UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA

CAMILA FERNANDA LEITE ROSEGHINI

Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá–PR

Maringá
2012

CAMILA FERNANDA LEITE ROSEGHINI

Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá–PR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Lourdes Botelho Garcia

Maringá
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA FERNANDA LEITE ROSEGHINI

Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá–PR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.ª Dr.ª Lourdes Botelho Garcia
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Jorge Juarez Vieira Teixeira
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso
Universidade Estadual de Maringá

Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Bronharo Tognim
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 21 de dezembro de 2012.

Local de defesa: Sala 110, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIAS

Dedico esta dissertação aos meus pais, Edson Luis Roseghini e Leni Leite Roseghini que, mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram presentes em meus pensamentos. E, apesar das dificuldades vivenciadas, me apoiaram a dar este grande passo. Estas duas pessoas que com sabedoria, me conduziram ao caminho da honestidade e perseverança, o que impulsionou-me a chegar há esse momento ilustre em minha vida. Obrigada por serem meus pais, pessoas que realmente sempre estiveram ao meu lado. Sei que nestes ombros, poderei apoiar-me em todos os momentos em que eu necessitar durante a minha jornada.

Aos meus irmãos, Luana Carolina Leite Roseghini e Ruy Roseghini Neto, e que esta sirva de incentivo e motivação para a realização de seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Prof[a]. Dr[a]. Lourdes Botelho Garcia, orientadora desta dissertação, por sua sabedoria, motivação, compreensão e, acima de tudo, exigência, através de suas correções, revisões de métodos e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho. Uma pessoa e profissional de ilustre competência, sendo-me exemplo de total determinação, disciplina e honestidade, os quais levarei por onde eu caminhar com muito carinho e estima.

À Prof[a]. Dr[a]. Maria Cristina Bronharo Tognim, por seu apoio científico e emocional e contribuições com sábias idéias.

Ao Prof. Dr. Celso Luis Cardoso pela sua colaboração na avaliação dos métodos, paciência e competência incomum.

Ao Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho, por sempre incentivar-me na busca do crescimento, suas sábias palavras de conforto e estímulo para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Juarez Vieira Teixeira, por disponibilizar de seu tempo contribuindo com sugestões e discussões enriquecedoras para a concretização deste trabalho.

Às Pós-Graduandas do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia Kelly Cristina Suzue Iamaguchi Luz e Aline Pussi de Brito e à acadêmica do Curso de Enfermagem do CESUMAR Adriana Medeiro Chicareli pelo apoio e auxílio na coleta de dados.

A todos os meus amigos que se fizeram presentes, que se preocuparam, que foram solidários e torceram por mim. Prefiro não citar nomes, pois posso cometer o equívoco esquecendo pessoas que me foram essenciais nesta jornada. Parceiros de laboratório, de apoio emocional e espiritual, um carinhoso agradecimento a todos que se fizeram presentes e que de alguma forma contribuíram para o término do meu trabalho.

Ao meu primo Leandro Negri Peres, por ter sido um grande e verdadeiro amigo, contribuindo com seu apoio e otimismo sem igual.

Aos Funcionários do Setor de Microbiologia Básica pela hospitalidade e auxílio na realização deste estudo.

À Luciane Menchon Moura da Silva, secretária do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia, por sua força, entusiasmo e otimismo contagiantes perante minhas agendas e meus compromissos, sendo prestativa, dedicada e competente ao sanar minhas dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio, financiamento concedido e incentivo a pesquisa.

Aos idosos que participaram desse estudo, os meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.
(FRANCISCO CÂNDIDO XAVIER)

Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá–PR

RESUMO

Streptococcus pneumoniae ou pneumococo coloniza a superfície da naso e orofaringe concedendo aos indivíduos saudáveis a condição de portador, entretanto, na presença de fatores predisponentes, a sua multiplicação evolui para um processo infeccioso, com o desenvolvimento de doenças localizadas ou sistêmicas. Investigações de *S. pneumoniae* na colonização em idosos são pouco frequentes, já que a maioria dos estudos é direcionado a caracterizar colonização em crianças. O presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência de *S. pneumoniae* na nasofaringe de idosos, moradores ou não de Instituições de Longa Permanência para Idoso no Município de Maringá-PR. Secreção da nasofaringe de 653 indivíduos, sendo 325 institucionalizados e 328 não institucionalizados, foi coletada no período de novembro de 2011 a outubro de 2012. A identificação das amostras isoladas foi realizada pela coloração de Gram, pelos testes de optoquina e bile solubilidade e pela pesquisa do gene *Lyt*A. A susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos foi realizada por disco difusão. Adicionalmente, a concentração inibitória mínima da penicilina foi determinada por *Etest.* A taxa geral de isolamento de *S. pneumoniae* na população estudada foi de 1,5% (10/653), sendo de 0,9% (3/325) no grupo de indivíduos institucionalizados e de 2,1% (7/328) em indivíduos não institucionalizados. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre colonizados e não colonizados em relação ao gênero, ao relato de sintomatologia aguda, presença de doenças crônicas, uso de prótese dentária e ao estado vacinal. Os fatores de risco associados de forma significativa ($p < 0,05$) à taxa de isolamento de *S. pneumoniae* em idosos não institucionalizados foram o gênero, uso contínuo de medicamento, hábito de fumar e presença de fumante. Para os indivíduos institucionalizados nenhum fator de risco pesquisado apresentou significância. Apenas uma das dez amostras isoladas apresentou resistência intermediaria à penicilina. Três amostras foram resistentes a clindamicina e duas foram consideradas multirresistentes, apresentando resistência aos β-lactâmicos tetraciclina, sulfametoxazol/trimetropim e macrolídeos. Nosso estudo evidenciou que a frequência de *S. pneumoniae* nos grupos estudados foi baixa, indicando um baixo índice de portadores na população idosa investigada.

Palavras chave: *Streptococcus pneumoniae.* Pneumococo. Sorotipos. Portador. Nasofaringe. Idoso. Epidemiologia.

Frequency on *Streptococcus pneumoniae* in institutionalized and noninstitutionalized elderly in Maringá-PR

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae colonizes the mucosal surface of the nasal cavity and oropharynx, providing the healthy individuals the condition of carrier, however in the presence of some predisposing factors, its multiplication rises into an infectious process, having development of focal or systemic diseases. On the susceptibility of the elderly population in acquiring opportunistic infections with pneumococcal, the current study aimed to investigate the prevalence of *S. pneumoniae* in nasopharynx of individuals aged 60 years or more, goers or not of long-term institutions in Maringá-Paraná. Furthermore, the profile of sensitivity to antimicrobial agents of isolated strains was assessed. Nasopharyngeal specimens of 653 individuals, 325 institutionalized and 328 non-institutionalized, was collected from November 2011 to October 2012. The identification of the strains was performed by Gram staining and tests for optochin, bile solubility and the gene *LytA*. The antimicrobial susceptibility of the strains indicated in the treatment of pneumococcal infections was performed by disk diffusion. In addition, the minimum inhibitory concentration of penicillin for all samples was determined by Etest. The overall rate of isolation of *S. pneumoniae* in the studied population was 1.5% (10/653), since 0.9% (3/325) in the group with institutionalized individuals and 2.1% (7/328) in non-institutionalized individuals. There was significant difference ($p < 0,05$) between the studied groups in relation to gender, the report of acute symptomatology, chronic diseases, use of denture and vaccination status. Risk factors significantly associated ($p < 0.05$) the rate of isolation of *S. pneumoniae* in non-institutionalized older adults were gender, continuous use of medication, smoking and presence of smokers. For institutionalized individuals, no risk factors studied showed significance. Intermediate resistance to penicillin was presented in one of the isolates (16.7%). Three samples (50%) were resistant to clindamycin and two (33.3%) were considered multiresistant. Our outcomes showed that the prevalence of *S. pneumoniae* in both groups was low, indicating a low rate of carriers in the elderly population of Maringá.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae.* Pneumococcus. Carrier. Nasopharynx. Elderly. Epidemiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Seqüência de iniciadores utilizados pela técnica de PCR para a caracterização dos sorotipos das amostras de *S. pneumoniae* isoladas de portadores.....43

Tabela 2 Características epidemiológicas e taxa de colonização por *S. pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá-PR.....44

Tabela 3 Distribuição da população de indivíduos institucionalizados em relação ao número de coletas realizadas por ILPI e prevalência de *S. pneumoniae*.....45

Tabela 4 Associação dos dados socioepidemiológicos com o isolamento de *S. pneumoniae* da nasofaringe dos 325 idosos institucionalizados no Município de Maringá-PR.....46

Tabela 5 Associação dos dados socioepidemiológicos dos 328 idosos não institucionalizados segundo positividade por *S. pneumoniae*, Maringá-PR, 2012.....47

Tabela 6 Resultados dos testes de **s**usceptibilidade aos agentes antimicrobianos de *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe de portadores no Município de Maringá-PR.....49

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: Journal of Clinical Microbiology
Disponível em:
http://jcm.asm.org/site/misc/2012AugustJCMITA.pdf

SUMÁRIO

1 Capítulo I.....14
1.1 Introdução.....14
1.2 Justificativa.....18
1.3 Objetivos.....18
1.4 Referências Bibliográficas.....19
2. Capítulo II.....23
2.1. Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá–PR.....24
2.2. Resumo.....25
2.3. Introdução.....27
2.4. Materiais e Métodos.....28
2.4.1. População estudada.....28
2.4.2. Descrição do estudo.....29
2.4.3. Coleta do material clínico.....30
2.4.4. Cultivo dos espécimes.....30
2.4.5. Identificação fenotípica das amostras isoladas.....31
2.4.6. Identificação genotípica das amostras isoladas.....32
2.4.7. Susceptibilidade a antimicrobianos.....35
2.4.8. Estoques das amostras.....36
2.4.9. Análise estatística.....36
2.4.10. Preceitos éticos do estudo.....36
2.5. Resultados.....37
2.6. Discussão.....39
2.7. Agradecimentos.....50
2.8. Referências Bibliográficas.....50
3. Capítulo III.....55
3.1 Conclusões.....55
3.2 Perspectivas Futuras.....56
4. Anexo A: Carta de apresentação.....57
5. Anexo B: Carta de autorização.....58
6. Anexo C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....59

7. Anexo D: Formulário Epidemiológico – indivíduos institucionalizados.....63
8. Anexo E: Formulário Epidemiológico – indivíduos não institucionalizados.....64
9. Anexo F: Instructions to authors – Journal Clinical Microbiology……..67

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae ou pneumococo é uma bactéria Gram positiva, capsulada, que pode colonizar a superfície mucosa da naso e orofaringe, coexistindo com a microbiota normal do trato respiratório superior, concedendo aos indivíduos a condição de portador. Entretanto, na presença de fatores predisponentes, a sua multiplicação evolui para um processo infeccioso, com o desenvolvimento de doença localizada ou sistêmica, o que representa uma importante causa de morbimortalidade principalmente em crianças e idosos. O surgimento das doenças pneumocócicas depende da colonização prévia do trato respiratório com a cepa homóloga. Desta forma, os portadores assintomáticos, assumem papel importante na disseminação horizontal deste patógeno na comunidade[1-5].

A colonização da naso e orofaringe pelo penumococo é intermitente e sua incidência varia conforme a população estudada, sendo maior em crianças e em comunidades fechadas, com maior frequência durante o inverno e primavera. A colonização se dá desde os primeiros dias após o nascimento da criança, pelo contato com a mãe, atingindo a taxa máxima na idade pré escolar, diminuindo nos adultos e voltando a aumentar nas idades mais avançadas[6].

A colonização por *S. pneumoniae* requer fatores de aderência no revestimento epitelial do trato respiratório. A colonização assintomática envolve a ligação do pneumococo a hidratos de carbono da superfície celular (N-acetil-glicosamina) no epitélio não inflamado. A adesão a estes açúcares é mediada por proteínas de parede celular associadas à superfície, tais como adesina pneumocócica[4]. Além disso, as proteínas de superfície contribuem para as características hidrofóbicas e eletrostáticas dos pneumococos facilitando a aderência à células hospedeiras, em parte, através de interações físico-químicas não específicas[7].

A transmissão do penumococo ocorre através da colonização da nasofaringe de portadores e/ou de infecções pneumocócicas permitindo a transferência do penumococo entre a superfície mucosa. Entretanto, nem todas as aquisições de pneumococos resultam em doença e a bactéria pode permanecer presente no organismo por apenas um período de tempo[4, 8, 9]. O inverno é considerado o período do ano de alto risco para a transmissão do pneumococo devido à convivência em ambientes fechados e aglomerados, a falta de ventilação adequada ou ao aumento da incidência de infecções virais, como a gripe e apontam para a necessidade de cuidado especial durante este período, assim como a importância de

novos estudos para compreender o mecanismo exato de maior transmissão nos meses de inverno[10].

Vários fatores influenciam as taxas de colonização por pneumococo na nasofaringe. Em crianças, os que mais interferem nessa variação são a idade, o tipo de moradia, convívio em creche infantil, número de irmãos, doença respiratória aguda, dieta (amamentação materna versus mamadeira), posição ao dormir. Em adultos, alguns outros fatores também estão envolvidos na colonização, tais como presença de crianças em casa ou no local de trabalho, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), obesidade, imunossupressão, condições alérgicas, sinusites agudas, etc...[8].

A taxa de portadores de pneumococos é variável e depende principalmente da idade[8]. Estudos em diversas partes do mundo têm demonstrado que a taxa de crianças portadoras de pneumococo é bastante variável oscilando desde 19,4% a 89,5%[1, 11-17]. Já em adultos a taxa de portadores de pneumococo é significativamente menor, variando de 4% a 10,3%, aumentando gradativamente em idosos num percentual de até 16,1%[18-22].

