



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

MARIANA SALGADO BRANCO SIMÕES

***PODEMOS DETETAR PNEUMOCOCO NA SALIVA DE CRIANÇAS
EM IDADE PRÉ-ESCOLAR?***

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE PEDIATRIA

Trabalho realizado sob orientação de:

PROFESSORA DOUTORA FERNANDA RODRIGUES

DRA. ANA SOFIA SIMÕES

FEVEREIRO 2019

**PODEMOS DETETAR PNEUMOCOCO NA SALIVA DE CRIANÇAS EM IDADE PRÉ-
ESCOLAR?**

CAN WE DETECT PNEUMOCOCCUS IN SALIVA FROM PRESCHOOL CHILDREN?

Autores: Mariana Simões¹, Ana Sofia Simões², Begonia Morales-Aza³, Adam Finn³,
Fernanda Rodrigues^{1,2}

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

²Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

³Schools of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, United Kingdom

Autor correspondente: Fernanda Rodrigues

Morada institucional: Hospital Pediátrico, Av. Afonso Romão, 3000-602 Coimbra

Endereço de Correio Eletrónico: rodriguesfmp@gmail.com

ÍNDICE

RESUMO	3
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS	8
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO	13
CONCLUSÃO	16
AGRADECIMENTOS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

RESUMO

Introdução: Os estudos de colonização nasofaríngea permitem avaliar o impacto da utilização das vacinas conjugadas pneumocócicas no vacinado e na transmissão da bactéria entre indivíduos e, por conseguinte, os seus efeitos na proteção individual e da população (imunidade de grupo). São habitualmente feitos através de análises laboratoriais de amostras de secreções nasofaríngeas (NF) obtidas por técnicas não invasivas. A deteção de *Streptococcus pneumoniae* (Sp) por PCR em saliva foi descrita numa elevada proporção de indivíduos. Tendo obtido resultados semelhantes num grupo de crianças portuguesas, pretendeu-se com este estudo comparar a presença desta bactéria em secreções NF e na saliva da mesma criança, de forma a avaliar a possibilidade da utilização deste produto biológico em estudos de colonização bem como avaliar o seu papel na transmissão do pneumococo.

Material e Métodos: Em 2015 obtivemos pares de saliva e de secreções NF em 95 crianças, com idades entre os 6 meses e os 6 anos, em infantários de Coimbra. Efetuámos cultura destas amostras biológicas utilizando métodos padrão e, quando ocorreu crescimento bacteriano, foi feita extração de ADN. Foi utilizada qPCR de gene único (*lytA*) para deteção de *Streptococcus pneumoniae*. Quando Sp foi identificado simultaneamente nas duas amostras, procedeu-se à serotipagem utilizando uma técnica molecular de *microarray*.

Resultados: Dos 95 pares de amostras colhidos, obtivemos 49 (51,58%) simultaneamente positivos para Sp. Das amostras da NF, 45/49 (91,8%) apresentaram evidência de presença de Sp por *microarray*, 3 eram estreptococos não-Sp e num caso não havia Sp ou espécies relacionadas. Em 36 (80%) foi detetado um serotipo único e em 9 (20%) múltiplos. Em contraste, apenas 3/49 (6,1%) amostras de saliva tinham evidência de presença de Sp por *microarray*, em todos os casos correspondendo ao mesmo serotipo de Sp detetado na NF dessa mesma criança; nos 3 casos, Sp era pouco abundante na saliva quando comparado com a abundância na NF (23A: 5% vs 95%; 35F: 4% vs 99%; 9N: 1% vs 100% respetivamente) e encontrava-se incluído numa mistura complexa de outras espécies bacterianas. O número médio de espécies de estreptococos detetado na NF foi 1,6 e na saliva foi 4,3.

Discussão e conclusão: Os resultados deste estudo sugerem que a deteção de Sp por *lytA* qPCR na saliva de crianças em idade pré-escolar poderá refletir a presença de estreptococos da flora oral geneticamente relacionados, que se apresentam em misturas complexas de espécies, e não de pneumococos. Estes achados sugerem também que a

transmissão de Sp pela saliva pode ser menos importante do que pelas secreções nasais nessa faixa etária e que a sua utilização em estudos de colonização tem limitações.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; Secreções nasofaríngeas; Saliva; Colonização; Serotipo; *Microarray*.

