 2007.

REYES, J.; HIDALGO, M.; DÍAS, L.; RINCÓN, N.; MORENO, J.; VANEGAS, N.; CASTAÑEDA, E.; ARIAS, C. A. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. **International Journal Infectious Diseases**, Amsterdam; 11; 329-336, 2007.

SAHM, D. F.; BENNINGER, M. S.; EVANGELISTA, A. T.; YEE, Y. C.; THORNSBERRY, C.; BROWN, N. P.; HERNDON, V. A.; DETROIT, M. I.; RARITAN, N. J. Antimicrobial resistance trends among sinus isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States (2001-2005). **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, Rochester; 136; 385-389, 2007.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI R.; HORN, G. T.; MULLIS K. B.; ERLICH H.A. Primer-directed enzymatic amplification

of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, London. 239; 487-91, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2^a ed. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, New York; 1989.

SARKIS, D. K.; HAJJ, A. & ADAIMÉ, A. Evolution of the Antibiotic Resistance of *Streptococcus pneumoniae* from 1997 to 2004 at Hotel-Dieu de France, a University Hospital in Lebalon. **Pathologie et Biologie**, Paris; 54; 591-595, 2006.

SENER, B.; TUNCKANAT, F.; ULUSOY, S.; TÜNGER, A.; SÖYLETİR, G.; MÜLAZIMOĞLU. A survey antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Turkey, 2004-2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 60; 587-593, 2007.

SESSEGOLO, J. F.; LEVIN, A. S.; TEIXEIRA, L. M.; BARONE, A. A. Factors associated with penicillin-nonsusceptible pneumococcal infections in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto; 36; 807-813, 2003.

SONG, J.; CHANG, H.; SUH, J. Y.; KO, K. S.; JUNG, S.; OH, W. S.; PECK, K. R.; LEE, N. Y.; YANG, Y.; CHONGTHALEONG, A.; ASWAPOKEE, N.; CHIU, C.; LALITHA, M. K.; PERERA, J.; YEE, T. T.; KUMARARASINGHE, G.; JAMAL, F.; KAMARULAZAMAN, A.; PARASAKTHI, N.; VAN, P. H.; SO, T.; KEUNG, T. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 53; 457-463, 2004.

SJÖSTROM, K.; BLOMBERG, C.; FERNEBRO, J.; DAGERHAMN, J.; MORFELDT, E.; BAROCCHI, M. A.; BROWALL, S.; MOSCHIONI, M.; ANDERSSON, M.; HENRIQUES, F.; ALBIGER, B.; RAPPUOLI, R.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Clonal succes of pilited penicillin nonsusceptible pneumococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 104(31); 907-12, 2007.

SUNG, H.; SHIN, H. B.; KIM, M.; LEE, K.; KIM, E.; SONG, W.; JEONG, S. H.; LEE, W.; PARK, Y.; ELIOPOULOS, G. M. Vancomycin-Tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington; 44(10); 3524-8, 2006.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda. 40(11); 2562-6, 1996.

SUTCLIFFE, J.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* Resistance Pattern Mediated by an Efflux System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda; 40(8); 1817-1824, 1996.

TAIT-KAMRADT, A.; DAVIES, T.; APPELBAUM, P. C.; DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P.; PETITPAS, J.; WONDRACK, L.; WALKER, A.; JACOBS, M. R.; SUTCLIFFE. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of

Streptococcus pneumoniae from Eastern Europe and North America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda. 44(12); 3395-3401, 2000.

TOLTZIS, P.; DUL, M. & O'RIORDAN, M. A. Serogrup 19 pneumococci containing both *mef* and *erm* macrolide resistance determinants in an American city. **Paediatric Infectious Diseases**, Philadelphia; 25; 19-24, 2006.

UBUKATA, K.; MURAKI, T.; IGARACHI, A.; ASahi, Y.; KONNO, M. Identification of penicillin and other β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by PCR. **Journal of Infectious and Chemotherapy**, S. I.; 31; 190-197, 1997.

WASFY M. O.; PIMENTEL G.; ABDEL-MAKSOU D M.; RUSSELL K. L.; BARROZO C. P.; KLENA J. D.; EARHART K.; HAJJEH R. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis in Egypt, 1998–2003. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London; 55; 958-64, 2005.

WEILSBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Madison, USA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda; 39; 577-585, 1995.

WHITNEY C.; FARLEY M. M.; HADLER J.; HARRISON L.; LEXAU C.; REINGOLD A.; LEFKOWITZ L.; CIESLAK P. R.; CETRON M.; ZELL E. R.; JORGENSEN T. J.; SCHUCHAT A. Increasing Prevalence of Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. **The New England Journal of Medicine**, Boston; 343(23); 1917-24, 2000.

WIERZBOWSKI, A. K.; NICHOL, K.; LAING, HISANAGA, T. N.; NIKULIN, A.; KARLOWSKY, J. A.; HOBAN, D. J. & ZHANEL, G. G. Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998–2004). **Journal Infectious Chemotherapy**, London; 60; 733-740, 2007.

WU, S. W.; DE LENCASTRE, H. & THOMAS, A. The *Staphylococcus aureus* transposon Tn551: complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the expression of the erythromycin resistance gene. **Microbial Drug Resistance**, New York; (5); 1-7, 1999.

ZBIDEN, R. Trends in antibiotic resistance among respiratory tract pathogens in children in two regions near France, a high level resistance country. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Wiesbaden; 165; 1-2, 2006.

ZETTLER, E. W., SCHEIBE, R. M., DIAS, C. A. G., SANTAFÉ, P., SANTOS, D. S., MOREIRA, J. D.; FRITSHER, C. C. Determination of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Brazil by PCR. **International Journal Infection Diseases**, Amsterdam; 10; 110-115, 2006.

ZETTLER, R. F.; ZETTLER, E. W.; SCHMITT, V. M.; JAHNS, M. T., DIAS, G. A. C.; FRITSCHER, C. C. Estudo fenotípico e genotípico da resistência aos macrolídeos de *Streptococcus pneumoniae* isolados em hospitais de Porto Alegre – RS. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo. 31(4); 312-7, 2005.

