Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS OPTOQUINA RESISTENTES DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE. IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OPTOCHIN RESISTANT STRAINS OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE. IMPLICATIONS FOR LABORATORY DIAGNOSTIC

Ana Carolina Carvalho de Oliveira[1]
Claudia Ferreira de Andrade[2]
João Fernando Bernardo da Costa[3]
Deize Gomes Cavalcanti de Matos[4]
Ivano de Filippis[5]

RESUMO – *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria com aspecto morfotintorial de coco Gram positivo, que pode ser encontrada na nasofaringe de seres humano, responsável por grande número de casos de pneumonia em todo o mundo, além de causar doenças como otite média e aguda, sinusite e até mesmo doenças invasivas como meningite e septicemia. O tratamento e a quimioprofilaxia são realizados através de antibioticoterapia utilizando β-lactâmicos, quinolonas e macrolídeos. A optoquina (Opt) é um antibiótico utilizado para a identificação do pneumococo em laboratório através da determinação da susceptibilidade, pois é esperado que cepas de pneumococo sejam

[1] Bióloga, aluna de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ;
[2] Bióloga, Técnica em Saúde Pública, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ;
[3] Nutricionista, aluno de IC do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ;
[4] Biomédica, Analista em Saúde, Setor de Bacteriologia, Lab. de Meningites Bacterianas, LACEN-PE;
[5] Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Coordenador de pesquisa do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ. E-mail: ivano.defilippis@incqs.fiocruz.br

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

sensíveis a esse antibiótico. O estudo teve o objetivo de identificar e caracterizar cepas de pneumococos isoladas de pacientes quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e associação a clones hipervirulentos por MLST e avaliar o uso do teste de Opt para a identificação da espécie. Foram avaliadas 211 cepas isoladas de diferentes estados durante o período pré e pós vacinal de 2006 a 2021. Os isolados previamente identificados como pneumococos pelo CAMP, foram submetidos ao teste de Opt e PCR-*ply* para confirmação da espécie. As cepas isoladas foram submetidas ao TSA por disco-difusão e CIM. Do total de 211 cepas confirmadas como pneumococos, 24 (11,4%) foram resistentes à Opt, mas confirmadas como pneumococo pela PCR. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi de um modo geral de 22,6% de cepas resistentes, no entanto entre as cepas Opt^R a resistência foi bem superior com 70,6% das cepas. O sequenciamento do gene da ATPase das cepas Opt^R, revelou mutações pontuais na sequência de nucleotídeos que resultaram em mutações na sequência de aminoácidos dos genes *atpB* e *atpC* que podem ter sido os responsáveis pela diminuição da susceptibilidade à Opt. A análise por MLST das cepas Opt^R, resultou em 7 novos ST e outras cepas com ST já descritos no banco de dados de MLST. A análise por MST revelou uma forte associação de 64% das cepas Opt^R com o ST-66 sendo então agrupadas no cc66. O cc66 é formado, em sua grande maioria, por cepas isoladas de doenças invasivas (meningites e sepse) e está fortemente associado aos sorotipos 9N e 19A que não estão incluídos na PCV-10 utilizada no Brasil. Entre os ST já descritos, três (ST-737, ST-2880 e ST-7186) foram descritos apenas no Brasil e dois desses ST estão associados a sorotipos que não estão nem na PCV-10 nem na PCV-13, em cepas isoladas de doenças invasivas e respiratórias. De um modo geral, a análise por MLST mostrou que há uma forte associação entre sorotipos e ST e que o sorotipo 19A está particularmente presente em diferentes ST com grande potencial de disseminação no país além de novos sorotipos que não estão presentes na PCV-13 utilizada pelo PNI no Brasil. É de grande importância o monitoramento destes microrganismos com potencial de resistência, e a introdução de novos clones e novos sorotipos, para prevenir possíveis epidemias causadas por microrganismos multidroga resistentes não imunopreveníveis.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; Resistência antimicrobiana; Resistência à optoquina, Clones hipervirulentos.

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

ABSTRACT – *Streptococcus pneumoniae* is a bacterium with aspect of Gram-positive cocci, which can be found in the nasopharynx of humans, responsible for a large number of cases of pneumonia worldwide, in addition to causing diseases such as otitis media and acute, sinusitis and even invasive diseases such as meningitis and septicemia. Treatment and chemoprophylaxis are performed through antibiotic therapy using β-lactams, quinolones and macrolides. Optoquine (Opt) is an antibiotic used to identify pneumococcus in the laboratory by determining susceptibility, as pneumococcal strains are expected to be sensitive to this antibiotic. This study aimed to identify and characterize pneumococcal strains isolated from patients regarding their antimicrobial susceptibility profile and association with MLST hypervirulent clones and to evaluate the use of the Opt test for species identification. Two hundred and eleven strains isolated from different states were evaluated during the pre- and post-vaccination period from 2006 to 2021. The isolates previously identified as pneumococci by CAMP were submitted to the Opt and PCR-*ply* test to confirm the species. The isolated strains were submitted to TSA by disk diffusion and MIC. Of the total 211 strains confirmed as pneumococci, 24 (11.4%) were resistant to Opt, but confirmed as pneumococcus by PCR. Overall susceptibility to antimicrobials was 22.6% of resistant strains, however, among Opt^R strains, resistance was much higher with 70.6% of the strains. The sequencing of the ATPase gene of the Opt^R strains revealed point mutations in the nucleotide sequence that resulted in mutations in the amino acid sequence of the *atpB* and *atpC* genes that may have been responsible for the decrease in susceptibility to Opt. MLST analysis of Opt*R* strains resulted in 7 new ST and other ST already described in the MLST database. Analysis by MST revealed a strong association of 64% of Opt^R strains with ST-66 which were grouped into cc66. The majority of cc66 is formed by strains isolated from invasive diseases (meningitis and sepsis) and is strongly associated with serotypes 9N and 19A that are not included in the PCV-10 used in Brazil. Among the STs already described, three (ST-737, ST-2880 and ST-7186) were described only in Brazil and two of these ST are associated with serotypes that are neither in PCV-10 nor in PCV-13, of strains isolated from invasive and respiratory diseases. In general, the MLST analysis showed that there is a strong association between serotypes and ST and that serotype 19A is particularly present in different ST with great potential for dissemination in the country, in addition to new serotypes that are not present in the PCV-13 used by the PNI in Brazil. It is very important to monitor these microorganisms with potential for resistance, and the introduction of new clones and new serotypes, to