ABSTRACT

Introduction: Nasopharyngeal colonization studies allow to assess the impact of pneumococcal conjugate vaccines use on the vaccinated person and on transmission of the bacterium between individuals and, therefore, its effects on individual protection and at the population level (herd immunity). They are usually performed by laboratory analysis of nasopharyngeal (NP) secretions obtained by non-invasive techniques. The detection of *Streptococcus pneumoniae* (Sp) in saliva using PCR has been described in a high proportion of individuals. Having obtained similar results in a group of Portuguese children, this study aimed to compare the presence of this bacterium in NF secretions and saliva of the same child, in order to evaluate the possibility of using this biological sample in colonization studies, as well as to assess the role of saliva in pneumococcal transmission.

Material and Methods: In 2015, we obtained pairs of saliva and NF secretions in 95 children aged 6 months to 6 years attending nurseries in Coimbra. These biological samples were cultured using standard methods and, when bacterial growth occurred, DNA was extracted. Single-gene qPCR (*lytA*) was used to detect Sp. When Sp was identified simultaneously in both samples, serotyping was performed using a microarray molecular technique.

Results: Of the 95 pairs of samples collected, 49 (51%) were simultaneously positive for Sp. 45/49 (91,8%) NP samples showed evidence of the presence of Sp by microarray, 3 were non-Sp streptococci and in one case there was no Sp or related species. In 36 (80%) a single serotype was detected and in 9 (20%) multiple serotypes were present. In contrast, only 3/49 (6,1%) saliva samples had evidence of Sp by microarray, in all cases corresponding to the same Sp serotype detected in the NP of that same child; in all 3 cases, Sp was poorly abundant in saliva when compared to the abundance in NP (23A: 5% vs 95%; 35F: 4% vs 99%; 9N: 1% vs 100% respectively) and was included in a complex mixture of other bacterial species. The mean number of streptococcal species detected in NP was 1,6 and in saliva was 4,3.

Discussion and Conclusion: The results of this study suggest that the detection of Sp by *lytA* qPCR in saliva of preschool children may reflect the presence of genetically related streptococci of oral flora, which are found in complex mixtures of species, and not pneumococcus. These findings also suggest that the transmission of Sp by saliva may be less important than by nasal secretions in this age group and that its use in colonization studies has limitations.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; Nasopharyngeal secretions; Saliva; Colonization; Serotype; *Microarray*.

INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae (Sp) é uma bactéria gram positiva, que causa diferentes infeções, algumas com elevada morbilidade e mortalidade, em particular em países subdesenvolvidos. Estima-se que em 2015, a nível global, tenha sido responsável por 318,000 mortes entre os 0 e os 5 anos.¹ Em 2017, a Organização Mundial de Saúde incluiu esta bactéria na lista dos 12 patogénios que constituem maior ameaça à vida humana.²

Tendo o homem como hospedeiro obrigatório, integra a flora do trato respiratório superior^{3,4}, colonizando a nasofaringe (NF). É a partir daqui que a bactéria é transmitida entre indivíduos.^{5,6} Estudos realizados em infantários portugueses demonstram que 51-62% das crianças estão colonizadas por Sp e que esta taxa de colonização varia com a idade, sendo superior em crianças com menos de 2 anos.^{7,8}

Da NF, a bactéria pode também disseminar-se para os tecidos adjacentes, dando origem a sinusite, otite média aguda e pneumonia, ou invadir a corrente sanguínea, dando origem a pneumonia, meningite, sépsis ou bacteriémia. A colonização da NF é considerada o ponto de partida e pré-requisito para o desenvolvimento de doença invasiva pneumocócica (DIP).^{5,6}

Atualmente são conhecidos mais de 90 serotipos de Sp e, apesar de todos poderem causar doença invasiva, um número relativamente pequeno é responsável pela maioria dos casos de doença na criança.^{9,10}

Pela maior frequência e risco de doença grave nos primeiros 2 anos de vida, a prevenção através da vacinação tornou-se particularmente importante neste grupo etário.¹¹ As vacinas conjugadas começaram a ser comercializadas em Portugal em 2001 e em 2015 a vacina conjugada 13-valente (VCP13v; Prevenar13[®], Pfizer) passou a integrar o Programa Nacional de Vacinação (PNV).¹²⁻¹⁴

Nos países que introduziram estas vacinas em PNV, observou-se uma diminuição da colonização e da doença não invasiva causada por serotipos vacinais (SVs) e uma importante redução da DIP causada pelos mesmos serotipos, com consequente redução das taxas de hospitalização e mortalidade.^{15,16} Este efeito foi observado em indivíduos vacinados, mas também na população não vacinada, revelando um importante efeito protetor indireto da vacinação (imunidade de grupo).^{17,18} Simultaneamente, verificou-se um aumento dos serotipos não vacinais (SNVs) em colonização e algum aumento da doença invasiva e não invasiva causada por estes serotipos (fenómeno de substituição), embora de menor magnitude do que a redução da doença causada por SVs.¹⁹⁻²¹

A avaliação do impacto da utilização destas vacinas na colonização e na transmissão de Sp e, por conseguinte, os seus efeitos na proteção individual e populacional ao longo do tempo são muito importantes. Para além da monitorização da doença, esta avaliação pode também ser feita através de estudos de colonização com análise laboratorial de amostras biológicas obtidas através de técnicas não invasivas.