Dados demonstram uma diminuição significativa da prevalência da colonização de *S. pneumoniae* com o aumento da idade, apesar de uma leve elevação na senilidade, porém ainda em menor quantidade em se comparando com crianças[6, 19, 21, 22]. O declínio da taxa de portadores associado com aumento da idade reflete a aquisição gradual da imunidade da mucosa para os sorotipos de penumococos presentes na comunidade como também a redução da exposição, ou do contato permanente com crianças[3, 23].

A cápsula polissacarídica do pneumococo é uma estrutura bastante variável, e suas diferenças químicas e antigênicas permitem a classificação desta bactéria em 93 sorotipos distintos, o que aumenta o desafio de diagnóstico e dificulta ainda mais o desenvolvimento de pesquisas e produção de vacinas[24-26]. Estima-se que destes sorotipos, 11 sejam responsáveis por 75% das infecções pneumocócicas em todo o mundo, sendo a maioria colonizante, cuja distribuição difere por faixa etária, sintomatologia clínica e região geográfica[6, 8, 27, 28]. O conhecimento dos sorotipos e da prevalência de portadores de pneumococos tem sua importância epidemiológica na distribuição das doenças pneumocócicas no mundo e na definição da composição das vacinas.

O estudo das doenças pneumocócicas invasivas e da prevalência de portadores de pneumococos é de grande importância, principalmente em países onde a vacina pneumocócica está sendo introduzida[3]. Os polissacarídeos capsulares são a base primária da patogenicidade e da sorotipagem dos pneumococos. Os sorotipos 6, 14 e 19 são os mais

prevalentes na população idosa, porém, investigações de *S. pneumoniae* tanto na colonização faríngea como nos quadros invasivos em idosos são pouco conhecidos em nosso meio já que a maioria dos estudos são direcionados a caracterizar as cepas isoladas de crianças[20].

O estudo de portadores de pneumococos, é necessário para determinar com maior precisão as doenças pneumocócicas, monitorar a introdução de vacinas avaliando seu impacto em relação a distribuição dos sorotipos, além de alterações entre doenças pneumocócicas, padrões de resistência antimicrobiana e sua disseminação. As vacinas pneumocócicas reduzem a taxa nasofaríngea dos sorotipos nelas presentes, o que resulta em diminuição da transmissão comunitária e proteção de crianças e adultos, mesmo entre os não vacinados[5].

A vacina pneumocócica 23-valente (pneumo 23) inclui uma mistura de polissacarídeos capsulares, não conjugados, de 23 sorotipos de pneumococo (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F). É indicada para a imunização de crianças acima de 2 anos, adultos e idosos, e está incluída no Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde, com eficácia de 60% a 70% contra os sorotipos nela presentes[6]. Essa vacina está disponível desde a década de 1990 nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIES) para grupos populacionais especialmente suscetíveis ao *S. pneumoniae*.[6].

No ano de 1992, a vacina pneumo 23 foi incorporada pelo Programa Nacional de Imunizações, para grupos com quadros clínicos específicos. A partir de 1999, passou a ser aplicada durante a Campanha Nacional de Vacinação do Idoso, em habitantes de instituições fechadas[29]. Entretanto, várias regiões do mundo, inclusive no Brasil, a cobertura vacinal é escassa, devido a barreiras para sua introdução no sistema de saúde que incluem preocupações com o custo da vacina, com a cobertura de sorotipos de pneumococo na região, e falta de estimativas de incidência de doenças[5].

Pilishvili *et al*. (30) observaram que, com a introdução de vacinas conjugadas de pneumococo houve uma redução da doença pneumocócica invasiva (DPI), causada por sorotipos presentes nas vacinas, porém, identificaram aumento no número de casos pelos sorotipos não inclusos. Portanto, parte da estratégia para prevenir a doença pneumocócica incide sobre a prevenção da colonização, especialmente em crianças, sendo elas, portadoras e disseminadoras em potencial do pneumococo na comunidade[3].

Os idosos constituem um grupo heterogêneo com características bastante peculiares. A prevalência de múltiplas condições crônicas e incapacidade funcional é mais elevada entre esses indivíduos, além da vulnerabilidade aumentada em adquirir certas infecções[31].

Variações nas condições de saúde, no bem-estar, na capacidade funcional e nas necessidades de cuidado distinguem diferentes grupos de idosos[32].

Idosos, além de crianças e pessoas com imunodeficiência, compõe um grupo de risco para desenvolver doenças pneumocócicas que variam desde pequenas infecções como otite média aguda (OMA) e sinusite, até infecções altamente invasivas como pneumonia, meningite, septicemia e raramente artrite, peritonite e celulite[3, 4, 20, 33]. Adicionalmente, em relação à meningite pneumocócica, idosos e indivíduos portadores de doenças crônicas ou imunossupressoras apresentam maior risco de adoecimento[34]. Estudos epidemiológicos sobre as condições e determinantes da saúde do idoso são fundamentais para subsidiar políticas de saúde voltadas a essa população.

Um dos grandes desafios em relação ao controle das doenças pneumocócicas é o surgimento de cepas resistentes à penicilina, considerada a droga de escolha para o tratamento. Este problema é observado cada vez com mais frequência na prática clínica, especialmente em infecções invasivas causadas por este microrganismo. Diversos estudos têm demonstrado uma incidência crescente de isolamento de cepas não susceptíveis a antimicrobianos, principalmente à penicilina[20, 35]. Isso é motivo de grande preocupação para os países em desenvolvimento, nos quais o maior custo de drogas alternativas pode comprometer os programas de controle das doenças respiratórias agudas. Vários desses países realizam estudos de vigilância da resistência do *S. pneumoniae* à penicilina, para avaliar a magnitude do problema, e identificar os principais fatores associados à emergência da resistência do pneumococo e os principais sorotipos envolvidos, contribuindo para o desenvolvimento de uma vacina polissacarídica conjugada[36].

Estudos de portadores de pneumococo indicam que a disseminação de isolados resistentes ou multirresistentes pode ocorrer na comunidade, contribuindo para o surgimento de doenças de difícil tratamento[37]. Este fato reforça a necessidade de implementar sistemas de monitoramento para determinar a incidência desse fenômeno e desenvolver estratégias para a prevenção das infecções por pneumococos multirresistentes[38, 39].

No Brasil, o envelhecimento populacional tem ocorrido de forma rápida e acentuada, onde a projeção da população brasileira para 2050, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística[40] terá uma representação de 13,15% por crianças de 0 a 14 anos, ao passo que a população idosa ultrapassará os 22,71% da população nacional. E por esta ser uma população em crescimento e mais acometida por penumonia causada pelo pneumococo, é

importante que sejam contínuas as pesquisas relacionadas a prevenção e tratamento, além de estudos de frequencia de *S. pneumoniae* em individuos sadios desta faixa etária[41].

JUSTIFICATIVA

Os idosos pertencem a um grupo de risco importante para contrair enfermidades pneumocócicas. A escassez de dados sobre a prevalência de *S. pneumoniae* entre idosos sadios em nosso meio é fato, sendo de grande importância a realização de estudos regionais nesta faixa etária sobre a distribuição de portadores de pneumococos, a caracterização epidemiológica das amostras isoladas em relação à resistência aos antibióticos e à prevalência de sorotipos.

OBJETIVOS

Geral

Investigar a frequência de *S. pneumoniae* na nasofaringe de portadores sadios da comunidade e de instituições de longa permanência para idosos no Município de Maringá-Paraná.

Específicos

Avaliar os fatores de risco para a aquisição do pneumococo.

Identificar as cepas de *S. pneumoniae* por meio de técnicas fenotípicas e genotípicas.

Analisar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras isoladas.

Determinar a freqüência dos principais sorotipos entre os portadores, através da tipagem das amostras de *S. pneumoniae* isoladas.

Referências bibliográficas:

1. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between Nasopharyngeal Colonization and the Development of Otitis Media in Children. J Infect Dis, 1997. v 175 p. 1440–1445.
2. O'Brien Kl, Santosham M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric peneumococcal diseases. Am J Epidemiol, 2004. v 159 p. 634-644.
3. Bogaert D, Groot R; Hermans WM. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis, 2004. v. 4, p. 144-154.
4. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat Rev Microbiol, 2008. Apr; 6(4):288-301.
5. Valenzuela MT, O'Loughlin R, De La Hoz F, Gomez E, Constenla D, Sinha A, Valencia JE, Flanery B, De Quadros CA. The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. Rev Panam Salud Publ, 2009. v 25(3):270-279.
6. Sociedade Brasileira De Imunizações. Informativo. Doenças Invasivas Pneumocócicas (DIP) Importância e Impacto na Saúde. Ano II n. 12. Abr 2008. Disponível em: <http://www.sbim.org.br/sbim_info_doenca_pneumococica.pdf> Acesso em: 24 jul 2011.
7. Swiatlo E, Champlin FR, Holman SC, Wilson WW, Watt JM. Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2002. v 70:412–415.
8. Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo Martinez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. J Antimicrob Chemother, 2002. v 50 (Suppl S2):59-73.
9. Palmu AA, Kaijalainen T, Saukkoriipi A, Leinonen M, Kilpi TM. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and pneumococcal urine antigen test in healthy elderly subjects. Scand J Infect Dis, 2012. v 44, pp 433-438.
10. Levine H, Balicer RD, Zarka S, Sela T, Rozhavski V, Cohen D, Kayouf R, Ambar R, Porat N, Dagan R. Dynamics of Pneumococcal Acquisition and Carriage in Young Adults during Training in Confined Settings in Israel. PLoS ONE 2012. v 7(10): e46491.

11. Chiou CCC, Liu YC, Huang TS, Wen-Kuei HW, Wang JH, Lin HH, Yen MY, Hsieh KS. Extremely High Prevalence of Nasopharyngeal Carriage of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* among Children in Kaohsiung, Taiwan. J Clin Microbiol, 1998. v 36, No. 7, p. 1933–1937.
12. Jebaraj R, Cherian T, Raghupathy P, Brahmadathan KN, Lalitha MK, Thomas K, Steinhoff MC. Nasopharyngeal colonization of infants in southern India with *Streptococcus pneumoniae.* Epidemiol Infect*,* 1999. v 123, p. 383-388.
13. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Davies TA, Katopodis GD, Appelbaum PC, Beratis NG. Antimicrobial Use and Colonization with Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greece during the First 2 Years of Life. Clin. Infect Dis, 2000. v 31 p. 887–893.
14. Chiu SS, Ho PL, Chow FKH, Yuen KY, Lau IL. Nasopharyngeal Carriage of Antimicrobial-Resistant *Streptococcus pneumoniae* among Young Children Attending 79 Kindergartens and Day Care Centers in Hong Kong. Antimicrob Agents Chemother, 2001. v 45 p. 2765–2770.
15. Soewignjo S, Gessner BD, Sutanto A, Steinhoff M, Prijanto M, Nelson C, Widjaya A, Arjoso S. *Streptococcus pneumoniae* Nasopharyngeal Carriage Prevalence, Serotype Distribution, and Resistance Patterns among Children on Lombok Island, Indonésia. Clin Infect Dis, 2001. v 32 p.1039–1043.
16. Reis JN, Palma T, Ribeiro GS, Pinheiro RM; Ribeiro CT, Cordeiro SM, Filho HPS, Moschioni M, Thompson TA, Spratt B, Riley LW, Barocchi MA, Reis MG, Ko AI. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an Urban Slum Community. J Infect, 2008. v 57 (3). p 204-213.
17. Ercibengoa M, Arostegi N, Marimón JM, Alonso M, Pérez-Trallero E. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results BMC Infect Dis, 2012. 12:69.
18. Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainbeg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* by Adults and Children in Community and Family Settings. Clin Infect Dis 2004, v 38: p 632-639.
19. Watt JP, O'brien KL, Katz S, Bronsdon MA, Elliott J, Dallas J, Perilla MJ, Reid R, Murrow L, Facklam R, Santosham M, Whitney CG. Nasopharyngeal versus

Oropharyngeal Sampling for Detection of Pneumococcal Carriage in Adults. J Clin Microbiol, 2004. v. 42. p. 4974–4976. n. 11.

20. Altuzarra RH, Valenzuela BMT, Trucco AO, Inostroza JS, Granata PS, Fleiderman JV. Portación nasal de *Streptococcus pneumoniae* en adulto mayor y su respuesta frente a la vacunación antineumocócica. Rev Méd Chile, 2007. v. 135, n. 2.
21. Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott AG. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi District, Kenya. Pediatr Infect Dis J, 2008. v 27 (1). P 59-64.
22. Flamaing J, Peetermans WE, Vandeven J, Verhaegen J. Pneumococcal colonization in older persons in a nonoutbreak setting. J Am Geriatr Soc, 2010. v. 58 nº 2, p. 396-398.
23. Obaro S, Adegbola R. The *pneumococcus*: carriage, disease and conjugate vaccines. J Med Microbiol v 51 p. 98-104. 2002.
24. Morrison KE, Lake D, Crook J, Carlone GM, Ades E, Facklam R, Sampson JS. Confirmation of psaA in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identifycation and diagnosis. J Clin Microbiol 2000; 38:434 – 437.
25. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftadeh S, Zhou F, Liu C, Russell F, Gilbert GL. First Report of Putative S*treptococcus pneumoniae* Serotype 6D among Nasopharyngeal Isolates from Fijian Children. J Infect Dis, 2009. v 200 p1375–1380.
26. Calix JJ, Nahm MHA. New Pneumococcal Serotype, 11E, Has a Variably Inactivated *wcjE* Gene. J Infect Dis, 2010. v 202(1) p. 29–38.
27. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, Part I. Clin Infect Dis, 2000. v 30, p 100-121.
28. Vieira AC, Gomes MC, Rolo FM, Eudes FJ, Bello EJM, Figueiredo RB. *Streptococcus pneumoniae*: estudo das cepas isoladas de líquor. J Pediatr, 2007. Rio de Janeiro. v 83(1). P. 71-78.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança. Incorporação março 2010. Brasília, 2010.
30. Pilishvili T, Lexau C, Farley MMF, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beal BWl, Whitney CG, Moore MR.

Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. J Infect Dis, 2010. 201:32–41.

31. Almeida JR, Franco FOF. Pneumonias adquiridas na comunidade em pacientes idosos: aderência ao Consenso Brasileiro sobre Pneumonias. J Bras Pneumol, 2004. v 30(3) p: 229-236.
32. Crews DE, Zavotka S. Aging, disability, and frailty: implications for universal design. J Physiol Anthropol; 2006. 25:113-118.
33. Ruvinsky RO. *Streptococcus pneumoniae:* Epidemiología y resistencia a antimicrobianos de las enfermedades invasoras en Latinoamérica. Rev Chil Infectol, 2001. Santiago, v.18. Suplemento.
34. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 6ª Ed. Brasília, 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/febre_purpurica_gve.pdf> Acesso em: 20 jul 2011.
35. Sáfadi MAP. Critérios sorológicos de proteção contra doença invasiva em crianças após vacina pneumocócica conjugada. Rev Bras Med, 2007. p. 251-255.
36. Rey LC, Wolf B, Moreira JLB, Verhoef J, Farhat CK. *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe de crianças sadias e com pneumonia: taxa de colonização e suscetibilidade aos antimicrobianos. J Pediatr, 2002. v.78, n.2, p.105-112.
37. Velásquez PA, Parussolo L, Cardoso Cl, Tognim MC, Garcia LB. High prevalence of children colonized with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in public day-care centers. J Pediatr, 2009. Rio de Janeiro. v 85(6) p. 516-522.
38. Prado DP, Perret PC. *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) resistente en pediatría: Tendencia actual. Rev Chil Pediatr, 2001. Santiago, v 72 p. 49-51.
39. Hill PC, Akisanya A, Sankareh K, Cheung YB, Saaka M, Lahai G, Greenwood BM, Adegbola RA. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian Villagers. Clin Infect Dis, 2006. v 43 p 673-679.
40. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeções da população. Projeção da população do Brasil: 1980-2050. 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/> Acesso em: 24 jul. 2011.
41. Woodread M. Pneumonia in the elderly. J Antimicrob. Chemother. 1994. Suppl. A, p 85-92.

CAPÍTULO II

Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá–PR

Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá-PR

Authors names and affiliations: Camila F. L. Roseghini[1], Kelly C. Iamaguchi-Luz[1], Aline P. de Brito[1], Maria C. B. Tognim[1], Celso L. Cardoso[1], Jorge J. V. Teixeira[2], Lourdes B. Garcia[1].

[1]Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790. CEP 87020-900. Maringá, Paraná, Brazil.

[2]Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790. CEP 87020-900. Maringá, Paraná, Brazil.

Correspondent footnote: *Corresponding author. Mailing addres: Laboratório de Microbiologia Básica, Departamento de Ciências Básicas da Saúde Bloco I-90, Universidade Estadual de Maringá sala 114. Avenida Colombo, 5790 CEP 87020-900, Maringá-PR. Tel: (44) 3011-4952 Fax: (44) 3011-5941 E-mail: lbgarcia@uem.br

Frequência de *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá-PR

RESUMO

Investigações de *S. pneumoniae* na colonização faríngea em idosos são pouco conhecidos, já que a maioria dos estudos é direcionado a caracterizar as cepas isoladas de crianças. O presente estudo teve como objetivo investigar a frequência de *S. pneumoniae* na nasofaringe de indivíduos habitantes ou não de Instituições de Longa Permanência para Idoso no Município de Maringá-Paraná, Brasil. Secreção da nasofaringe de 653 indivíduos, sendo 325 institucionalizados e 328 não institucionalizados, foi coletada no período de novembro de 2011 a outubro de 2012. A identificação fenotípica das amostras foi realizada pela coloração de Gram e pelos testes de optoquina e bile solubilidade e a genotípica pela pesquisa do gene *Lyt*A. A susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos foi realizada por disco difusão. Adicionalmente, a concentração inibitória mínima da penicilina foi determinada por *Etest.* A taxa geral de isolamento de *S. pneumoniae* na população estudada foi de 1,5% (10/653), sendo de 0,9% (3/325) no grupo de indivíduos institucionalizados e de 2,1% (7/328) em indivíduos não institucionalizados. Houve diferença significativa entre os grupos estudados em relação ao gênero, ao relato de sintomatologia aguda, presença de doenças crônicas, uso de prótese dentária e ao estado vacinal. Os fatores de risco associados de forma significativa ($p < 0,05$) à taxa de isolamento de *S. pneumoniae* em idosos não institucionalizados foram o gênero, uso contínuo de medicamento, hábito de fumar e presença de fumante. Todas as amostras testadas foram confirmadas como *S. pneumoniae* e apresentaram o gene *cpsA*, que indica a presença da cápsula polissacaridica, porém, em nenhuma delas foi detectado os sorotipos dos *primers* testados. Uma amostra (16,7%) apresentou resistência intermediaria à penicilina e três (50%) foram resistentes a clindamicina. Duas amostras (33,3%) foram consideradas multirresistentes apresentando resistência aos β-lactâmicos tetraciclina, sulfametoxazol/trimetropim e macrolídeos. Nossos resultados demonstraram que a prevalência de *S. pneumoniae* nos grupos estudados foi baixa, indicando um baixo índice de portadores na população idosa da cidade de Maringá.

Palavras chave: *Streptococcus pneumoniae,* pneumococo, sorotipos, portador*,* nasofaringe, idoso, epidemiologia.

Frequency on *Streptococcus pneumoniae* in institutionalized and noninstitutionalized elderly in Maringá-PR

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae or pneumococcus is a bacterium that colonizes the mucosal surface of the nasal cavity and oropharynx, providing the healthy individuals the condition of bearer, however in the presence of some predisposing factors, its multiplication rises into an infectious process, having development of focal or systemic diseases. On the susceptibility of the elderly population in acquiring opportunistic infections and the scarcity of data on patients with pneumococcal in this category, the current study aimed to investigate the prevalence of *S. pneumoniae* in nasopharynx of individuals aged 60 years or more, attenders or not of long-term institutions in Maringá-Paraná. Furthermore, the profile of sensitivity to antimicrobial agents of isolated samples was assessed. Nasopharyngeal specimens of 653 individuals, 325 institutionalized and 328 non-institutionalized, was collected from November 2011 to October 2012. The phenotypic identification of the samples was performed by Gram staining and tests for optochin and bile solubility and the genotypic one by the search of gene *LytA*. The antimicrobial susceptibility of the samples indicated in the treatment of pneumococcal infections was performed by disk diffusion. In addition, the minimum inhibitory concentration of penicillin for all samples was determined by Etest. The overall rate of isolation of *S. pneumoniae* in the studied population was 1.5% (10/653), since 0.9% (3/325) in the group with institutionalized individuals and 2.1% (7/328) in non-institutionalized individuals. There was significant difference ($p < 0,05$) between the studied groups in relation to gender, the report of acute symptomatology, chronic diseases, use of denture and vaccination status. Risk factors significantly associated ($p < 0.05$) the rate of isolation of *S. pneumoniae* in non-institutionalized older adults were gender, continuous use of medication, smoking and presence of smokers. For institutionalized individuals, no risk factors studied showed significance. All tested samples were confirmed as *S. pneumoniae* gene and showed the CPSA, which indicates the presence of the polysaccharide capsule, but none was detected in serotypes of primers. Intermediate resistance to penicillin was presented in one of the isolates (16.7%). Three samples (50%) were resistant to clindamycin and two (33.3%) were considered multiresistant. Our outcomes showed that the prevalence of *S. pneumoniae* in both groups was low, indicating a low rate of bearers in the elderly population of Maringá.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae,* pneumococcus, serotypes, bearer*,* nasopharynx, elderly,epidemiology.

INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae ou pneumococo coloniza a superfície mucosa da naso e orofaringe de indivíduos saudáveis, concedendo-lhes a condição de portador (1). Entretanto, investigações de *S. pneumoniae* na colonização faríngea em idosos são pouco conhecidos em nosso meio já que a maioria dos estudos são direcionados a caracterizar as cepas isoladas de crianças (2).

As taxas de portadores de pneumococos relatadas em diversas regiões do mundo estão associadas a alguns fatores como a idade, as condições socioeconômicas, etnias, regiões geográficas, além dos diferentes métodos utilizados para o isolamento e detecção do microrganismo (3-5). Provavelmente, as vias respiratórias de todos os seres humanos sejam colonizadas por *S. pneumoniae* pelo menos uma vez na vida (4). Em crianças, por exemplo, a taxa de portadores de pneumococo é bastante variável, oscilando desde 19,4% a 89,5% (1, 6-12). Já em adultos esta taxa diminui significativamente, variando entre 4% a 10,3% e em indivíduos acima de 60 anos varia de 1,5% a 16% (2, 13-17).

Os estudos regionas de prevalência dos sorotipos de pneumococos em portadores, assim como as taxas de doenças penucocócicas, são necessários para auxiliar nas formulações de vacinas eficazes contra *S. pneumoniae*, contribuindo para uma maior cobertura em relação aos sorotipos causadores de doenças invasivas na região (18).

Um dos grandes desafios em relação ao tratamento das infecções pneumocócicas é o surgimento de cepas resistentes à penicilina, considerada a droga de escolha para o tratamento de doenças pneumocócicas. Este problema é observado cada vez com mais frequência na prática clínica, especialmente em infecções invasivas causadas por este microrganismo, complicando o tratamento dos pacientes (2, 19). Estudos de isolados da nasofaringe de portadores de pneumococo indicam que a disseminação de isolados resistentes ou multirresistentes pode ocorrer na comunidade, contribuindo para o surgimento de doenças de

difícil tratamento (20). Esta resistência cria a necessidade de implementar sistemas de monitoramento para determinar a incidência desse fenômeno e desenvolver estratégias de prevenção e de controle (21, 22).

A população idosa é constituída por um grupo heterogêneo de indivíduos que apresentam características bastante peculiares, com prevalência de múltiplas condições crônicas e incapacidade funcional elevada, além da vulnerabilidade aumentada na aquisição de certas infecções, caracterizando-a como grupo de risco para contrair enfermidades pneumocócicas (23). Variações nas condições de saúde, no bem-estar, na capacidade funcional e nas necessidades de cuidado distinguem diferentes grupos de idosos (24). E por esta ser uma população em crescimento e mais acometida por penumonia causada pelo pneumococo, é importante que sejam continuas as pesquisas sobre prevenção, terapia, além de estudos de frequência de *S. pneumoniae* em individuos sadios nesta faixa etária (25).

Considerando a escassez de dados sobre a prevalência de *S. pneumoniae* na população idosa em nosso meio, o objetivo do presente trabalho foi investigar a prevalência de portadores de *S. pneumoniae* na nasofaringe de indivíduos com idades ≥ 60 anos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá-PR, além de avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras isoladas e determinar a prevalência dos principais sorotipos entre os portadores, através da tipagem das amostras de *S. pneumoniae* isoladas.

MATERIAIS E MÉTODOS

População estudada

Foram incluídos neste estudo 653 indivíduos, de ambos os sexos, com idade ≥ 60 anos, distribuídos em dois grupos.

Grupo 1 - Indivíduos institucionalizados: 325 indivíduos, com idade variando entre 60 e 103 anos, habitantes de instituições de longa permanência para idosos (ILPI) no Município de Maringá–PR, distribuídos em dez ILPIs.

Grupo 2 - Indivíduos não institucionalizados (NI): 328 indivíduos, com idade entre 60 e 100 anos, residentes no Município de Maringá–PR e frequentadores de espaços de convívio público como áreas de lazer e recreação, academias da terceira idade (ATI) e igrejas.

Descrição do estudo

Realizou-se um estudo transversal no período de novembro de 2011 a outubro de 2012.

Inicialmente as ILPIs foram convidadas a participar do estudo por meio de uma carta de apresentação do projeto (ANEXO A). Ao concordarem em participar do estudo, assinaram, através de um representante legal, uma carta de autorização (ANEXO B) em duas vias. Conseguintemente foi agendado um horário, via telefone, junto a um representante legal de cada ILPI para a realização da coleta do material clínico dos idosos institucionalizados. No momento da coleta, estes indivíduos foram abordados e convidados a participar do estudo.

Os idosos não institucionalizados foram abordados e convidados a participar do estudo durante suas atividades recreativas ou religiosas.

No momento da coleta, indivíduos de ambos os grupos foram esclarecidos a respeito de dúvidas em relação ao estudo e quanto à confidencialidade das informações fornecidas. Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C) em duas vias e responderam a um formulário socioepidemiológico (ANEXO D e E) a fim de obter informações sobre alguns fatores de risco associados à aquisição do pneumococo.

Quando o idoso institucionalizado apresentou-se incapacitado, devido ao grau de dependência física ou mental, um representante legal da instituição assinou o TCLE e respondeu o formulário do respectivo sujeito.

Coleta do Material Clínico

O material clínico utilizado para a pesquisa de *S. pneumoniae* foi a secreção da nasofaringe, obtido no período de novembro de 2011 a outubro de 2012.