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

prevent possible epidemics caused by multidrug resistant microorganisms that are not vaccine preventable.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; Antimicrobial resistance; Optochin resistance; Hypervirulent clones.

INTRODUÇÃO

Pertencente ao gênero *Streptococcus,* o *Streptococcus pneumoniae,* ou pneumococo, é uma bactéria Gram positiva que não produz esporos, alfa-hemolítica, imóvel e lanceolada medindo entre 0,5 e 1,5µm de diâmetro, em forma de cocos organizados em cadeias ou pares. É uma bactéria que necessita de meios de cultura específicos para crescimento como os enriquecidos com sangue, sendo identificada através de métodos bioquímicos, como o teste de bile solubilidade especificamente para o *Streptococcus pneumoniae* (MURRAY, 2009).

Atualmente o pneumococo é o principal agente etiológico causador de infecções adquiridas na comunidade, como otite média e aguda, pneumonia e infecções invasivas como meningite e bacteremia. Tem o ser humano como seu único hospedeiro, podendo habitar a nasofaringe, muitas vezes de maneira assintomática, sendo assim considerado um microrganismo patogênico oportunista. (WHITMAN, 2009; TORTORA, 2012). As doenças pneumocócicas estão entre as maiores causas de morbimortalidade em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, afetando na maioria das vezes idosos acima dos 65 anos e crianças abaixo dos 5 anos de idade (OMS, 2021). Os sintomas mais comuns das doenças invasivas causadas pelo pneumococo incluem, febre acompanhada de calafrios e suor e tosse, dor no peito, fadiga, vômito e diarreia em caso de pneumonias. O tratamento é realizado através da administração de antibióticos e sua prevenção através da distribuição de vacinas, em conjunto com bons hábitos de higiene (OMS, 2021). Os antimicrobianos mais utilizados no tratamento das doenças pneumocócicas são os das classes dos beta-lactâmicos, quinolonas e macrolídeos, e para todos eles já existem relatos de cepas resistentes (CROUCHER *et al*., 2009; CERRATO *et al*., 2010; PHONGSAMART *et al.,* 2014).

As vacinas contra pneumococos foram licenciadas em todo o mundo no ano de 1977 e com o passar do tempo sofreram alterações como a troca da vacina

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

polissacarídica pela conjugada, gerando um grande progresso com sua inserção no PNI (Plano Nacional de Imunização), levando a queda considerável de doenças invasivas causadas por pneumococo e diminuição da taxa de mortes (BARRETO, 2013; IMOHL, 2015). Atualmente a vacina conjugada pneumocócica 10 valente (VPC - 10), contendo os 10 sorotipos mais prevalentes, está disponível nos postos de saúde pública para a população (SVS, 2014). Mesmo com o sucesso da introdução da vacina e disponibilização para o público, um dos fatores permissivos para que a doença pneumocócica ainda tenha um número considerável de casos e incidência frequente, é a diversidade de sorotipos capsulares do pneumococo, uma vez que já foi descrito que os sorotipos não vacinais são os mais comuns na ocorrência de infecções e que a vacinação possui grande influência na distribuição do mesmo (CAIERÃO, 2014; PHONGSAMART, 2014).

Hoje o diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas bacterianas é largamente realizado por métodos moleculares baseados na PCR principalmente para microrganismos fastidiosos como o pneumococo quando o cultivo da cepa nem sempre é possível (DE FILIPPIS *et al*., 2016). Quando se consegue obter o isolamento do agente etiológico é possível realizar testes laboratoriais convencionais para sua identificação e caracterização fenotípica e um dos testes considerados padrão-ouro para a identificação do pneumococo é a susceptibilidade à Opt. Estudos recentes, no entanto, relatam uma diminuição da susceptibilidade à Opt de cepas de penumococo que precisam ser identificadas por métodos adicionais como a PCR (NAGATA *et al.,* 2012; PINTO *et al.,*2013; SOUZA *et al.,*2021).

Resistência à optoquina

A determinação da susceptibilidade à optoquina é um método rápido e de baixo custo, muito utilizado em laboratórios clínicos para distinguir o *S. pneumoniae* de outras espécies estreptocócicas alfa-hemolíticas e com características morfológicas semelhantes. Entretanto, isolados que apresentam resistência a esta droga, colocam em prova a confiabilidade do teste no que se refere à identificação do patógeno (BOREK, 1997; KELLOGG, 2001; DIAS, 2007).