A colheita de secreções da NF com zaragatoa é o método habitualmente utilizado nos estudos de colonização de Sp. Este procedimento exige treino e pode causar algum desconforto e dor.²²

Estudos efetuados em adultos descrevem a saliva como sendo um produto biológico no qual é possível a deteção de Sp e concluem também pela superioridade dos métodos moleculares na identificação de Sp, dado que a natureza polimicrobiana da saliva torna muito difícil a deteção da bactéria por cultura.²³⁻²⁶

A deteção de Sp por PCR em saliva de crianças saudáveis foi também descrita numa elevada proporção de amostras.²⁷

O caráter não invasivo e a simplicidade de obtenção de saliva levou a que esta fosse considerada uma amostra biológica a utilizar em estudos de colonização. No entanto, a existência de outras bactérias, nomeadamente diversas espécies de *Streptococcus* fenotipicamente similares ao Sp, pode tornar difícil a sua deteção ou distinção mesmo quando se utilizam técnicas de biologia molecular.²⁸

Pretendeu-se com este estudo comparar a presença de Sp em amostras da NF e de saliva da mesma criança, de forma a avaliar a possibilidade da utilização deste produto biológico em estudos de colonização, bem como avaliar o papel da saliva na transmissão de Sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratou-se de um estudo prospetivo, transversal, observacional, sem intervenção, que decorreu em 2015. Foram efetuadas colheitas simultâneas de saliva e de secreções da NF em 95 crianças com idades compreendidas entre os 6 meses e os 6 anos, a frequentar infantários de Coimbra. Estes infantários fazem parte de um programa de vigilância de colonização nasofaríngea por germens respiratórios iniciado em 2007, e foram escolhidos por conveniência – estão localizados em Coimbra e têm um número de crianças superior a 50. Para além das amostras biológicas, foram recolhidos dados demográficos.

As amostras foram obtidas por enfermeiras treinadas, utilizando uma zaragatoa (Peel Pouch Dryswabs; MW113, MWE, UK) que foi inserida na NF, cuja ponta foi colocada em tubos de 2mL, contendo 1.5mL de meio de transporte e armazenamento (Skim milk-Tryptone-Glucose-Glycerol (STGG)). Simultaneamente foram obtidas amostras de saliva utilizando cotonetes de polígonos de espuma (RML120-905 Rocialle, South Wales, UK). Estes eram colocados na boca da criança até ficarem embebidos em saliva. A ponta era removida e o conteúdo espremido (utilizando uma seringa) para um tubo que continha 1mL do mesmo meio de transporte e armazenamento. As amostras foram guardadas a -80°C até análise laboratorial. Efetuou-se cultura utilizando métodos padrão e quando houve crescimento bacteriano este foi removido com uma ansa e colocado em 1mL de TSB (trypticase soy broth) com glicerol a 15% de forma a obter uma cultura amplificada ou enriquecida. Posteriormente foi feita extração de ADN com o *QIASymphony SP instrument* (Qiagen, Manchester, UK) utilizando o *QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit (937036, Qiagen, Manchester, UK)*. Foi utilizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) de gene único (*lytA*) para deteção de Sp. A escolha deste gene foi feita porque é o mais utilizado. Considerou-se amostra positiva quando a deteção ocorreu com um limiar de ciclo (*Ct*) inferior a 36 ciclos.

As amostras simultaneamente positivas para Sp na NF e na saliva foram serotipadas utilizando uma técnica molecular de *microarray*. Esta técnica permite determinar o(s) serotipo(s) presente(s) na amostra com base na combinação dos genes de biossíntese do polissacarídeo da cápsula (*cps*) e atribui uma abundância relativa, usando a intensidade do sinal dos genes *cps* associados a cada serotipo. Adicionalmente, é possível a deteção de pneumococos não encapsulados sem genes *cps* (não tipáveis) e a discriminação de outras espécies de estreptococos relacionados com Sp, tais como *S. mitis*, *S. oralis* e *S. pseudopneumoniae*, que podem conter homólogos do gene *cps*.^{29,30}

O significado das diferenças entre as amostras biológicas foi avaliado usando os testes de Qui-quadrado e Mann-Whitney. Foi considerado um nível de significância estatística de $p < 0,05$.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Foi obtido consentimento informado escrito por parte dos pais das crianças que participaram no estudo.