A coleta da secreção da nasofaringe foi realizada com o auxílio de um *swab* de rayon (*Copan Diagnostics INC*, Brescia, Itália). Para a obtenção da secreção o *swab* foi introduzido delicadamente na cavidade nasal do idoso até encontrar resistência, tocando a parede posterior da nasofaringe seguido de movimentos giratórios (180º) realizados durante 5 segundos, para a absorção da secreção e, em seguida, retirado. Após a coleta o *swab* foi transportado em meio *Amies* sem carvão, em temperatura ambiente, ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá-PR. Para cada indivíduo participante do estudo, foi realizada uma coleta após assinatura do TCLE e preenchimento dos formulários.

Cultivo dos espécimes

Cada espécime foi cultivado em uma placa de Petri preparada com a base *Tryptose Blood Agar* (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA), suplementada com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, denominada ágar sangue e em outra contendo a mesma base de meio de cultura e concentração de sangue, porém, adicionado de 4µg/mL de sulfato de gentamicina (Indústria Química e Farmacêutica *Schering Plough* S/A, São Paulo, SP), sendo denominado ágar sangue gentamicina. Em seguida, ambas as placas foram incubadas a 37 ^{o}C em jarras de microaerofilia, com atmosfera de 5 a 10% de CO_2 durante 24-48 horas.

Adicionalmente, após semeadura em ágar sangue e ágar sangue gentamicina, cada *swab* de 246 espécimes provenientes de indivíduos não institucionalizados foi introduzido em tubos de ensaio 13x100 mm contendo 3 mL de um caldo de enriquecimento. Em seguida, os tubos foram agitados em um agitador tipo *vortex* durante 30 segundos e subsequentemente incubados a 37 ºC durante 24-48 horas. Após o período de incubação, os caldos que apresentaram turbidez, devido ao crescimento bacteriano, foram selecionados para um subcultivo. Após breve agitação uma película do caldo foi transferida e semeada em placa de ágar sangue gentamicina seguida de incubação a 37 ºC durante 24-48 horas. Para o preparo do caldo, foi utilizado infuso de cérebro e coração (*Difco, Becton Dickinson and Company Sparks*, MD, USA) – (BHI), adicionado 4µg/mL de sulfato de gentamicina (Indústria Química e Farmacêutica *Schering Plough* S/A, São Paulo, SP). Alíquotas de 3 mL do caldo de enriquecimento foram distribuídas em tubos de ensaio 13x100 mm com tampa de rosca e armazenados a temperatura de 4 ºC, durante período máximo de 72 horas até o seu uso.

Identificação fenotípica das amostras

Após o cultivo dos espécimes em ágar sangue e ágar sangue gentamicina ambas as placas de cada espécime foram utilizadas para observação do crescimento bacteriano. Colônias alfa hemolíticas apresentando depressão central e aparência mucóide, em alguns casos, foram consideradas presuntivamente como *S. pneumoniae*. Sempre que possível, duas a três colônias foram selecionadas do isolamento primário e cultivadas em ágar sangue para realização das provas de identificação fenotípica para a confirmação da espécie. A identificação fenotípica das amostras foi realizada pela coloração de Gram e pelos testes de optoquina e bile solubilidade.

Teste da optoquina

Discos de optoquina (5 μg) foram colocados em placa de ágar sangue previamente semeada com cultura pura do microrganismo isolado. Após incubação por 18 a 24 horas a 37 °C em atmosfera de CO_2 observou-se a presença ou ausência do halo de inibição do crescimento bacteriano. Halos de inibição ≥ 14 mm foram considerados indicativos de *S. pneumoniae*. Os isolados que apresentaram uma zona de inibição < 14 mm foram submetidos ao teste da bile solubilidade para confirmação da espécie (26).

Teste de solubilidade em bile

O teste de solubilidade em bile foi realizado conforme descrito por MacFaddin (27). Uma forte suspensão bacteriana foi preparada em 1,0 mL de solução salina 0,85% estéril a partir de uma cultura pura de 24 horas em ágar sangue. Em seguida, acrescentou-se uma gota do indicador de pH vermelho de fenol 0,05% e, com auxílio de uma alça de semeadura foi adicionado NaOH 0,1N até o ajuste do pH 7,0. A suspensão bacteriana preparada foi dividida em dois tubos de ensaio 13x100 mm (0,5 mL/tubo). Um tubo foi identificado como *teste* e o outro como *controle*. Em seguida, no tubo *teste* foi adicionado 0,5 mL de solução de desoxicolato de sódio a 10% e no tubo *controle*, foi adicionado 0,5 mL de salina. Os tubos foram levemente agitados e incubados a 37 ºC durante 3 horas com verificação de hora em hora. O resultado foi considerado positivo quando houve perda da turvação no tubo *teste* apresentando-se visivelmente mais clara, dentro de um período de 3 horas, quando comparado com a turvação da suspensão do tubo *controle*.

Identificação genotípica e tipagem das amostras

Inicialmente as amostras foram cultivadas em ágar sangue e o crescimento bacteriano foi utilizado para a realização das técnicas moleculares de identificação da espécie e da tipagem.

A identificação genotípica das amostras foi realizada através da detecção do gene *lytA* que codifica a autolisina *LytA* presente em todos os pneumococos. A pesquisa do gene *lytA* foi realizada pela metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos a partir das sequências SPN1 (5'–TGA AGC GGA TTA TCA CTC GC–3') e SPN2 (5'–GCT AAA CTC CCT GTA TCA AGC G–3') apresentando amplificação do fragmento com visibilidade em 273 pb (28).

Para a tipagem molecular das amostras isoladas foram utilizados os *primers* específicos para os sorotipos 1, 4, 5, 6A/6B, 7, 9V, 14, 18, 19F e 23F, que constituem a vacina decavalente. As sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados foi baseado em estudos realizados por Pai *et al*. (29), conferidas e comparadas com sequências de DNA publicadas no *GenBank* pelo programa *BLAST* 2 (*National Center for Biotechnology Information*; disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Os 10 iniciadores foram divididos em 3 reações seqüenciais de multiplex PCR (Tabela 1).

Extração do DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi extraído pelo método de Doyle e Doyle (30) utilizando-se como agente de lise o brometo de cetil trimetil amônio (CTAB). Brevemente, a partir de um cultivo de 24-48 horas em ágar sangue várias colônias foram transferidas para microtubos contendo 200 µl de TRIS-EDTA (TE) e o conteúdo foi centrifugado a 8.000 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 600 µl de CTAB adicionado de 40 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (CIA), homogeneizado em *vortex* e incubado em banho maria a 65 °C. Após 30 minutos foi adicionado a cada microtubo 800 µl de CIA homogeneizando-se levemente por inversão. Esta mistura foi então centrifugada a 12.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionado de igual quantidade de isopropanol gelado. A mistura foi

mantida a -20 °C por pelo menos 18 horas e então centrifugada a 14.000 RPM por 20 minutos a -4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µl de TE, sendo este pronto para o uso, permanecendo em estoque a -20 ºC até o uso.

Preparo da reação de PCR para identificação genotípica e tipagem molecular

Para a identificação genotípica, uma alíquota de 2µl do DNA extraído de cada amostra foi adicionada em 23µl de uma mistura de PCR contendo 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCI (pH 8,4), 2,5 mM de MgCl2, 0,2 mM dos desoxinucleotideos dATP, dUTP, dGTP, dCTP (*Invitrogen* Inc., Carlsbad, CA, USA), 50 mM do *primer lytA-F,* 50 mM do *primer lytA-R* e 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*). A reação de amplificação foi realizada em termociclador com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por três minutos seguidos de 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por dois minutos e um ciclo de extensão final a 72 °C durante sete minutos.

As reações de tipagem foram realizadas com 2,5 µL em volume total de 25µL contendo tampão $MgCl_2$ 2,5mM, dNTP 0,4 mM, Taq DNA polimerase 2U e concentrações especificas dos *primers*, totalizando três reações: Reação 1: *primers* específicos para os sorotipos 4, 14, 5 e 9V. Reação 2: *primers* para os sorotipos 1, 7 e 23F. Reação 3: *primers* para os sorotipos 19F, 18 e 6A/B. O iniciador *cps*A foi incluso em todas as reações como controle interno especifico da reação, para o *locus cps*A, presente em todos os pneumococos. As condições das reações foram: 94 ^{o}C por 4 minutos seguidos de 30 ciclos de 94 ^{o}C por 45 segundos, 54 ^{o}C por 45 segundos e 65 ^{o}C por 2 minutos e 30 segundos.

Os produtos da PCR das amostras e os marcadores de peso molecular de 50 pb foram aplicados em géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada a 100 volts por aproximadamente 60 minutos, e, em seguida, os produtos de

amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta e documentados para análise das bandas de acordo com o peso molecular.

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade das amostras de *S. pneumoniae* para os antimicrobianos clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, levofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim, vancomicina, rifampicina (*Laborclin* produtos para laboratório, Pinhais, PR, Brasil), telitromicina, linezolide, oxacilina (*Oxoid* Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), foram realizados pelo método de disco-difusão, conforme estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (31). Adicionalmente, a concentração inibitória mínima (CIM) da penicilina para todas as amostras foi determinada por *Etest* (*AB Biodisk*, Solna, Sweden). Tiras impregnadas com penicilina G em gradiente de concentração variando de 0,002 a 32 μg/mL foram aplicadas na superfície de uma placa de ágar Müeller Hinton (Difco) acrescido 5% de sangue de carneiro semeada previamente com inóculo ajustado em 10^8 UFC/mL. As placas foram incubadas em atmosfera de CO_2 a 35-37 °C e, após 20-24 horas de incubação, a leitura da CIM foi considerada a concentração da fita que intersectou com a borda da elipse de inibição do crescimento bacteriano. De acordo com a interpretação estabelecida pelo CLSI para penicilina V oral, amostras que apresentaram CIM ≤ 0,06 μg/ml foram consideradas sensíveis. Concentrações variando de 0,12 μg/mL a 1,0 μg/mL caracterizaram resistência intermediária e CIM ≥ 2,0 μg/mL caracterizaram resistência plena à penicilina. A amostra padrão *S. pneumoniae* da *Americam Type Culture Collection* (ATCC 49619) foi utilizada, em paralelo, como controle dos testes. Amostra de pneumococo que apresentou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foi considerada multirresistente (31).

Estoque das amostras

Após a obtenção de cultura pura das amostras isoladas de *S. pneumoniae* em ágar sangue de 24 horas, foi realizada uma forte suspensão em 3 mL de caldo BHI, em seguida adicionado 30% de sangue de carneiro desfibrinado. A suspensão foi armazenada em tubos criogênicos graduado 2 mL (*Thecno Plastic Products AG*, Suiça) e em seguida estocados em *freezer* a -20 °C.

Análise estatística

Após a aplicação dos formulários epidemiológicos (ANEXO D e E) estes foram digitados em planilha do *software Microsoft Excel 2010*. A análise dos dados foi realizada utilizado o *Software Statistica 8.0*. Inicialmente foi realizada a análise descritiva das variáveis sócio demográficas e epidemiológicas seguida de aplicação do teste qui-quadrado para verificar os fatores relacionados com positividade em ser portador de *S. pneumoniae* sendo considerado significativo se $p < 0,05$.

Preceitos éticos do estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (CAAE nº 0432.0.093.000-11, parecer nº 589/2011).

RESULTADOS

Um total de 653 indivíduos, sendo 263/653 (40,3%) do gênero masculino, e 390/653 (59,7%) do gênero feminino, com idade média de 71,8 ± 9,6 anos participaram voluntariamente do estudo. Destes 325/653 (49,8%) eram institucionalizados e 328/653 (50,2%) não institucionalizados. Os grupos ILPI e NI mostraram diferença significativa em relação ao gênero feminino ($p < 0,001$) e masculino ($p < 0,01$), sintomatologia aguda ($p = 0,013$), doença crônica ($p < 0,011$), hipertensão arterial ($p = 0,011$), uso de prótese dentária ($p < 0,001$) e vacina antipneumocócica ($p < 0,001$) (Tabela 2).

A taxa geral de colonização por *S. pneumoniae* na população estudada foi de 1,5% (10/653), sendo detectada a presença do microrganismo em 0,9% (3/325) dos indivíduos institucionalizados e em 2,1% (7/328) dos não institucionalizados, não havendo diferença significativa entre os grupos em relação à taxa de colonização ($p = 0,630$) (Tabela 2).

Dos 339 indivíduos institucionalizados, 325/339 (95,9%) concordaram em participar do estudo e foram investigados para *S. penumoniae*, apresentando uma taxa de recusa de 4,1% (14/339). Entre as 10 ILPIs incluídas neste estudo, 3 delas apresentaram um individuo cada com cultura positiva para *S. pneumoniae*. Em relação à vacina antipneumocócica 54,8% (178/325) dos idosos institucionalizados eram vacinados e um deles apresentou cultura positiva para *S. pneumoniae* (Tabela 3).

Não houve diferença significativa para os idosos institucionalizados em relação aos fatores de risco e isolamento de *S. pneumoniae* da nasofaringe (Tabela 4). Quanto aos idosos não institucionalizados, foi observada diferença significativa entre o isolamento de *S. pneumoniae* e as variáveis associadas ao gênero ($p<0,01$), uso contínuo de medicamento ($p = 0,037$), hipertensão arterial ($p = 0,04$) tabagismo ($p<0,01$) e convívio com fumantes ($p = 0,024$) (tabela 5).