A optoquina, *Ethylhydrocupreine hydrochloride* (Opt), é um fármaco derivado do quinino, utilizado contra a malária, que no princípio era aplicada ao tratamento de pneumonia lobar, no início do século XX. Entretanto, o uso contínuo mostrou falhas no

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

tratamento e efeitos colaterais graves, sendo assim suspenso o seu uso para tratamento. No entanto, ficou evidente que através da observação da susceptibilidade do pneumococo à Opt, era possível diferenciá-lo de outros *Streptococcus* alfa-hemolíticos (FENOLL, 1994).

O mecanismo de ação da Opt se dá através da inibição do crescimento bacteriano, interagindo com a enzima ATPase, impedindo que cepas suscetíveis gerem novas moléculas de trifosfato de adenosina, essenciais ao seu metabolismo (NAGATA *et al*., 2012).

O operon da ATPase é formado pelos genes *atpA, atpB* e *atpC.* A resistência à Opt tem sido descrita por mutações pontuais no gene *atpC*, mais especificamente na subunidade F°F¹ do gene (DIAS *et al*., 2013; RADDAOUI *et al*., 2018), no entanto cepas Opt resistentes (Opt^R) com mutações nos genes *atpA* e *atpB*, têm sido descritas por outros autores (SOUZA *et al*., 2021; NAGATA *et al*., 2012). O aumento da resistência de pneumococos aos antimicrobianos, tem sido acompanhado pelo aumento da resistência à Opt.

O objetivo do presente estudo foi analisar uma coleção de cepas de pneumococos isoladas no Brasil no período pré e pós introdução da vacina conjugada 10-valente (PCV10) em relação á susceptibilidade aos antimicrobianos e investigar possíveis associações da diminuição da susceptibilidade à Opt com aumento da resistência a outros antibióticos e presença de clones epidêmicos por MLST.

MÉTODOS

Identificação dos isolados

Foram avaliadas 211 cepas isoladas de diferentes estados durante o período pré e pós vacinal de 2006 a 2021, neste estudo, considerando o período pós vacinal os anos posteriores à inclusão da vacina PCV10 que contém os sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, introduzida no calendário nacional do PNI no ano de 2010. Estas cepas fazem parte da Coleção de Pesquisa do Laboratório de Microrganismo de Referência do INCQS/FIOCRUZ. Os isolados foram identificados através de características morfológicas, além de detecção do gene *ply* por PCR, utilizando os primers: ply-1: 5'-GACCCCAGCAATTCAATTCAAGTGT-3' e ply-2: 5'-

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

TACGCACTAGTGGCAAATCG-3', descritos por DE FILIPPIS *et al.* 2016, gerando um fragmento de 1000bp exclusivo para a espécie.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A sensibilidade à Opt e aos antibióticos penicilina, levofloxacina, eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol foi determinada pelo método de disco difusão (Kyrbi-bauer) e confirmada pelo teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O antibiograma foi realizado em placas de ágar sangue com base Mueller Hinton, acrescido com 5% de sangue desfibrinado lisado de equino. As cepas Opt resistentes (Opt^R) foram classificadas pelo tamanho do halo, considerando resistente quando <14 mm (RADDAOUI et al., 2018). As demais classificações para os outros antibióticos testados, foram realizadas como descrito no manual EuCAST/ BrCAst e CLSI (EuCAST,2021; CLSI, 2018), manuais padrão utilizados internacionalmente com os parâmetros para a realização do antibiograma, além dos pontos de corte que determinam a resistência ou sensibilidade da amostra.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, foram submetidas ao método de antibiograma por concentração mínima - CIM, por fitas E-test para determinação quantitativa da resistência aos antibióticos específicos e os pontos de corte foram determinados conforme manual (EuCAST,2021; CLSI, 2018).

Análise dos mecanismos de resistência à optoquina

As cepas que apresentaram resistência a optoquina por disco-difusão (halo < 14mm), foram submetidas à PCR para detecção do gene *atpC*, responsável pela expressão da resistência, utilizando os primers foward 663: 5'-TCGAAAAGTGGATCAACAACTATCC-3' e reverse 1016: 5'-TGGGAAAGAAGAAGTAACAAACTCG - 3', descritos em DIAS *et al,* 2007. A amplificação deu origem a um fragmento de ~1006pb que foi submetido ao sequenciamento em sequenciador de DNA automático *Applied Biosystems 3730* da Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ.

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

Determinação dos sorotipos

Os sorotipos dos isolados foram determinados por PCR dos genes envolvidos na síntese dos polissacarídeos capsulares de acordo com DIAS et al., 2007.

Multilocus sequence typing (MLST)

As cepas que apresentaram baixa sensibilidade à Opt foram submetidas à análise por MLST de acordo com o protocolo descrito em https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae/. O sequenciamento dos genes constitutivos do MLST foi realizado na Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ em sequenciador de DNA automático *Applied Biosystems 3730*.