RESULTADOS

Das 95 crianças que participaram no estudo, 71 (74,7%) tiveram Sp identificado nas secreções da NF e 51 (53,7%) na saliva. Nestas 95 crianças, em 49 obtivemos identificação simultânea de Sp nos dois produtos biológicos e foram estas o alvo deste estudo. A idade mediana destas crianças foi de 51 meses (25-75) e 39% eram do sexo masculino. A cobertura vacinal com a vacina conjugada pneumocócica era superior a 80%.

Os resultados do *microarray* realizado nas duas amostras são apresentados na tabela 1.

Tabela I – Espécies de *Streptococcus* detetadas por *microarray* nas 49 amostras de secreções nasofaríngeas e de saliva

Espécies de <i>Streptococcus</i>	Secreções da nasofaringe	Saliva
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	45	3
<i>Streptococcus spp</i> não-pneumococo	3	44
Ausentes	1	2

Teste Qui-quadrado $p < 0,00001$

Das 49 amostras de secreções da NF em que houve identificação de Sp por qPCR, 45 (91,8%) apresentaram evidência de presença de Sp por *microarray*, três (6,1%) mostraram apenas *Streptococcus spp* não-pneumococo e uma não apresentou evidência de Sp ou espécies relacionadas. Em 36 (80%) dos casos houve evidência de um único serotipo de Sp e em nove (20%) houve evidência de dois ou mais serotipos, bem como Sp não tipáveis.

Em contraste, apenas três (6,1%) das 49 amostras de saliva em que houve identificação de Sp por qPCR tiveram evidência de presença de Sp por *microarray*, em todos os casos correspondendo ao mesmo serotipo de Sp detetado na NF da mesma criança. Nos três casos, Sp foi encontrado em abundância reduzida na saliva quando comparada com a sua abundância nas secreções da NF (serotipo 23A: 5% vs 95%; 35F: 4% vs 99%; 9N: 1% vs 100% respetivamente) (Fig. 1) e fazendo parte de uma mistura complexa de outras espécies.

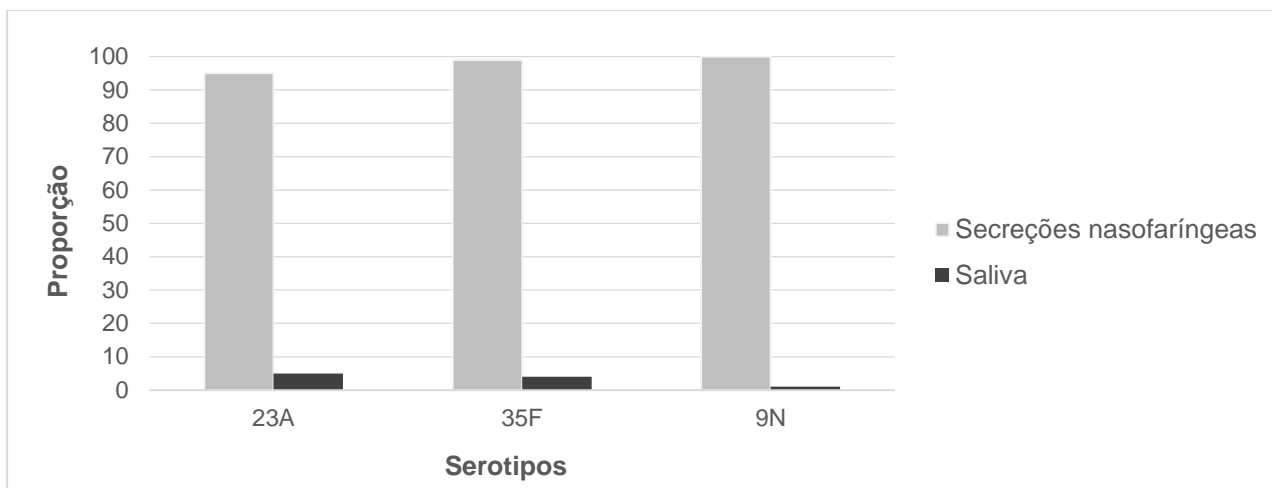
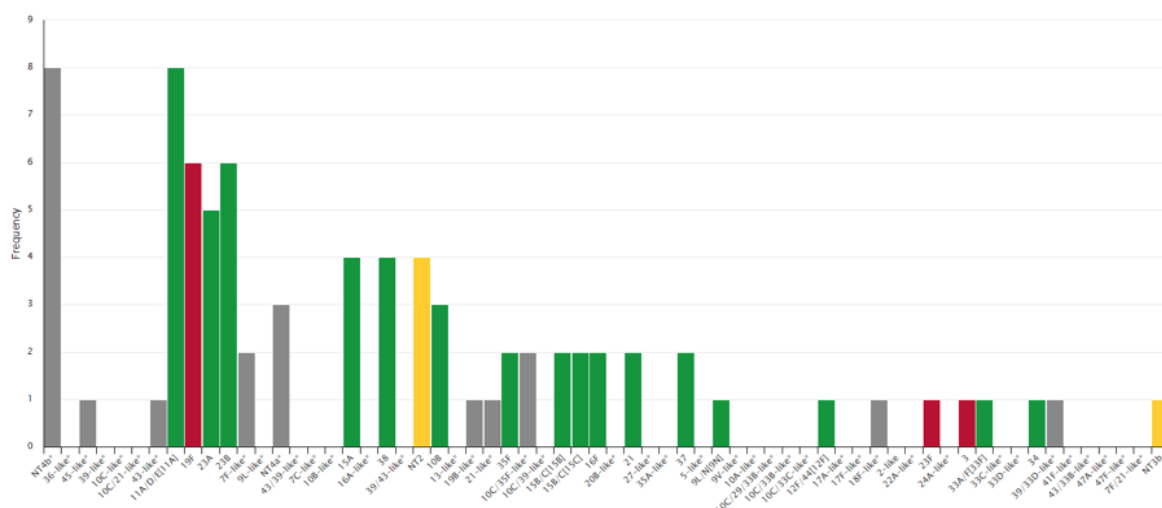