Dos 246 *swabs* testados com caldo de enriquecimento 182 (74%) apresentaram crescimento após incubação de 24/48 horas. Quando semeadas em ágar gentamicina, 14 amostras apresentaram alfa hemólise com a confirmação de uma única amostra para *S. pneumoniae*.

A identificação genotípica, a tipagem sorológica e o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, foram realizados com 6 das 10 amostras isoladas. As demais foram perdidas durante o estoque e armazenamento.

Seis amostras testadas confirmaram a presença do gene LytA para *S. pneumoniae*. A tipagem capsular demonstrou que todas as amostras apresentaram o gene *cps*A, o que indica a presença da cápsula polissacaridica, porém, em nenhuma delas foi detectado os sorotipos dos *primers* testados.

Todas as amostras foram sensíveis a rifampicina, cloranfenicol, vancomicina, telitromicina e linezolida. Uma amostra 1/6 (16,7%) apresentou resistência intermediaria a penicilina e outra a ofloxacina. Resistência plena também foi observada em 1/6 (16,7%) amostras para ofloxacina, levofloxacina e sulfametoxazol/trimetropim, em 2/6 (33,3%) amostras para tetraciclina e eritromicina e 3/6 amostras (50%) para clindamicina. Duas amostras (33,3%) foram consideradas multiresistente apresentando resistência aos β-lactâmicos tetraciclina, sulfametoxazol/trimetropim e macrolídeos (Tabela 6). Entre os investigados com relato de antibioticoterapia no mês antecedente à coleta três apresentaram cultura positiva para *S. pneumoniae.*

DISCUSSÃO

A prevalência de indivíduos idosos portadores de *S. pneumoniae* tem sido pouco investigada, e até onde é de nosso conhecimento, a falta de dados na literatura nos faz crer que este é o primeiro estudo realizado com idosos institucionalizados em uma cidade do Brasil.

A taxa geral de 1,5% de portadores encontrada no presente trabalho é baixo quando comparado com estudos realizados com a população pediátrica da mesma região, no qual resultados recentes e ainda não publicados, investigados por nossa equipe de pesquisadores, demonstraram uma taxa superior a 50% em crianças ≤ 5 anos portadoras de pneumococo na nasofaringe. Deste modo, pode-se observar que a frequência de portadores desta bactéria diminui com a idade.

O declínio da taxa de portadores associado com aumento da idade reflete na aquisição gradual da imunidade da mucosa para os sorotipos de penumococos presentes na comunidade como também a redução da exposição, ou o contato permanente com crianças (5, 32). A resposta imune contra o pneumococo depende da produção de anticorpos específicos contra o polissacarídeo capsular, antígeno que induz a resposta imune com o passar da idade (5, 32, 33). Somado a isso, maiores taxas de colonização em idosos têm sido descritas em famílias com presença de crianças pequenas (4,6%), durante infecções do trato respiratório (8,7%) e durante surtos de doença pneumocócica em ILPIs (2, 13).

A colonização por pneumococo é intermitente e sua incidência varia conforme a população estudada, sendo maior em crianças e em comunidades fechadas e mais frequênte durante o inverno e primavera, com início desde os primeiros dias após o nascimento da criança, pelo contato com a mãe, atingindo a taxa máxima na idade pré escolar, diminuindo nos adultos o que segundo a Sociedade Brasileira de Imunização (34) volta a aumentar nas

idades mais avançadas, o que nem sempre é fato, principalmente em relação aos resultados de presente trabalho.

Em nosso estudo não foi encontrado diferença significativa entre os dois grupos de indivíduos analisados em relação a taxa de colonização por pneumococo. Resultados semelhantes têm sido demonstrados na literatura em um estudo realizado no Chile, onde foi detectada uma variação entre 12% a 16% de isolamento de *S. pneumoniae* da nasofaringe em indivíduos institucionalizados com mais de 60 anos (2). Paralelamente em um estudo realizado na Finlândia por Palmu *et al*. (17) foi detectado a prevalência de 1,5% de isolamento de *S. pneumoniae* em indivíduos não institucionalizados com idades ≥ 65 anos.

Apesar de não ter sido encontrado diferença significativa entre os grupos por nós estudados, em relação à taxa de portadores, o pneumococo se fez mais presente em indivíduos não institucionalizados. Flamaing *et al*. (16) relataram que a prevalência em idosos não institucionalizados foi maior que aos institucionalizados, 5,5% e 4,1%, respectivamente.

Nenhum fator de risco pode ser associado à aquisição de pneumococos em idosos institucionalizados, o que pode estar relacionado com a baixa prevalência encontrada. Os mesmos resultados foram relatados por outros autores em estudos de colonização por pneumococos em idosos (16, 17). Por outro lado, no grupo de indivíduos não institucionalizados, diferença significativa foi observada para alguns fatores de risco associadas ao isolamento de *S. pneumoniae* em relação ao gênero, com maior frequência entre o gênero masculino, ao uso contínuo de medicamento e ao hábito de fumar, reforçando que estes eram fumantes de longa data.

Apesar da vacina pneumo 23 fazer parte da Campanha Nacional de Vacinação do Idoso, em habitantes de instituições fechadas desde 1999 (35) observamos em nosso estudo baixa cobertura vacinal (54,8%) nas ILPIs em nossa região. É preciso considerar que em duas delas, nenhum idoso havia recebido a vacina até o momento do estudo. Entretanto, em varias

regiões do mundo, inclusive no Brasil, a cobertura vacinal é escassa, devido a barreiras para sua introdução no sistema de saúde que incluem o custo da vacina, a cobertura de sorotipos de pneumococo na região, e falta de estimativas de incidência de doenças (18). Um dado interessante a ser mencionado, foi que um isolado de cada grupo investigado teve procedência de idoso já vacinado, o que reforça a importância de estudos de prevalência, a fim de investigar os sorotipos carreados pela comunidade melhorando assim a eficácia da vacina.

Quando realizada a tipagem pela técnica de *multiplex* PCR para identificação dos sorotipos das amostras, todas apresentaram o gene *cpsA* o que indica a presença da cápsula polissacaridica, porém, em nenhuma delas foi detectado os sorotipos dos *primers* utilizados. É importante destacar que apenas as amostras com os *primers* específicos dos sorotipos contidos na vacina decavalente foram testadas.

Nosso estudo demonstrou que entre os indivíduos que relataram ter feito uso de antibiótico no mês antecedente à coleta, três apresentaram cultura positiva para *S. pneumoniae* sendo dois deles proveniente de idosos não institucionalizados e apenas um de idosos institucionalizados, porém, um estudo realizado por Palmu *et al*., (17) mostrou que todos os indivíduos expostos a tratamento com antimicrobianos apresentaram culturas negativas.

Quanto ao perfil de resistência à penicilina, as amostras analisadas mostraram baixo nível, similar ao reportados por outros autores, sendo observado em idosos a resistência em relação a outros antimicrobianos que não a penicilina (2) apresentando taxas mais baixas que as encontradas na população pediátrica (10). Uma entre as duas amostras que apresentaram fenótipo de multirresistencia foi resistente a penicilina, e também a tetraciclina, eritromicina, e clindamicina.

Estudos têm relatado que entre cepas resistentes à penicilina, 70 a 90% delas são resistentes também à eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol (10). Foi observado em nosso estudo vários relatos pela população estudada em relação ao uso de outros antimicrobianos,

principalmente devido ao aumento de infecções no trato geniturinário ser mais frequênte na população idosa causando, de certo modo, seleção de bactéria resistentes a outras classes de antimicrobianos. A resistência bacteriana é um fenômeno biológico natural, de modo que cada vez que o indivíduo se expõe ao uso de um novo agente antimicrobiano na prática clínica é detectado cepas resistentes (36).

Estudos de isolados da nasofaringe de portadores de pneumococo indicam que a disseminação de isolados resistentes ou multirresistentes pode ocorrer na comunidade, contribuindo para o surgimento de doenças de difícil tratamento (20). Esta resistência cria a necessidade de implementar sistemas de monitoramento para determinar a incidência desse fenômeno e desenvolver estratégias para a prevenção das infecções pneumocócicas e resistência antimicrobiana (21, 22).

No entanto, apesar do pequeno número de amostras isoladas e da baixa frequência encontrada, o número de indivíduos investigados foi representativo para os propósitos do estudo, uma vez que abrangeu toda a população de indivíduos institucionalizados.

Considerando que a amostra utilizada no estudo foi de conveniência, deve-se ter cuidado para a generalização dos achados. Apenas as amostras com os *primers* específicos dos sorotipos contidos na vacina decavalente foram testadas. Outro fator limitante do estudo deve-se a perda de 4 entre os 10 isolados, quer pela dificuldade de armazenamento, levando em consideração a realidade local (*freezer* a – 20 ºC) ou devido o contaminação do material clínico durante o processo de estocagem.

Tabela 1. Sequência de iniciadores utilizados pela técnica de PCR para a caracterização dos sorotipos das amostras de *S. pneumoniae* isoladas de portadores.

Par do *primer*	**Sequência de nucleotídeos (5' ⟶ 3')**	**Tamanho do produto (pb)**
1-f	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	280
1-r	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	
4-f[a]	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	371
4-r	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	
5-f	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	362
5-r	GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	
6A/B-f (biotin)*d*	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	250
6A/B-r	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	
7F-f	CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG	826
7F-r	CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC	
9V-f	CTT CGT TAG TTA AAA TTC TAA ATT TTT CTA AG	753
9V-r	GTC CCA ATA CCA GTC CTT GCA ACA CAA G	
14-f	CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT CCC TCT AC	208
14-r	GCC AAA ATA CTG ACA AAG CTA GAA TAT AGC C	
Sg18-f	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	573
Sg18-r	TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	
19F-f	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	304
19F-r	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	
23F-f*a*	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	384
23F-r	CAC AAC ACC TAA CAC ACG ATG GCT ATA TGA TTC	
cpsA-f	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	160
cpsA-r	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	

Tabela 2. Características epidemiológicas e taxa de colonização por *S. pneumoniae* em idosos institucionalizados e não institucionalizados no Município de Maringá-PR.

Característica	**Total N = 653**	**ILPI N = 325**	**NI N = 328**	***p-value***
Idade (média ± Desvio padrão)	71,8±9,6	69,6±7,0	74,0±11,2	
(Máximo; Mínimo)	(60;103)	(60;103)	(60;100)	
Gênero				
Feminino n (%)	390 (59,7)	164 (50,5)	226 (68,9)	0,001*
Masculino n (%)	263 (40,3)	161 (49,5)	102 (31,1)	0,004*
Sintomatologia aguda n (%)	193 (29,6)	67 (20,6)	126 (38,4)	0,012*
Dor de ouvido n (%)	22 (3,4)	7 (2,2)	15 (4,6)	0,787
Dor de garganta n (%)	98 (15,0)	36 (11,1)	62 (18,9)	0,312
Febre (última semana) n (%)	27 (4,1)	18 (5,5)	9 (2,7)	0,745
Doença crônica n (%)	313 (47,9)	132 (40,6)	181 (55,2)	0,011*
IC[a] n (%)	32 (4,9)	11 (3,4)	21 (6,4)	0,723
IR[b] n (%)	31 (4,7)	19 (5,8)	12 (3,7)	0,795
Diabetes n (%)	83 (12,7)	39 (12,0)	44 (13,4)	0,849
HA[c] n (%)	235 (36,0)	89 (27,4)	146 (44,5)	0,011*
Exposição ATB[d] ultimas 4 semanas n (%)	96 (14,7)	42 (12,9)	54 (16,5)	0,062
Prótese dentária n (%)	355 (54,4)	132 (40,6)	223 (68,0)	0,001*
Tabagismo n (%)	55 (8,4)	36 (11,1)	19 (5,8)	0,520
Vacina pneumo 23 n (%)	246 (37,7)	178 (54,8)	69 (21,0)	0,001*
Colonização por *S. pneumoniae* n (%)	10 (1,5)	3 (0,9)	7 (2,1)	0,630

a: Insuficiência cardíaca b: Insuficiência respiratória; c: Hipertensão arterial; d: Antimicrobiano.
** Existe diferença as proporções avaliadas pelo Teste Z com nível de significância de 5%.*

Tabela 3. Distribuição da população de indivíduos institucionalizados em relação ao número de coletas realizadas por ILPI e prevalência de *S. pneumoniae* no Município de Maringá–PR.

Instituição	**Total de idosos**	**Coleta**		**S. *pneumoniae***	
		n	**%**	**n**	**%**
Centro dia	15	15	100,0	0	0,0
Pietá	9	9	100,0	0	0,0
Marimar	19	19	100,0	0	0,0
Wajunkai	27	26	96,3	1	3,7
Benedito Franchini	25	24	96,0	0	0,0
Manaain	40	39	97,5	0	0,0
São Vicente	82	79	96,3	1	1,2
Luz Amor	48	45	93,8	1	2,1
Bem viver	26	25	96,2	0	0,0
Lar dos velhinhos	48	44	91,7	0	0,0
Total	339	325	95,9	3	0,9

Tabela 4. Associação dos dados socioepidemiológicos com o isolamento de *S. pneumoniae* da nasofaringe dos 325 idosos institucionalizados no Município de Maringá - PR.