RESULTADOS

Duzentos e onze isolados de material clínico foram identificados através dos métodos fenotípicos e moleculares descritos anteriormente. Após confirmação da identidade as cepas foram preservadas por dois métodos diferentes, congelamento profundo em criotubo com caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol a -70°C e liofilização. As ampolas liofilizadas foram preservadas em freezer comum a -15°C. As cepas confirmadas foram catalogadas e incorporadas à Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) do INCQS/FIOCRUZ. Até a data de 24/01/2022, foram submetidos ao banco de dados de MLST 1331 dados de cepas de pneumococos isolados no Brasil incluindo as apresentadas nesse estudo. Dessas, 1264 foram classificadas em sorotipos. Os sorotipos presentes na PCV-10 utilizada no calendário nacional de vacinação foram detectados em 583 (46%) das cepas sorotipadas sendo: 14 (14%), 6B (9%), 23F (7%), 19F (6%), 18C (3%), 4 (2%), 7F (1,5%), 9V (1,3%), 5 (1%) e 1 (1%). As outras 681 (54%) cepas sorotipadas, apresentaram sorotipos não incluídos na vacina PCV-10. Entre esses estão os sorotipos 19A (16%), 6A (7%) e 3 (4%) que representam 27% do total de cepas sorotipadas. O sorotipo 19A é atualmente o que circula em maior proporção no país e está incluído apenas na PCV-13

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

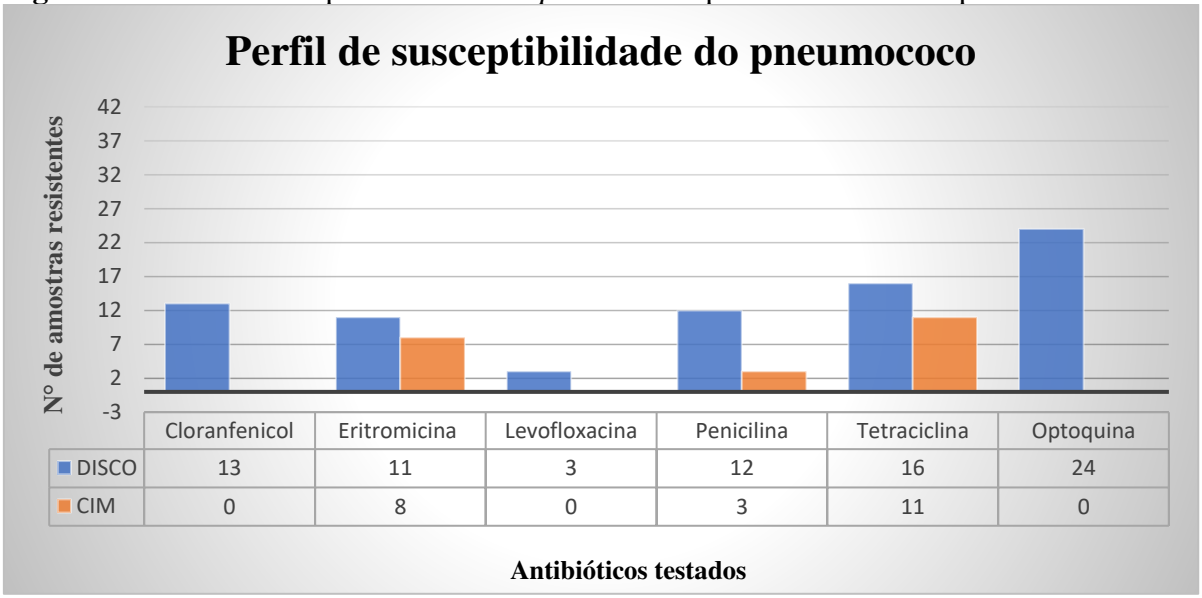
Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

que se fosse a vacina utilizada no calendário vacinal, teríamos 73% de cobertura dos sorotipos circulantes.

Em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos, após a identificação de todas as cepas, temos os seguintes resultados: das 211 cepas testadas, 35 apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos (16,5%). Além da resistência aos antibióticos, 24 cepas (11,4%) foram resistentes à Opt. Das 35 cepas resistentes aos antibióticos, apenas uma apresentou resistência à três classes de antibióticos testados por disco difusão, sendo classificada como multidroga resistente (MDR) segundo a classificação de MAGIORAKOS *et.al.,* 2012. Essa cepa não foi resistente à Opt. A resistência aos outros antibióticos foi confirmada através do CIM, observando uma maior expressão para a tetraciclina (8%) seguida por eritromicina (6,1%), penicilina (5,7%), levofloxacina (1,9%) e cloranfenicol (0,9%). Os valores de resistência, distribuídos de acordo com cada antibiótico estão representados na Figura 1.

Figura 1: Perfil de susceptibilidade de *S. pneumoniae* por disco-difusão e por CIM.



DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

Resistência à Optoquina

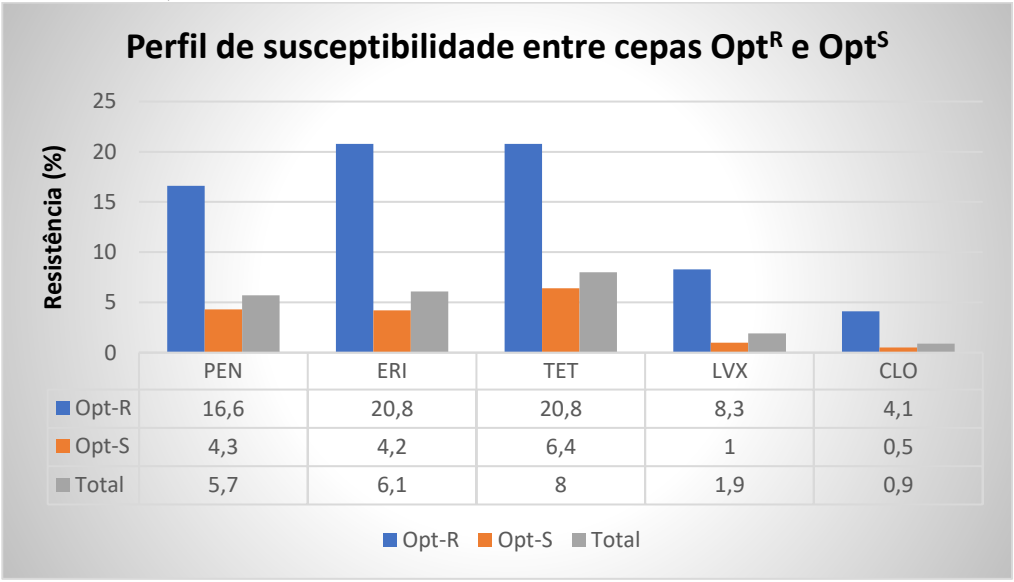
Do total de 211 cepas confirmadas como pneumococos, 24 (11,4%) foram resistentes à Opt, mas confirmadas como pneumococo pela PCR. Entre as cepas Opt^R, a proporção de cepas resistentes foi bastante superior quando comparamos a resistência entre as cepas Opt^S. A Figura 2 mostra essa comparação. As cepas Opt^R, foram submetidas ao sequenciamento de um fragmento de ~1009pb utilizando os primers descritos por DIAS *et al*., 2007. A região amplificada corresponde à subunidade *c* da região F_0F_1 do gene da ATPase. Não foram observadas as mutações pontuais descritas pelos autores como responsáveis pela diminuição da susceptibilidade à Opt após alinhamento comparativo pelo programa BioEdit (HALL, 1999). No entanto, após tradução das sequencias de nucleotídeos em aminoácidos pelo programa Transeq do pacote Emboss (acesso em: https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) encontramos algumas mutações nos genes *atpB* e *atpC* que poderiam ser responsáveis pelo fenótipo Opt^R. Adicionalmente, a análise das sequencias descritas por NAGATA *et al*., 2012, DIAS *et al*., 2013; RADDAOUI *et al*., 2018 e SOUZA *et al*., 2021 no banco de dados de MLST do *S. pneumoniae* (acesso em: https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae), indicou múltiplos alelos para as sequencias dos genes *atpA, atpB* e *atpC* de cepas OPT^R. Todas as sequencias descritas por DIAS *et al*., 2013 na região do gene *atpC*, foram classificadas como alelo 80 pelo banco de MLST. Das 24 cepas sequenciadas, foram obtidas 16 sequencias com qualidade satisfatória para a comparação dessas sequencias. Foram então encontradas 12 cepas com o mesmo alelo 80 e mais duas com alelo 59, uma com alelo 64 e uma com alelo 51. Todas portanto com diferentes mutações nessa região do gene da ATPase, o que sugere ser o mecanismo de resistência à Opt dessas cepas.

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

Figura 2. Comparação da susceptibilidade aos antimicrobianos entre as cepas resistentes e sensíveis à Opt. PEN=penicilina, ERI=eritromicina, TET=tetraciclina, LVX=levofloxacina, CLO=cloranfenicol.



Análise por MLST

Quinze cepas Opt^R foram analisadas pelo sequenciamento de sete genes constitutivos (MLST). O perfil de alelos para a definição dos *Sequence Types* (ST) foi submetido ao banco de dados de MLST de pneumococos em https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae. A análise dos perfis alélicos dessas cepas no banco de dados resultou em sete ST com 100% de concordância com ST já depositados no banco de dados, ST-15 (duas cepas), ST-156, ST-193, ST-646, ST-737, ST-2880 e ST-7186 sendo um por cepa. As outras sete cepas não apresentaram similaridade de 100% com nenhum ST já descrito e, portanto, são considerados novos ST e são eles: ST-17317, ST-17318, ST-17319, ST-17320, ST-17321, ST-17322 e ST-17323. Uma cepa não foi classificada. As relações filogenéticas entre as cepas Opt^R e as outras cepas do banco de dados que contém atualmente, 73.634 isolados depositados de todo o mundo sendo 1.324 do Brasil, foram analisadas através do *Minimum Spanning*

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Tree (MST). A análise mostra uma forte relação filogenética da maioria das cepas Opt^R com o ST-66. De fato, é possível agrupar vários ST já descritos e a maioria dos novos ST em um complexo clonal (cc) a partir do ST-66 que poderia ser chamado de cc66, já que esses ST apresentam quatro ou mais alelos em comum com o ST-66. Nesse grupo foram incluídos os ST- 737, ST-7186, ST-193, ST-156 já descritos e os novos ST-17317, ST-17318, ST-17319, ST-17320 e ST-17323 (Figura 3).