Figura 1 – Abundância de *S. pneumoniae* detetado simultaneamente em amostras de secreções da nasofaringe e saliva, determinada pela técnica de *microarray*

A frequência relativa de Sp (serotipos vacinais, não vacinais e não tipáveis) e de espécies de estreptococos não-pneumococos portadoras de genes capsulares homólogos, detetadas por *microarray* na saliva e nas secreções da NF, é apresentada na figura 2, sendo clara a predominância de Sp na NF (Fig. 2A), dominada pela presença de serotipos não vacinais. Foram detetados 3 serotipos vacinais: 19F, 23F e 3. Na saliva (Fig. 2B) é claro o predomínio de *Streptococcus* spp não-pneumococo e um número escasso de Sp.

A. NASOFARINGE



B. SALIVA

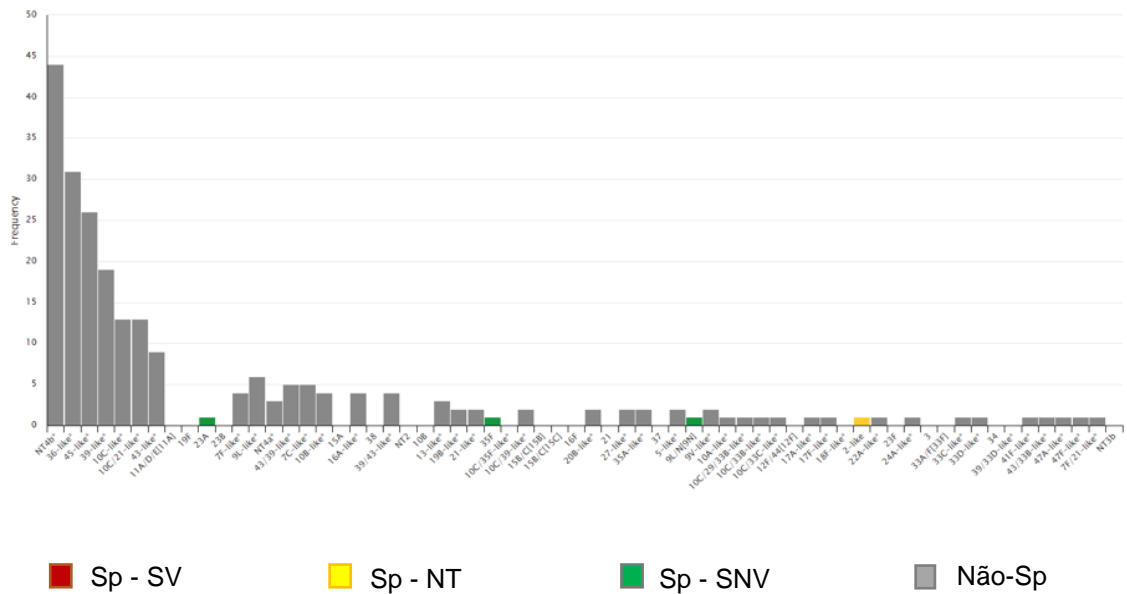


Figura 2 – Frequência da detecção de *S. pneumoniae* [serotipos vacinais (SV), não- vacinais (SNV) e não-tipáveis (NT)] e *Streptococcus* spp não-pneumococo contendo genes capsulares homólogos (Não-Sp), nas secreções da nasofaringe (A) e na saliva (B), obtida pela técnica de *microarray*.