Variável	Isolamento de *S. pneumoniae*				*p-value*
	Negativo		positivo		
	n	(%)	n	(%)	
População estudada	322	(99,1)	3	(0,9)	
Gênero					
Feminino	164	(100,0)	0	(0,0)	0,079
Masculino	158	(98,1)	3	(1,9)	
Idade					
60 a 70	139	(100)	0	(0,0)	
71 a 80	78	(95,7)	2	(2,5)	0,295
81 a 90	78	(98,7)	1	(1,3)	
>90	27	(100,0)	0	(0,0)	
Uso de medicamento contínuo					
Sim	247	(98,8)	3	(1,2)	0,340
Não	75	(100,0)	0	(0,0)	
Doença crônica					
Sim	316	(99,0)	3	(0,9)	0,811
Não	6	(100,0)	0	(0,0)	
Insuficiência cardíaca					
Sim	10	(90,9)	1	(9,1)	0,201
Não	312	(99,4)	2	(0,6)	
Insuficiência respiratória					
Sim	18	(94,7)	1	(5,3)	0,422
Não	304	(99,3)	2	(0,7)	
Diabetes					
Sim	38	(97,4)	1	(2,6)	0,802
Não	284	(99,3)	2	(0,7)	
Hipertensão arterial					
Sim	88	(98,9)	1	(1,1)	0,386
Não	234	(99,2)	2	(0,8)	
Doença aguda					
Sim	67	(100,0)	0	(0,0)	0,375
Não	255	(98,8)	3	(1,2)	
Hospitalização					
Sim	30	(100,0)	0	(0,0)	0,579
Não	292	(99,0)	3	(1,0)	
Uso ATB[a] ultimo mês					
Sim	41	(97,6)	1	(2,4)	0,289
Não	281	(99,3)	2	(0,7)	
Febre					
Sim	17	(94,4)	1	(5,6)	0,034
Não	305	(99,3)	2	(0,7)	
Tabagismo					
Sim	36	(100,0)	0	(0,0)	0,539
Não	286	(99,0)	3	(1,0)	
Presença de fumante					
Sim	226	(99,6)	1	(0,4)	0,166
Não	96	(98,0)	2	(2,0)	
Prótese dentária					
Sim	132	(100,0)	0	(0,0)	0,222
Não	160	(98,2)	3	(1,8)	
Sem informação	30	(100,0)	0	(0,0)	
Vacina					
Sim	177	(99,4)	1	(0,6)	0,506
Não	118	(98,3)	2	(1,7)	
Sem informação	27	(100,0)	0	(0,0)	
Nº de pessoas no dormitório					
Nenhuma	71	(100,0)	0	(0,0)	
Uma	23	(100,0)	0	(0,0)	0,549
Duas	62	(98,4)	1	(1,6)	
Três ou mais	166	(98,8)	2	(1,2)	

a: Antibiótico

Tabela 5. Associação dos dados socioepidemiológicos dos 328 idosos não institucionalizados segundo positividade por *S. pneumoniae* no Município de Maringá - PR.

Variável	Isolamento de *S. pneumoniae*				*p-value*
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
População estudada	321	(97,9)	7	(2,1)	
Gênero					
Feminino	224	(99,1)	2	(0,9)	0,005
Masculino	97	(95,1)	5	(4,9)	
Idade					
60 a 70	191	(97,9)	4	(2,0)	
71 a 80	108	(97,3)	3	(2,7)	0,299
81 a 90	20	(100,0)	0	(0,0)	
>90	2	(100,0)	0	(0,0)	
Medicamento de uso contínuo					
Sim	227	(99,1)	2	(0,9)	0,037*
Não	94	(94,9)	5	(5,0)	
Doença crônica					
Sim	178	(98,9)	2	(1,1)	
Não	143	(96,6)	5	(3,4)	
Hipertensão arterial					
Sim	145	(99,3)	1	(0,7)	0,045
Não	176	(96,7)	6	(3,2)	
Doença aguda					
Sim	117	(98,3)	2	(1,7)	0,668
Não	204	(97,6)	5	(2,4)	
Hospitalização					
Sim	19	(100,0)	0	(0,0)	0,139
Não	302	(97,7)	7	(2,3)	
Uso ATB[a] ultimo mês					
Sim	52	(96,3)	2	(3,7)	0,382
Não	269	(98,2)	5	(1,8)	
Febre					
Sim	8	(88,9)	1	(11,1)	0,166
Não	313	(98,1)	6	(1,9)	
Tabagismo					
Sim	18	(85,7)	3	(14,3)	
Não	267	(99,3)	2	(0,7)	0,004*
Ex fumante	36	(94,7)	2	(5,3)	
Presença de fumante					
Sim	21	(91,3)	2	(8,7)	0,024*
Não	300	(98,4)	5	(1,6)	
Prótese dentária					
Sim	217	(97,3)	6	(2,7)	0,154
Não	104	(99,0)	1	(1,0)	
Vacina					
Sim	68	(98,5)	1	(1,5)	0,979
Não	253	(97,7)	6	(2,3)	
Escolaridade					
Sem alfabetização	6	(100,0)	0	(0,0)	0,207
Primário / Ginásio	228	(97,4)	6	(2,6)	
Segundo grau	14	(93,3)	1	(6,7)	
Técnico / Superior	73	(100,0)	0	(0,0)	
Nº de pessoas na residência					
Uma	135	(98,5)	2	(1,5)	0,678
Duas	94	(97,9)	2	(2,0)	
Três ou mais	92	(96,8)	3	(3,2)	

Continuação da tabela 5

Variável	Isolamento de *S. pneumoniae*				*p-value*
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
População estudada	321		7		
Convívio com crianças					
Sim	129	(98,5)	2	(1,5)	0,545
Não	193	(97,5)	5	(2,5)	
Convívio com quantas crianças					
Uma	47	(97,9)	1	(2,1)	
Duas	40	(97,6)	1	(2,4)	0,779
Três ou mais	42	(100,0)	0	(0,0)	
Sem convívio	192	(97,5)	5	(2,5)	
Grau de parentesco					
Neto (a)	114	(98,3)	2	(1,7)	
Filho (a)	6	(100,0)	0	(0,0)	0,965
Não parente	2	(100,0)	0	(0,0)	
Sobrinho (a)	7	(100,0)	0	(0,0)	
Sem convívio	0	(0,0)	5	(2,5)	
Idade das crianças					
Menos de 5 anos	89	(97,8)	2	(2,2)	
Mais de 5 anos	40	(100)	0	(0,0)	0,598
Sem convívio	192	(97,5)	5	(2,5)	
Tempo de convivência diária					
Dia todo	75	(97,4)	2	(2,6)	
< 5 h/dia	10	(100,0)	0	(0,0)	0,636
> 5 h/dia	28	(100,0)	0	(0,0)	
1 ou 2 vezes por semana	16	(100,0)	0	(0,0)	
Sem convívio	192	(97,5)	5	(2,5)	
Dorme com crianças no quarto					
Sim	9	(100,0)	0	(0,0)	
Não	120	(98,4)	2	(1,6)	0,708
Sem convívio	192	(97,5)	5	(2,5)	
Dormir com outra pessoa (exceto criança)					
Uma	58	(98,3)	1	(1,7)	
Duas	5	(100,0)	0	(0,0)	0,975
Três ou mais	1	(100,0)	0	(0,0)	
Nenhuma	257	(97,7)	6	(2,3)	
Medicamento controlado					
Sim	34	(100,0)	0	(0,0)	0,363
Não	287	(97,6)	7	(2,4)	
Consumo de bebida alcoólica					
Sim	69	(95,8)	3	(4,2)	0,176
Não	252	(98,4)	4	(1,6)	
Frequência bebida alcoólica					
Não consome	251	(98,4)	4	(1,6)	
2 vezes por semana	24	(92,3)	2	(7,7)	0,316
3 vezes por semana	31	(96,9)	1	(3,1)	
Diariamente	15	(100,0)	0	(0,0)	

a: Antibiótico

Tabela 6. Resultados dos testes de **s**usceptibilidade aos agentes antimicrobianos de *S. pneumoniae* isolados da nasofaringe de portadores no Município de Maringá-PR.

Antimicrobiano	**Susceptível n (%)**	**Resistência intermediária n (%)**	**Resistência n (%)**
Penicilina	5 (83,3)	1 (16,7)	-
Ofloxacina	4 (66,7)	1 (16,7)	1 (16,7)
Rifampicina	6 (100)	-	-
Cloranfenicol	6 (100)	-	-
Vancomicina	6 (100)	-	-
Levofloxacina	5 (83,3)	-	1 (16,7)
Tetraciclina	4 (66,7)	-	2 (33,3)
Sulfametoxazol + Trimetropim	5 (83,3)	-	1 (16,7)
Telitromicina	6 (100)	-	-
Linezolida	6 (100)	-	-
Eritromicina	4 (66,7)	-	2 (33,3)
Clindamicina	3 (50,0)	-	3 (50,0)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ercibengoa M, Arostegi N, Marimón JML, Alonso M, Pérez-Trallero E.** 2012. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results. BMC Infectious Diseases 12:69.
2. **Altuzarra RH, Valenzuela BMT, Trucco AO, Inostroza JS, Granata PS, Fleiderman JV.** 2007. Portación nasal de *Streptococcus pneumoniae* en adulto mayor y su respuesta frente a la vacunación antineumocócica. Revista médica de Chile, Santiago, v. 135, n. 2.
3. **Principi N, Marchisio P, Schito GC, Manelli S.** 1999. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. The Pediatric Infectiouns Disease, v. 18 (6) p. 517-523.
4. **García-Rodríguez JA & Martínez MJF.** 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 50, Suppl. S2, 59–73.
5. **Bogaert D, Groot R, Hermans WM.** 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. The Lancet Infectious Disease, v. 4, p. 144-154.
6. **Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y.** 1997. Relationship between Nasopharyngeal Colonization and the Development of Otitis Media in Children. The Journal of Infectious Diseases. v 175 p. 1440–5.

7. **Chiou CCC, Liu YC, Huang TS, Wen-Kuei HW, Wang JH, Lin HH, Yen MY, Hsieh KS.** 1998. Extremely High Prevalence of Nasopharyngeal Carriage of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* among Children in Kaohsiung, Taiwan. Journal of Clinical Microbiology., p. 1933–1937 Vol. 36, No. 7.

8. **Jebaraj R, Cherian T, Raghupathy P, Brahmadathan KN, Lalitha MK, Thomas K, Steinhoff MC.** 1999. Nasopharyngeal colonization of infants in southern India with *Streptococcus pneumoniae.* Epidemiol. Infect. v 123, p. 383-388.

9. **Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Davies TA, Katopodis GD, Appelbaum PC, Beratis NG**. 2000. Antimicrobial Use and Colonization with Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greece during the First 2 Years of Life. Clinical Infectious Diseases. v 31 p. 887–93.

10. **Chiu SS, HO PL, Chow FKH, Yuen KY, Lau IL.** 2001. Nasopharyngeal Carriage of Antimicrobial-Resistant *Streptococcus pneumoniae* among Young Children Attending 79 Kindergartens and Day Care Centers in Hong Kong. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v 45 p. 2765–2770.

11. **Soewignjo S, Gessner BD, Sutanto A, Steinhoff M, Prijanto M, Nelson C, Widjaya A, Arjoso S.** 2001. *Streptococcus pneumoniae* Nasopharyngeal Carriage Prevalence, Serotype Distribution, and Resistance Patterns among Children on Lombok Island, Indonésia. Clinical Infectious Diseases; v 32 p.1039–43.

12. **Reis JN, Palma T, Ribeiro GS, Pinheiro RM, Ribeiro CT, Cordeiro SM, Filho HPS, Moschioni M, Thompson TA, Spratt B, Riley LW, Barocchi MA, Reis MG, Ko AI.** 2008. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in an Urban Slum Community. Journaul Infections. v 57 (3). p 204-213.

13. **Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainbeg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E.** 2004. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* by

Adults and Children in Community and Family Settings. Clin Infect Dis; v 38: 632-639.

14. **Watt JP, O'brien KL, Katz S, Bronsdon MA, Elliott J, Dallas J, Perilla MJ, Reid R, Murrow L, Facklam R, Santosham M, Whitney CG.** 2004. Nasopharyngeal versus Oropharyngeal Sampling for Detection of Pneumococcal Carriage in Adults. Journal of Clinical Microbiology. v. 42. p. 4974–4976. n. 11.
15. **Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott AG.** 2008. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi District, Kenya. Journal Pediatric Infectious Desease. v 27 (1). P 59-64.
16. **Flamaing J, Peetermans WE, Vandeven J, Verhaegen J.** 2010. Pneumococcal colonization in older persons in a nonoutbreak setting. Journal of the American Geriatrics Society v. 58 nº 2, p. 396-398.
17. **Palmu AA, Kaijalainen T, Saukkoriipi A, Leinonen M, Kilpi TM.** 2012. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and pneumococcal urine antigen test in healthy elderly subjects. Scandinavian Journal of Disease v. 44, pp 433-438.
18. **Valenzuela MT, Oloughlin R, De La Hoz F, Gomez E, Constenla D, Sinha A, Valencia JE, Flannery B, De Quadros CA.** 2009. The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. Rev Panam Salud Publica. v 25(3):270-9.
19. **Sáfadi MAP.** 2007. Critérios sorológicos de proteção contra doença invasiva em crianças após vacina pneumocócica conjugada. Revista Brasileira de Medicina. p. 251-255.

20. **Velásquez PAG, Parussolo L, Cardoso CL, Tognim MCB, Garcia LB.** 2009. High prevalence of children colonized with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in public day-care centers. Jornal de Pediatria; 85(6):516-522.

21. **Prado DP, Perret PC.** 2001. *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) resistente en pediatría: Tendencia actual. Revista Chilena de Pediatria. Santiago, v 72 p. 49-51.

22. **Hill PC, Akisanya A, Sankareh K, Cheung YB, Saaka M, Lahai G, Greenwood BM, Adegbola RA.** 2006. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian Villagers. Clinical Infectious Diseases Oxford journals. v 43 p 673-679.