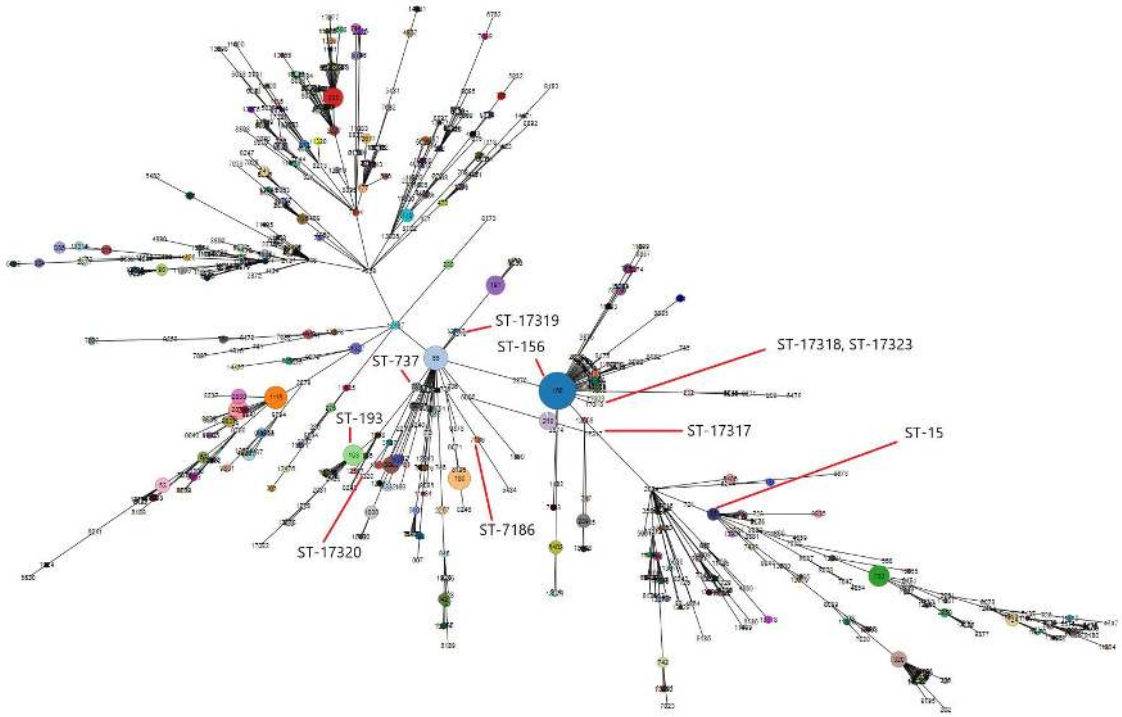


Figura 3. Análise filogenética por *Minimum Spanning Tree* (MST) dos ST descritos a partir das cepa Opt^R. Os ST associados ao cc66 e o ST-15 estão indicados por linhas vermelhas.

A Tabela 1 mostra a distribuição de todos os ST descritos nesse estudo e as relações dos ST, sorotipos e complexos clonais obtidas pela análise por MST.

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

Tabela 1. Relações entre os ST, sorotipos e complexos clonais obtidos após análise por MST. ND=não determinado.

ST	SOROTIPO	COMPLEXO CLONAL
15	14	15
156	14	66
193	18C	66
737	7C	66
2880	19ª	ND
7186	ND	66
17317	ND	66
17318	ND	66
17319	ND	66
17320	ND	66
17321	ND	ND
17322	ND	ND
17323	ND	66

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

DISCUSSÃO

A determinação da susceptibilidade à Opt, para a identificação do pneumococo é um método comumente utilizado em laboratórios de rotina, por ser uma técnica rápida e de baixo custo. Entretanto, os relatos de cepas resistentes ao antibiótico têm colocado em dúvida a real eficácia e confiabilidade do teste. Analisar e identificar o mecanismo de resistência presente nestas cepas é crucial para o desenvolvimento de medidas de controle, além de novos métodos que identifiquem e diferenciem o pneumococo de outros estreptococos e para entender as relações das cepas Opt^R com as cepas Opt^S. Nosso estudo mostrou um aumento de cepas com diminuição da susceptibilidade à Opt, com 11,4% das cepas apresentando o fenótipo Opt^R. Podemos considerar um número importante pois impacta diretamente na correta identificação de cepas patogênicas de *S. pneumoniae* do pneumococo em processos infecciosos envolvendo sepse, meningites, pneumonias, otites, entre outros cuja identificação acurada é imprescindível para um bom prognóstico tanto ema laboratórios públicos quanto privados.

De acordo com nossos resultados, podemos observar uma clara relação da diminuição da susceptibilidade aos antimicrobianos com o aumento da resistência à Opt, mostrando que o aumento da resistência evolui numa taxa mais rápida entre as cepas Opt^R. No entanto a única cepa resistente a três classes de antibióticos (eritromicina, penicilina e tetraciclina) classificada como MDR, não apresentou resistência à Opt.

Os ST obtidos após a análise por MLST e suas relações filogenéticas por MST das 16 cepas Opt^R mostrou que quatro cepas pertencentes a ST já descritos e 5 cepas com novos ST, agruparam com 4 ou mais alelos iguais ao ST-66. No banco de dados de MLST existem 321 cepas associadas ao ST-66, sem contar cepas que poderiam ser agrupadas no cc66. A grande maioria (83%) dessas cepas, foi isolada de diferentes processos infecciosos sendo 79% de doenças invasivas (meningites e sepse) o que é preocupante pois isso revela o potencial patogênico desse clone. Os sorotipos 9N e 19A são os mais associados a esse clone, sendo encontrados em 87% das cepas do ST-66. Essa característica é mais um fator de preocupação, pois esses dois sorotipos não estão incluídos na PCV-10 utilizada no Brasil. Além de cepas associadas ao ST-66, duas cepas foram classificadas como ST-15 que é um outro ST fortemente associado à