O número médio de espécies de estreptococos identificado pela análise de *microarray* nas amostras da nasofaringe foi de 1,6, enquanto na saliva foi de 4,3 (com medianas e intervalos de 1 [0-5] e 5 [0-8], respetivamente) (teste de Mann-Whitney: $p < 0,01$).

DISCUSSÃO

A avaliação dos efeitos diretos e indiretos da vacinação baseia-se em estudos de colonização NF em crianças nos primeiros anos de vida. A escolha deste grupo etário é justificada pelas elevadas taxas de colonização nasofaríngea quando comparadas com uma prevalência muito menor noutros grupos etários. Neste estudo, utilizámos outro produto biológico - saliva - para avaliar o seu papel potencial em estudos de colonização de Sp em crianças.

A cultura era o método padrão para identificação de Sp nos estudos de colonização, mas a qPCR emergiu como um método alternativo de deteção. Embora o custo de consumíveis e equipamentos seja mais alto do que para a cultura, a reprodutibilidade com eficiência de tempo e simplicidade, resulta em custo-benefício. Diversas estratégias de PCR foram desenvolvidas para a identificação de pneumococos, procurando marcadores específicos de ADN. A *lytA* qPCR é amplamente utilizada e recomendada para deteção de Sp.²²

A saliva é uma amostra biológica que permite uma colheita rápida e fácil, sem desconforto, mostrando-se atrativa para este tipo de estudos. Mas a cavidade oral é um nicho ecológico para muitas outras espécies de estreptococos fenotipicamente semelhantes ao Sp, afetando a sensibilidade e a especificidade para deteção de Sp. A distinção entre Sp e outros estreptococos orais do grupo *viridans* e *S. pseudopneumoniae* pode ser difícil.³¹⁻³³

Alguns estudos demonstraram maior sensibilidade dos métodos moleculares em relação à cultura para a deteção de pneumococos na saliva.^{26,27}

No único estudo pediátrico realizado em amostras de saliva, que decorreu na Holanda em 50 crianças com idades compreendidas entre os 5 e os 10 anos²⁷, Sp foi identificado por qPCR em 44 (88%), em contraste com os 2 (4%) identificados por cultura, um número que aumentou para 11 (22%) quando os produtos foram extensivamente recultivados.²⁷ Em 2014, um estudo efetuado em crianças em idade pré-escolar em Coimbra, utilizando também biologia molecular, identificou Sp em 73/114 (64%) crianças estudadas (dados não publicados). Os dois estudos utilizaram cultura amplificada seguida de qPCR (*lytA* e *piaA* no primeiro e *lytA* no segundo) para identificação de Sp.

Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a identificação de Sp por qPCR na saliva numa elevada percentagem das crianças estudadas (54%).

No entanto, a comparação direta entre amostras de secreções da NF e de saliva da mesma criança para deteção de Sp e a serotipagem destes Sp pela técnica molecular de *microarray*, não tinha sido feita até à data.

O passo seguinte que utilizámos foi, com recurso a essa técnica molecular, comparar os serotipos presentes nas amostras biológicas quando ocorreu identificação de Sp em ambas.

Observámos que as amostras de secreções da NF e de saliva de crianças em idade pré-escolar diferem muito na sua composição em relação às espécies de estreptococos. As primeiras contêm frequentemente pneumococos, em abundância, com um serotipo único ou altamente dominante, geralmente sem outras espécies de estreptococos. A saliva contém uma mistura de várias espécies de estreptococos, com pneumococo geralmente indetetável e, quando presente, a constituir uma percentagem muito pequena dos estreptococos da amostra. A saliva é um meio polimicrobiano complexo, onde estão presentes várias espécies estreptocócicas, maioritariamente não pneumocócicas.

A concordância entre os resultados da qPCR e do *microarray* na NF foi muito elevada, mas o mesmo não ocorreu na saliva.