23. **Almeida JR, Franco FOF.** 2004. Pneumonias adquiridas na comunidade em pacientes idosos: aderência ao Consenso Brasileiro sobre Pneumonias. Jornal Brasileiro de Pneumologia. v 30(3) p: 229-236.

24. **Crews DE, Zavotka S.** 2006. Aging, disability, and frailty: implications for universal design. J Physiol Anthropol. v 25:113-8.

25. **Woodread M.** 1994. Pneumonia in the elderly. Journal of Antimicrobial Chemoterapy. Suppl. A, p 85-92.

26. **Spellerberg B, Brandt C**. 2007. *Streptococcus*. *In:* Manual of Clinical Microbiology. 9th edition. American Society for Microbiology, p. 412

27. **MaCfaddin JF.** 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3 ed. Lippincott Wiliams & Wilkins, p. 27-34. United States of America.

28. **Zettler EW, Scheibe RM, Dias CA, Santafé P, Moreira JS, Santos DS, Fritscher CC.** 2004. A reação em cadei da polimerase na detecção da resistência em *Streptococcus pneumoniae*. J Bras Pneumol v. 30 (6) p. 521-27.

29. **Pai R, Gertz RE, Beall B.** 2006. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. Journal of Clinical Microbiology. v 44: p. 124–131.

30. **Doyle JJ, Dickson EE.** 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. Taxon v 36:715-722.

31. **Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA.

32. **Obaro S, Adegbola R**. 2002. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. Journal of Medical Microbiology v 51 p. 98-104.

33. **Faust K, Demmert M, Bendiks M, Göpel W, Herting E, Härtel.** 2012. Intrapartum colonization with Streptococcus pneumonia, early-onset sepsis and deficient specific neonatal immune responses. Arch Gynecol Obstet. v 285: p 599-604.

34. **Sociedade Brasileira De Imunizações.** 2008. Informativo. Doenças Invasivas Pneumocócicas (DIP) Importância e Impacto na Saúde. Ano II n. 12. Disponível em: <http://www.sbim.org.br/sbim_info_doenca_pneumococica.pdf> Acesso em: 24 jul 2011.

35. **Brasil. Ministério da Saúde.** 2010. Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança. Incorporação março 2010. Brasília.

36. **García PC.** 2003. Resistencia bacteriana em Chile. Rev Chil Infect. v 20 (Supl 1): p 11-23.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Podemos concluir com nossos achados que a frequência de *S. pneumoniae* na nasofaringe de portadores com idade ≥ 60 anos no Município de Maringá–PR é baixa, em comparação com dados recém investigados realizados com a população pediátrica na mesma região, não havendo diferença analítica da presença do *S. pneumoniae* quanto ao tipo de instituição na qual o idoso permanece.

Resistência à penicilina foi reduzida, apresentando maiores taxas de resistência a outros antimicrobianos, sendo mais elevada para clindamicina com a presença de amostras multirresistentes.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A vacina pneumo 23 abrange apenas 24,7% dos sorotipos existentes até o momento e tendo em vista que nosso estudo foi realizado a partir dos isolados disponíveis com apenas 10 destes sorotipos, nenhum apresentou os sorotipos investigados, sendo dois dos isolados provenientes de idosos já vacinados. É recomendável que novos estudos de levantamento da prevalência de portadores sadios de *S. pneumoniae*, sejam realizados em outras regiões, mesmo onde haja alta cobertura vacinal, para se conhecer os sorotipos circulantes na população. Nesse sentido é possível verificar o impacto da vacinação sobre o estado de portador, a fim de contribuir para o desenvolvimento de vacinas mais precisas e eficazes, evitando a resistência comunitária a antimicrobianos de cepas não inclusas na vacina.

ANEXO A
CARTA DE APRESENTAÇÃO

Ao Diretor _____ Maringá, ___/___/_____

Prezada Diretor

Na qualidade de orientadora da dissertação de mestrado de Camila Fernanda Leite Roseghini, aluna do curso de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia/UEM, venho através desta solicitar a V.Sa. uma autorização para que a referida mestranda possa aplicar um questionário aos idosos pertencentes em vossa instituição, sobre os fatores de risco para o estado de idoso portador da bactéria *Streptococcus pneumoniae* no trato respiratório.

Adicionalmente, com o objetivo de verificar a prevalência de *S. pneumoniae*, também solicito autorização para que a mestranda possa coletar uma amostra das narinas dos idosos cujos os mesmos responderem ao formulário e autorizarem a coleta através da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Para facilitar o entendimento do nosso trabalho, esclarecemos que a coleta será realizada com um cotonete que será introduzido delicadamente nas narinas dos idosos, girado por 5 segundos e retirado em seguida. O material coletado será encaminhado ao Laboratório de Microbiologia Médica do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, localizado no bloco I90, sala 114, na Universidade Estadual de Maringá, para a realização das culturas bacterianas. Os idosos serão consideradas portadores quando apresentarem cultura positiva para *S. pneumoniae.*

A importância de se identificar o estado de portador entre os idosos é pelo fato de que essa bactéria pode ser disseminada, principalmente pelo contato direto, podendo vir associado à queda da imunidade por diversos fatores dentre os quais idade avançada. O idoso sadio pode ser portador da bactéria mas, em situações adversas, como por exemplo, um resfriado, esta mesma bactéria pode ocosionar doenças como otite, sinusite, conjuntivite e até mesmo doenças mais graves, como pneumonia e meningite.

Os resultados que serão obtidos com este trabalho fornecerão dados epidemiológicos de prevalência do *S. pneumoniae* em idosos asilares na região de Maringá e dessa forma poderão ser comparados com dados de estudos similares, nacionais e internacionais.

Em anexo estamos encaminhando uma cópia do projeto da dissertação e, após a obtenção da autorização pela V.Sa. para a realização do mesmo no campo solicitado será encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos (COPEP) da UEM para aprovação.

Gostaríamos de afirmar que os resultados serão divulgados de forma geral e que em nenhum momento será apresentada a identidade dos participantes.

Esperando contar com a sua colaboração, coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente

Profa. Dra. Lourdes Botelho Garcia

ANEXO B

CARTA DE AUTORIZAÇÃO

Declaramos que, nós da Instituição de longa permanência para idosos denominada _____ de Maringá-Pr, estamos de acordo com a condução do estudo que será realizado no período de julho de 2011 a dezembro de 2012 por Camila Fernanda Leite Roseghini, aluna do curso de pós-graduação de Biociências Aplicadas a Farmácia-UEM, sob a orientação da Profª Drª Lourdes Botelho Garcia, com o objetivo de investigar a presença da bactéria *Streptococcus pneumoniae* na nasofaringe dos idosos residentes em nossa instituição. Para isso a acadêmica aplicará um questionário e, com auxilio de um cotonete, coletará secreção nasal de cada um dos participantes da pesquisa.

Declaramos ainda que serão considerados participantes da pesquisa apenas os idosos que, por livre arbítrio concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e permitir a coleta de secreção nasal. Também serão considerados participantes da pesquisa idosos impossibilitados de responder por si, porém com a autorização do responsável.

Estamos cientes que tal trabalho só poderá ter início após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos-COPEP/UEM, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Maringá, ____ de _____ de 2011

_____

Responsável pela autorização

Função da pessoa na instituição

Endereço com telefone, fax e email

Ao

COPEP-UEM

ANEXO C

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

Projeto: Pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* em indivíduos não institucionalizados no Município de Maringá

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), em um estudo que está sendo conduzido para fins de pesquisa em dissertação de Mestrado de Camila Fernanda Leite Roseghini, sob orientação da Profª. Drª. Lourdes Botelho Garcia, no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual de Maringá. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. A decisão de participação é sua e não se apresse em decidir. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que vier apresentar. Após ser esclarecido(a) sobre as informações pertinentes ao estudo, no caso de aceitar fazer parte do mesmo, este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida, assinada e entregue a você como garantia de nossa responsabilidade.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria que coloniza a nasofaringe de pessoas sadias, mas também pode estar relacionada com o desenvolvimento de infecções, em todas as faixas etárias, com manifestações localizadas ou disseminadas. A importância de identificar o estado de portador é pelo fato de que esta bactéria pode ser disseminada, principalmente pelo contato direto e prolongado. A investigação será por coleta de secreção do nariz de indivíduos adultos da comunidade de Maringá, em áreas de lazer como, por exemplo, as Academias da Terceira Idade (ATIs). A coleta será feita com o auxilio de cotonete, que será introduzido delicadamente no nariz de cada individuo, até encontrar resistência nasal, o qual será rodado por 5 segundos para a absorção da secreção.

Se você concordar em participar da pesquisa nos comprometemos a:

- Respeitar sua liberdade de retirar o consentimento de participação a qualquer momento;
- Esclarecer dúvidas que você julgar necessário. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa;
- Garantir sigilo e privacidade das informações prestadas, preservando a sua não identificação nominal.

Caso você tenha mais dúvidas ou necessite maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta neste documento.

Eu, _____, estou ciente e autorizo a realização dos procedimentos acima citados e a utilização dos dados originados destes procedimentos para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, contanto que seja mantido em sigilo

informações relacionadas à minha identidade, bem como garantido meu direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, além de que se cumpra à legislação em caso de dano.

Desta forma, concordo voluntariamente e dou meu consentimento, declarando que fui satisfatoriamente esclarecido sem ter sido submetido a qualquer tipo de coação.

Assinatura do Participante ou Representante Legal

Eu, Camila Fernanda Leite Roseghini, aluna do curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da UEM, sob orientação da Profª. Drª. Lourdes Botelho Garcia, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao participante acima mencionado.

Assinatura

Maringá, _____ de _____ de 20___

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida com o pesquisador, ou em contato com o COPEP conforme endereços abaixo:

Nome: Camila Fernanda Leite Roseghini
Endereço Institucional: UEM. Av. Colombo, 5790. Fone: 3011-4952
E-mail: cfroseghini@hotmail.com

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - COPEP/UEM
Universidade Estadual de Maringá.
Av. Colombo, 5790. Campus Sede da UEM.
Bloco da Biblioteca Central (BCE) da UEM.
CEP 87020-900. Maringá-Pr. Tel: (44) 3261-4444
E-mail: copep@uem.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

Título do Projeto: Colonização da nasofaringe por *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados no município de Maringá-Paraná.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), em um estudo que está sendo conduzido para fins de pesquisa em dissertação de Mestrado de Camila Fernanda Leite Roseghini, sob orientação da Profª Drª Lourdes Botelho Garcia, no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual de Maringá. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. A decisão de participação é sua e não se apresse em decidir. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que vier apresentar. Após ser esclarecido(a) sobre as informações pertinentes ao estudo, no caso de aceitar fazer parte do mesmo, este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida, assinada e entregue a você como garantia de nossa responsabilidade.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria que coloniza a nasofaringe de pessoas sadias, mas também pode estar relacionada com o desenvolvimento de infecções, em todas as faixas etárias, com manifestações localizadas ou disseminadas. A importância de identificar o estado de portador entre idosos é pelo fato de que esta bactéria pode ser disseminada, principalmente pelo contato direto e prolongado. A investigação será por coleta de secreção do nariz dos idosos nos Centros Asilares de Maringá. A coleta será feita com o auxilio de um cotonete, que será introduzido delicadamente no nariz de cada idoso, até encontrar resistência, o qual será rodado por 5 segundo para a absorção da secreção.

Se você concordar em participar da pesquisa nos comprometemos a:

- Respeitar sua liberdade de retirar o consentimento de participação a qualquer momento;
- Esclarecer dúvidas que você julgar necessário. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa;
- Garantir sigilo e privacidade das informações prestadas, preservando a sua não identificação nominal.

Caso você tenha mais dúvidas ou necessite maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta neste documento. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Eu, _____, estou ciente e autorizo a realização dos procedimentos acima citados e a utilização dos dados originados destes procedimentos para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, contanto que seja mantido em sigilo informações

relacionadas à minha privacidade, bem como garantido meu direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, além de que se cumpra à legislação em caso de dano.

Caso haja algum efeito inesperado que possa prejudicar meu estado de saúde físico e/ou mental, poderei entrar em contato com o pesquisador responsável e/ou com demais pesquisadores. É possível retirar o meu consentimento a qualquer hora e deixar de participar do estudo sem que isso traga qualquer prejuízo à minha pessoa.

Desta forma, concordo voluntariamente e dou meu consentimento, declarando que fui satisfatoriamente esclarecido sem ter sido submetido a qualquer tipo de pressão ou coação.

Maringá, _____ de _____ de 20___

Assinatura do Participante ou Representante Legal

Eu, Camila Fernanda Leite Roseghini, aluna do curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da UEM, sob orientação da Profª Drª Lourdes Botelho Garcia, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao participante acima mencionado.

Maringá, _____ de _____ de 20___

Assinatura

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida com o pesquisador, ou em contato com o COPEP conforme endereços abaixo:

Nome: Camila Fernanda Leite Roseghini
Endereço Institucional: UEM. Av. Colombo, 5790. Fone: (44) 9976-5651
E-mail: cfroseghini@hotmail.com

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - COPEP/UEM
Universidade Estadual de Maringá.
Av. Colombo, 5790. Campus Sede da UEM.
Bloco da Biblioteca Central (BCE) da UEM.
CEP 87020-900. Maringá-Pr. Tel: (44) 3261-4444
E-mail: copep@uem.br

ANEXO D

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

Título do Projeto: Colonização da nasofaringe por *Streptococcus pneumoniae* em idosos institucionalizados no município de Maringá-Paraná.

FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Nome completo: _____

Nome do responsável (quando necessário): _____

Data de nascimento:____/____/_____

Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Anos de estudo:_____

Profissão: _____

1. Quantas pessoas dormem no mesmo ambiente? _____

2. Faz uso de medicamento controlado? ( ) Sim ( ) Não

Qual? _____

Possui alguma doença crônica citada:

( ) Insuficiência cardíaca ( ) Disfunção esplênica

( ) Insuficiência respiratória ( ) Diabete

Outro tipo (especificar) _____

3. No **último mês** você apresentou alguma destas doenças:

( ) dor de ouvido ( ) rinite

( ) dor de garganta ( ) sinusite

( ) bronquite ( ) pneumonia

( ) outras doenças: Escreva qual:_____

4. Nos últimos **três meses** você precisou de internamento hospitalar?

( ) Não ( ) Sim

Se a resposta anterior foi **Sim**, qual foi o motivo do internamento?

_____

5. No **último mês** você usou algum antibiótico?

( ) Sim ( ) Não

Se a resposta anterior foi **Sim**, qual o medicamento? Por quantos dias foi medicado?

6. Na **última semana** você apresentou febre?

( ) Sim ( ) Não

7. Tabagista? ( ) Sim ( ) Não

Se a resposta anterior foi **Sim**, por quanto tempo?

8. No ambiente em que reside possui fumantes? ( ) Sim ( ) Não

9. Com quantos anos você passou a freqüentar a instituição? _____

10. Há quanto tempo você freqüenta instituição de longa permanência para idosos? _____

11. Faz uso de sonda: ( ) Nasogástrica ( ) Nasoenteral

12. Faz uso de prótese dentaria? ( ) Sim ( ) Não

A próxima pergunta será respondida pelo pesquisador mediante apresentação da carteirinha de vacinação do idoso.

Já recebeu a vacina antipneumocócica?

( ) Sim ( ) Não ( ) Informação não disponível

Se a resposta anterior foi **Sim**, quando recebeu a vacina?

ANEXO E

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

Projeto: Pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* em indivíduos não institucionalizados no Município de Maringá

FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Nome completo: _____

Nome do responsável (quando necessário):_____

Data de nascimento: ____/____/___ Sexo: ( )Masculino ( ) Feminino

Escolaridade:_____

Profissão: _____

1. Quantas pessoas moram em sua casa?_____

2. Convive com crianças? ( ) sim ( ) não

3. Se a resposta anterior foi **Sim**,

Quantas crianças _____

Grau de parentesco? _____

Idade da(s) criança(s) _____

Tempo de convivência diária:_____

Dorme no mesmo quarto que o Sr.(a)?_____

4. Caso não tenha crianças em casa, quantas pessoas dormem no mesmo quarto que o Sr.(a)?_____

5. Faz uso de medicamento controlado? ( ) Sim ( ) Não

Qual? _____

6. Faz uso contínuo de algum medicamento? ( ) Sim ( ) Não

Qual? _____

7. Possui alguma das anomalias citadas abaixo?

( ) Insuficiência cardíaca ( ) Disfunção esplênica

( ) Insuficiência respiratória ( ) Diabete

( ) Hipertensão arterial Outro tipo (especificar) _____

8. No **último mês** você apresentou alguma das doenças citadas abaixo?

( ) dor de ouvido ( ) rinite

( ) dor de garganta ( ) sinusite

( ) bronquite ( ) pneumonia

( ) outras doenças: Qual:_____

9. Nos últimos **três meses** você precisou de internamento hospitalar?

( ) Não ( ) Sim

Se a resposta anterior foi **Sim**, qual foi o motivo do internamento? _____

_____

10. No **último mês** você usou algum antibiótico?

( ) Sim ( ) Não

11. Se a resposta anterior foi **Sim**

Qual antibiótico foi usado? _____

Por quantos dias foi medicado?_____

A quanto tempo deixou de usá-lo? _____

12. Na **última semana** você apresentou febre?

( ) Sim ( ) Não

13. Tabagista? ( ) Sim ( ) Não

14. Se a resposta anterior foi **Sim**

A quanto tempo?_____

Em caso de ex fumante, a quanto tempo abandonou o vício? _____

15. No ambiente em que reside possui fumantes? ( ) Sim ( ) Não

16. Costuma ingerir bebida alcoólica? ( ) Sim ( ) Não

17. Se a resposta for **Sim**

Qual a freqüência _____

18. Faz uso de prótese dentaria? ( ) Sim ( ) Não

Já recebeu a vacina antipneumocócica?

( ) Sim ( ) Não

Se a resposta anterior foi **Sim**, quando recebeu a vacina?

ANEXO F

2012 INSTRUCTIONS TO AUTHORS – Journal of Clinical Microbiology (JCM)

ORGANIZATION AND FORMAT

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the ASM Style Manual for Journals (American Society for Microbiology, 2012, in-house document) and How To Write and Publish a Scientific Paper, 6th ed. (Greenwood Press, Westport, CT, 2006), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department.

The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions.

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings. Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and References, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages must have continuous line numbers and page numbers. Manuscripts without line and page numbers will be returned to authors for provision of this information prior to processing. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter “oh” (O); the numeral one (1), the letter “el” (l), and the letter “eye” (I); and a multiplication sign (×) and the letter “ex” (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the “insert symbol” function. Set the page size to 8.5 by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions.

Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language or engage a professional language editing service for help.

Full-Length Papers

Full-length papers include the elements described in this section.

Title, running title, and byline. Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, the address(es) of the institution(s) at which the work was performed, each author's affiliation, and a footnote indicating the present address(es) of any author(s) no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see "Correspondent footnote," below).

Study group in byline. A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members may be given as a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote. The e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication and will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. No more than two authors may be designated corresponding authors.

Abstract. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the same format as shown for the References section but omit the article title. Conclude the abstract with a summary statement. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was

addressed or the rationale for the present study. Choose references carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Case Report. The Case Report section, placed after the introduction and before Materials and Methods, is optional and gives relevant clinical information about one or more patients while being incidental to the rest of the paper. (If the Case Report constitutes the entire article, the paper must be presented in Case Report format [see "Case Reports," below], which differs from that used for a full-length text or a ShortForm paper [formerly a Note].)

Materials and Methods. The Materials and Methods section must include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. The sources of all media (i.e., name and location of manufacturer) or components of a new formulation must be provided. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force (g rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference or specifically recommended product or procedure is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state "cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)" rather than to state "cells were broken as previously described (9)." This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

Results. In the Results section, include the rationale or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data which might be more concisely presented in the text or tables. For example, except in unusual cases, double-reciprocal plots used to determine

apparent Km values should not be presented as graphs; instead, the values should be stated in the text. Similarly, graphs illustrating other methods commonly used to derive kinetic or physical constants (e.g., reduced-viscosity plots and plots used to determine sedimentation velocity) need not be shown except in unusual circumstances. All tabular data must be accompanied by either standard deviation values or standard errors of the means. The number of replicate determinations (or animals) used for making such calculations must also be included. All statements concerning the significance of the differences observed should be accompanied by probability values given in parentheses. The statistical procedure used should be stated in Materials and Methods. Limit illustrations (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion. The Discussion section should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand. It must not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments. The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: “This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute.”

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Appendixes. Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either fulllength paper or Short-Form (formerly Note) style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter “A” preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References. Beginning with the January 2013 issue, ASM will change the way in which references are numbered throughout articles. Citations will be numbered in the order in which

they appear in the article (citation-sequence reference system); ASM will no longer use the citation-name system with an alphabetized reference list. Also beginning with January 2013 issues, entries in References will include all authors' names; "et al." will not be used in author lines. The following describes the style that will be effective in January 2013.

(i) References listed in the References section. The References section must include all journal articles (both print and online), books and book chapters (both print and online), patents, theses and dissertations, published conference proceedings, meeting abstracts from published abstract books or journal supplements, letters (to the editor), and company publications, as well as in-press journal articles, book chapters, and books (publication title must be given). References should be cited in numerical order as they appear in the text (citationsequence system). Since figures and tables will be inserted in the text where first cited, references first mentioned in figure legends and tables should be numbered so that the numbers are in sequence with those in the text. To ensure the correct order of reference numbers, the parts of the manuscript should be in the correct order before the citations are ordered. Provide the names of all the authors for each reference, as the author line will not be abbreviated and "et al." will not be used. All listed references must be cited parenthetically by number in the text. Since title and byline information that is downloaded from PubMed does not always show accents, italics, or special characters, authors should refer to the PDF files or hard-copy versions of the articles and incorporate the necessary corrections in the submitted manuscript. Abbreviate journal names according to the PubMed Journals Database (National Library of Medicine, National Institutes of Health; available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db journals), the primary source for ASM style.

Follow the styles shown in the examples below for print references.

1. **Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM.** 2012. In vivo and in vitro analyses of regulation of the pheromone-responsive prgQ promoter by the PrgX pheromone receptor protein. J.Bacteriol. 194:3386 –3394.

2. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. Antimicrob. Agents Chemother. 50:2274 –2275. (Letter.) {"Letter" or "Letter to the editor" is allowed but not required at the end of such an entry.}

3. **Cox CS, Brown BR, Smith JC. J.** Gen. Genet., in press.*{Article title is optional; journal title is mandatory.}

4. **da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA**. 2001. Genus I. Thermus Brock and Freeze 1969, 295, AL emend. Nobre, Tru¨per and da Costa 1996b, 605, p 404 –414. In Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.

5. **Stratagene**. 2006. Yeast DNA isolation system: instruction manual. Stratagene, La Jolla, CA. {Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}

6. **Forman MS, Valsamakis A.** 2011. Specimen collection, transport, and processing: virology, p 1276 –1288. In Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), Manual of clinical microbiology, 10th ed, vol 2. ASM Press, Washington, DC.

7. **Fitzgerald G, Shaw D. In Waters AE** (ed), Clinical microbiology, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA.* {Chapter title is optional.}

8. **Garcı´a CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, Garcı´a-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR.** 1996. Detection of Salmonella DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. Arthritis Rheum. 39(Suppl 9):S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}

9. **Smith D, Johnson C, Maier M, Maurer JJ.** 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry Salmonella enterica serovars, abstr P-038, p 445. Abstr. 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. {Abstract title is optional.}

10. **Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP.** 2005. Abstr. 45th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. abstr D-1658. {Abstract title is optional.}

11**. Green PN, Hood D, Dow CS.** 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251–254. In Crawford RL, Hanson RS (ed), Microbial growth on C1 compounds. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.

12. **O'Malley DR.** 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles, CA. {Title is optional.}

13. **Odell JC.** April 1970. Process for batch culturing. US patent 484,363,770. {Include the name of the patented item/process if possible; the patent number is mandatory.}

14. **Elder BL, Sharp SE.** 2003. Cumitech 39, Competency assessment in the clinical laboratory. Coordinating ed, Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., JCM05577-12) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

Online-only references must provide essentially the same information that print references do. For online journal articles, posting or revision dates may replace the year of publication; a DOI (preferred) or URL is required for articles with nontraditional page numbers or electronic article identifiers.

1. **Winnick S, Lucas DO, Hartman AL, Toll D.** 2005. How do you improve compliance? Pediatrics 115:e718 – e724.

2. **Smith FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM.** 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2250 – 2255. doi:10.1073/pnas.041593698.

3. **Dionne MS, Schneider DS.** 2002. Screening the fruitfly immune system. Genome Biol. 3:REVIEWS1010. http: //genomebiology.com/2002/3/4/reviews/1010.

4. **Gregory ST.** 2 September 2009, posting date. Chapter 2.5.4, Structural basis for the decoding mechanism. In Bo¨ck A, et al (ed), EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC. http: //www.ecosal.org/. {Note that each chapter has its own posting date.}

Note: a posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed.

(ii) References cited in the text. References to unpublished data, manuscripts submitted for publication, unpublished conference presentations (e.g., a report or poster that has not appeared in published conference proceedings), personal communications, patent applications and patents pending, computer software, databases, and websites should be made parenthetically in the text as follows.

. . . similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).

. . . system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).

. . . as described previously (M. G. Gordon and F. L. Ratt ner, presented at the Fourth Symposium on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). {For nonpublished abstracts and posters, etc.}

. . . this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.}

. . . available in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html).

. . . using ABC software (version 2.2; Department of Microbiology, State University [http://www.state.micro.edu]).

URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may not be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

(iii) References related to supplemental material. References that are related only to supplemental material hosted by ASM or posted on a personal/institutional website should not be listed in the References section of an article; include them with the supplemental material itself.

(iv) Referencing ASM Accepts (publish-ahead-of-print) manuscripts. Citations of ASM Accepts manuscripts should look like the following example.

Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. Mol. Cell. Biol. doi: 10.1128/MCB.00586-06.

Other journals may use different styles for their publishahead-of-print manuscripts, but citation entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title, and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. 13 February 2001, posting date. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. doi:10.1073/pnas.041593698.

Short-Form Papers (Formerly Notes)

The Short-Form format is intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length papers. However, Short-Form papers should contain firm data; observations alone are not acceptable. Submit Short-Form papers in the same way as full-length papers. They receive the same review, they are not published more rapidly than full-length papers, and they are not considered preliminary communications.

The title, running title (not to exceed 54 characters and spaces), byline, and correspondent footnote should be prepared as for a full-length paper. Each Short-Form paper must have an abstract of no more than 50 words. Do not use section headings in the body of the Short Form; combine methods, results, and discussion in a single section. Paragraph lead-ins are permissible. The text should be kept to a minimum and if possible should not exceed 1,000 words; the number of figures and tables should also be kept to a minimum. Materials and

methods should be described in the text, not in figure legends or table footnotes. Present acknowledgments as in full-length papers. The References section is identical to that of full-length papers.