DOI: 10.29327/213319.22.2-2
Páginas 31 a 50

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

agravos importantes, sendo 77% das cepas isoladas de doenças invasivas e infecções respiratórias. Por outro lado, 93% dessas cepas que pertencem ao sorogrupo 14 que está incluído na PCV-10. Uma outra observação importante é que entre os ST já descritos, três (ST-737, ST-2880 e ST-7186) foram descritos apenas no Brasil. Dois desses ST estão associados a sorotipos que não estão nem na PCV-10 nem na PCV-13 (ST-737, sorotipo 7C; ST-7186, sorotipo 10F) e um está associado a um sorotipo presente apenas na PCV-13 (ST-2880, sorotipo 19A). Todas as cepas pertencentes a esses três ST, foram isoladas de doenças invasivas e respiratórias, apresentando um grande potencial de virulência.

A análise por MLST mostrou que há uma forte associação entre sorotipos e ST novos ou já descritos e que o sorotipo 19A está particularmente presente em diferentes ST com grande potencial de disseminação no país além de novos sorotipos que não estão presentes na PCV-13 utilizada pelo PNI no Brasil. A associação dessas cepas com cepas Opt^R e com susceptibilidade a outros antimicrobianos reduzida, é mais um fator de preocupação e sua circulação deve ser constantemente monitorada.

CONCLUSÃO

Com o constante crescimento das cepas resistentes não só a optoquina, mas em conjunto com os antibióticos utilizados no seu tratamento e profilaxia, é cada vez mais necessária uma identificação mais criteriosa. No caso do pneumococo é urgente a determinação de métodos que atuem em conjunto com o teste de susceptibilidade à optoquina, visando a diminuição de resultados falso negativos, tendo em vista que cepas resistentes à optoquina são consideradas não pneumocócicas, para assegurar um diagnóstico mais eficaz e possibilitar sucesso do tratamento ao paciente. Além disso, é de suma importância o monitoramento destes microrganismos com potencial de resistência, e da introdução de novos clones e novos sorotipos, para prevenir possíveis epidemias causadas por microrganismos multidroga resistentes não imunopreveníveis.

Agradecimentos

Agradecemos aos Laboratórios Centrais de Referência (LACEN-PE, LACENRJ, LACEN-BA) e Hospital Municipal Lourenço Jorge-RJ pelas amostras clínicas

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

fornecidas. Esta publicação fez uso do site Multi Locus Sequence Typing (https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae/) desenvolvido por Keith Jolley e localizado na Universidade de Oxford. O desenvolvimento deste site foi financiado pelo Wellcome Trust e pela União Europeia. Os autores agradecem ao núcleo de Sequenciamento "Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ."

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária – PPGVS (INCQS/FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), INCQS/FIOCRUZ e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

Declaração de conflito de interesse.
Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

BARRETO, BRUNO ACATAUASSÚ *et al*. Specific anti-pneumococcal polysaccharide antibody deficiency and humoral response to pneumococcal vaccines: Update on diagnosis. **Braz j allergy immunol**, são paulo, v.1, n. 5, p. 253-260, 2013.

BOREK AP, DRESSEL DC, HUSSONG J, PETERSON lr. Evolving clinical problems with streptococcus pneumoniae: Increasing resistance to antimicrobial agents, and failure of traditional optochin identification in chicago, illinois, between 1993 and 1996. Diagn microbiol infect dis. 1997 dec;29(4):209-14. Doi: 10.1016/s0732-8893(97)00141-7. Pmid: 9458976.

CAIERÃO J, HAWKINS P, SANT'ANNA FH, DA CUNHA GR, D'AZEVEDO PA, MCGEE L et al. (2014) serotypes and genotypes of invasive *streptococcus*

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

pneumoniae before and after pcv10 implementation in southern brazil. Plos one 9(10): E111129. Https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111129

CROUCHER NJ, WALKER D, ROMERO P, LENNARD N, PATERSON GK, BASON NC, MITCHELL AM, QUAIL MA, ANDREW PW, PARKHILL J, BENTLEY SD, MITCHELL TJ. Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone streptococcus pneumoniaespain23f st81. J bacteriol. 2009 mar;191(5):1480-9. Doi: 10.1128/jb.01343-08. Epub 2008 dec 29. Pmid: 19114491; pmcid: Pmc2648205.

DE FILIPPIS I, DE ANDRADE CF, CALDEIRA N, DE AZEVEDO AC, DE ALMEIDA AE. Comparison of pcr-based methods for the simultaneous detection of neisseria meningitidis, haemophilus influenzae, and streptococcus pneumoniae in clinical samples. Braz j infect dis. 2016 jul-aug;20(4):335-41. Doi: 10.1016/j.bjid.2016.04.005. Epub 2016 may 30. Pmid: 27256956.

DIAS CA, AGNES G, FRAZZON AP, KRUGER FD, D'AZEVEDO PA, CARVALHO MDA G, FACKLAM RR, TEIXEIRA IM. Diversity of mutations in the atpc gene coding for the c subunit of f0f1 atpase in clinical isolates of optochin-resistant streptococcus pneumoniae from brazil. J clin microbiol. 2007 sep;45(9):3065-7. Doi: 10.1128/jcm.00891-07. Epub 2007 jul 11. Pmid: 17626173; pmcid: Pmc2045260.