Foi demonstrada anteriormente, com recurso a técnicas de PCR, a presença de homólogos de genes específicos de Sp em espécies de estreptococos não-Sp, o que demonstra sobreposição genética entre Sp e outras espécies de *Streptococcus* relacionadas.²⁸ Um exemplo é a presença de genes capsulares que se julgavam exclusivos do Sp noutras espécies estreptocócicas que integram a flora comensal da cavidade oral, tais como *S. mitis* e *S. oralis*.³⁴ Esta semelhança é explicada por processos de recombinação resultantes da interação entre pneumococos e outros estreptococos, que contribui não só para a similaridade genética entre as espécies, mas também para a própria evolução das mesmas.^{35,36}

Assim, a deteção de Sp por qPCR utilizando genes que podem estar presentes noutros estreptococos poderá levar à identificação de outras espécies de estreptococos, originando falsos-positivos em quantidade difícil de determinar.²⁸ Este facto poderá explicar a discrepância entre o resultado da *lytA* qPCR e o resultado do *microarray* na saliva e a discrepância detetada quando comparamos amostras NF e de saliva, na qual a presença de outros estreptococos é muito mais abundante. Como tal não acontece na NF, a especificidade de *lytA* qPCR para deteção de Sp nesta amostra biológica é elevada.

Os achados deste estudo contrastam com algumas das conclusões apresentadas pelo grupo holandês que também estudou amostras de saliva em crianças. Nesse estudo, foram efetuadas análises moleculares adicionais nos extratos de ADN de amostras de saliva e nos produtos da cultura e procederam a serotipagem por técnica de PCR, tendo identificado serotipos em 23 das 44 crianças com identificação de Sp (52%), concluindo que a qPCR (*lytA* e *piaA*) positiva correspondia a presença de pneumococo na saliva.²⁷

Existem várias explicações possíveis para essas conclusões contrastantes. É possível que existam diferenças entre as faixas etárias e as populações estudadas, embora sejam pouco prováveis. A colonização por *Sp* é mais elevada na baixa idade e comum na faixa etária que estudámos na população portuguesa.^{7,8} É mais provável, portanto, que as diferenças estejam nas metodologias usadas. A detecção molecular de sequências de ADN nos extratos de ADN de amostras biológicas contendo bactérias de muitas espécies (em contraste com extratos puros), pode mostrar a presença dessas sequências, mas não pode determinar a que microorganismos pertencem. Assim, a interpretação dos resultados de qPCR positivos deve ter este aspeto em conta. Como já foi referido, a saliva contém muitas bactérias, incluindo muitas espécies de estreptococos que compartilham muita homologia de ADN com pneumococos. Além disso, a presença de sequências que caracterizam o locus capsular observadas em pneumococos encapsulados, nem sempre indicam a presença de um locus capsular completo e totalmente funcional e, portanto, com a capacidade de expressar cápsula. No estudo holandês é também descrito que foram excluídos resultados falso-positivos porque as sequências do gene capsular detetadas eram significativamente mais abundantes do que outros genes específicos do pneumococo ou porque continham erros.²⁷ Estes parecem ser indicadores adicionais do problema com falsos positivos usando esta abordagem.

A tipagem capsular por *microarray* demonstrou ser sensível e específica em vários estudos publicados, incluindo alguns nesta mesma população portuguesa.^{37,38} Numa comparação detalhada dos métodos de serotipagem, concluiu-se ser preferível aos métodos baseados em PCR.³⁹ Salienta-se ainda a superioridade deste método molecular na distinção entre diferentes espécies estreptocócicas, as vantagens na avaliação da sua abundância relativa, sendo muito sensível na detecção de serotipos presentes em percentagens muito baixas.³⁰

Adicionalmente, não é expectável que o método gere resultados falso-negativos em amostras de saliva. Serão importantes estudos futuros que ajudem a explicar estas diferenças.

Os *Sp* detetados na NF são maioritariamente serotipos não vacinais tal como seria de esperar numa população com elevada cobertura vacinal. A exceção é o serotipo vacinal 19F que, tal como descrito nesta população³⁸ e noutras⁴⁰, se manteve presente em colonização.

A existência de genes capsulares idênticos em *Sp* e outras espécies estreptocócicas levanta também questões relacionadas com a vacinação. O alvo das vacinas anti-pneumocócicas são os polissacarídeos capsulares, que definem os serotipos de *Sp*.^{41,42} Isto pode levar a que a vacinação tenha a sua ação não só em pneumococos como também noutras espécies comensais do trato respiratório.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a detecção de Sp por *lytA* qPCR na saliva de crianças em idade pré-escolar poderá refletir a presença de estreptococos da flora oral geneticamente relacionados com Sp, que se apresentam em misturas complexas de espécies, e não de pneumococos. Estes achados sugerem também que a transmissão de Sp pela saliva pode ser menos importante do que pelas secreções nasais nessa faixa etária e que a sua utilização em estudos de colonização tem limitações.

Este estudo enfatiza também os desafios práticos e conceptuais enfrentados ao tentar definir limites distintos entre estas espécies, pelo que novas estratégias para a sua distinção serão necessárias no futuro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às crianças e suas famílias; às enfermeiras que efetuaram as colheitas.