DIAS CA, TEIXEIRA IM, CARVALHO MDG, BEALL B. Sequential multiplex pcr for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from brazilian children. J med microbiol. 2007 sep;56(pt 9):1185-1188. Doi: 10.1099/jmm.0.47347-0. Pmid: 17761481.

EUCAST, 2021. European committee on antimicrobial susceptibility testing. Disponível em: Eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. Acesso em: Dez.2021.

FENOLL, A., MUÑOZ, R., GARCIA, E. AND DE LA CAMPA, A.G. (1994), molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: Characterization of the genes encoding the f0 complex of the *streptococcus pneumoniae streptococcus*

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

oralis h-atpases. Molecular microbiology, 12: 587-598. Https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01045.x+

HALL, T.A. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

IMÖHL M, MÖLLER J, REINERT RR, PERNICIARO S, VAN DER LINDEN M, AKTAS O. Pneumococcal meningitis and vaccine effects in the era of conjugate vaccination: Results of 20 years of nationwide surveillance in germany. Bmc infect dis. 2015 feb 14;15:61. Doi: 10.1186/s12879-015-0787-1. Pmid: 25885764; pmcid: Pmc4335684.

KELLOGG JA, BANKERT DA, ELDER CJ, GIBBS JL, SMITH MC. Identification of streptococcus pneumoniae revisited. J clin microbiol. 2001 sep;39(9):3373-5. Doi: 10.1128/jcm.39.9.3373-3375.2001. Pmid: 11526182; pmcid: Pmc88350.

MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, HARBARTH S, HINDLER JF, KAHLMETER G, OLSSON-LILJEQUIST B, PATERSON DL, RICE LB, STELLING J, STRUELENS MJ, VATOPOULOS A, WEBER JT, MONNET DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin microbiol infect. 2012 mar;18(3):268-81. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 jul 27. Pmid: 21793988.

MELO, VIVIANNE VIEIRA; DUARTE, IZABEL DE PAULA; SOARES, AMANDA QUEIROZ guia antimicrobianos / vivianne vieira de melo; izabel de paula duarte; amanda queiroz – 1.ed. - goiânia, 2012. 57f. Guia (coordenação de farmácia) – hospital das clínicas da universidade federal de goiás (hc-ufg).

MURRAY, PATRICK R; ROSENTHAL, KEN S;PFALLER, MICHAEL A. **Microbiologia médica**. 6° ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2009. 948p.

NAGATA, O. UEDA, T. SHOBUIKE, T. MURATANI, Y. AOKI AND H. MIYAMOTO, "Emergence of optochin resistance among *streptococcus pneumoniae* in

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

japan," *Open journal of medical microbiology*, vol. 2 no. 1, 2012, pp. 8-15. Doi: 10.4236/ojmm.2012.21002.

OMS, 2021. Disponível em: Https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia. Acesso em: 08. Dez. 2021.

PHONGSAMART W, SRIFEUNGFUNG S, CHATSUWAN T, MUNTHAPISUD P, TREERAUTHAWEERAPHONG V, RUNGNOBHAKHUN P, SRICHAROENCHAI S, CHOKEPHAIBULKIT K. Changing trends in serotype distribution and antimicrobial susceptibility of streptococcus pneumoniae causing invasive diseases in central thailand, 2009-2012. *Hum vaccin immunother*. 2014;10:1866–73. Doi:10.4161/hv.28675.

PINTO TC, SOUZA AR, DE PINA SE, COSTA NS, BORGES NETO AA, NEVES FP, MERQUIOR VL, DIAS CA, PERALTA JM TEIXEIRA LM. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant streptococcus pneumoniae isolates from brazil, with description of five novel mutations in the atpc gene. J clin microbiol. 2013 oct;51(10):3242-9. Doi: 10.1128/jcm.01168-13. Epub 2013 jul 24. Pmid: 23884994; pmcid: Pmc3811620.

RADDAOUI A, BEN TANFOUS F, ACHOUR W, BAABOURA R, BEN HASSEN A. Description of a novel mutation in the atpc gene in optochin-resistant streptococcus pneumoniae strains isolates from tunisia. Int j antimicrob agents. 2018 may;51(5):803-805. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.029. Epub 2018 jan 3. Pmid: 29305958.

RODRÍGUEZ-CERRATO V, GRACIA M, DEL PRADO G, HUELVES L, NAVES P, RUIZ V, PONTE C, SORIANO F. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant streptococcus pneumoniae strains with penicillin mics of 8 to 32 mg/l. Diagn microbiol infect dis. 2010 mar;66(3):336-8. Doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.015. Epub 2009 nov 25. Pmid: 19939599.4

SOUZA, A.R.V., DE PINA, S.E.C.M., COSTA, N.S. e*t al.* Description of optochin-resistant *streptococcus pneumoniae* due to an uncommon mutation in the *atpa* gene and comparison with previously identified *atpc* mutants from brazil. *Sci rep* **11,** 7936 (2021). Https://doi.org/10.1038/s41598-021-87071-8

Temas em Saúde
Volume 22, Número 2
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2022

Artigo

SVS, 2014. Disponível em: Https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_vacinacao.pdf. Acesso em: 8.Dez. 2021.

TORTORA, GERARD J; FUNKE, BERDELL R; CASE, CHRISTINE L. **Microbiologia**. 10° ed. Porto alegre: Artmed, 2012. 967p.

WHITMAN, WILLIAM B. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 3°ed. Nova york: Springer, 2009. 1450p.