Agradeço à Professora Doutora Fernanda Rodrigues e à Dra. Ana Sofia Simões pela orientação e disponibilidade.

Agradeço à família e aos amigos pelo apoio incondicional.

OBSERVAÇÕES

Estudo aprovado pela Comissão de Ética do CHUC.

Projeto de iniciativa do investigador, financiado pela Pfizer Vaccines.

Apresentado na forma de comunicação oral:

- no 19º Congresso Nacional de Pediatria, 24 a 26 de outubro de 2018, onde recebeu o “Prémio de Pediatria para os dois melhores estudos de Infeciologia Pediátrica”;

- na Sessão Clínica do Hospital Pediátrico, novembro de 2018.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob Heal*. 2018;6(7):E744–57.
2. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017(WHO/EMP/IAU/2017.12). (Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO).
3. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization and invasion. Vol. 16, *Nature Reviews Microbiology*. 2018. p. 355–67.
4. Donkor ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013.
5. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infectious Diseases*. 2004.
6. Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. Vol. 11, *Expert Review of Vaccines*. 2012. p. 841–55.
7. Rodrigues F, Foster D, Caramelo F, Serranho P, Gonçalves G, Januário L, et al. Progressive changes in pneumococcal carriage in children attending daycare in Portugal after 6 years of gradual conjugate vaccine introduction show falls in most residual vaccine serotypes but no net replacement or trends in diversity. *Vaccine*. 2012;30(26):3951–6.
8. Rodrigues F, Nunes S, Sá-Leão R, Gonçalves G, Lemos L, Lencastre H de. *Streptococcus pneumoniae* Nasopharyngeal Carriage in Children Attending Day-Care Centers in the Central Region of Portugal, In the Era of 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Microb Drug Resist*. 2009.
9. Gierke R, McGee L, Beall B, Pilishvili T. Pneumococcal disease (chapter 11). In: *Vaccine Preventable Diseases surveillance manual*. 2017;1–13. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt11-pneumo.pdf>
10. Johnson HL, Deloria-Knoll M, Levine OS, Stoszek SK, Hance LF, Reithinger R, et al. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: The pneumococcal global serotype project. *PLoS Med*. 2010;7(10).

11. Introduction of pneumococcal vaccine PCV13: a handbook for district and health facility staff. World Health Organization. Geneva; 2013. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/90380>
12. Ferreira M, Oliveira H, Silva NC e., Januário L, Rodrigues F. Pediatric invasive pneumococcal disease before universal vaccination: 1995 - 2015. *Acta Med Port.* 2017.
13. Cavaco A, Gouveia C, Rodrigues F, Prata F, Varandas L. Recomendações sobre vacinas: atualização 2014. Comissão Vacinas da Soc Infeciologia Pediátrica e Soc Port Pediatr. 2014;13–8. Available from: http://www.spp.pt/UserFiles/file/Comissao_de_Vacinas/%0ARECOMENDACOES_SOBRE_VACINAS_EXTRA_PNV_2014%0A_1_FINAL.pdf
14. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação. Introdução da vacina conjugada de 13 valências contra infeções por *Streptococcus pneumoniae* (Pn13). Norma da Direção-Geral da Saúde (nº 008/2015). 2015.
15. Alicino C, Paganino C, Orsi A, Astengo M, Trucchi C, Icardi G, et al. The impact of 10-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines on hospitalization for pneumonia in children: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 2017;35(43):5776–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.005>
16. Simonsen L, Taylor RJ, Young-Xu Y, Haber M, May L, Klugman KP. Impact of pneumococcal conjugate vaccination of infants on pneumonia and influenza hospitalization and mortality in all age groups in the United States. *MBio.* 2011;2(1):1–10.
17. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MPE, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: An observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2011;11(10):760–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70090-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70090-1)
18. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, Sheppard CL, Slack MPE, Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: An observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015;15(5):535–43. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70044-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70044-7)
19. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al. Sustained Reductions in Invasive Pneumococcal Disease in the Era of Conjugate Vaccine. *J Infect Dis.* 2010;201(1):32–41. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/648593>

20. Aguiar SI, Brito MJ, Horácio AN, Lopes JP, Ramirez M, Melo-Cristino J, et al. Decreasing incidence and changes in serotype distribution of invasive pneumococcal disease in persons aged under 18 years since introduction of 10-valent and 13-valent conjugate vaccines in Portugal, on behalf of the Portuguese Group for the Study of Stre. Euro Surveill. 2014;19(12):1–10. Available from: www.eurosurveillance.org:pii=20750.%0Ahttp://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20750
21. Shiri T, Datta S, Madan J, Tsertsvadze A, Royle P, Keeling MJ, et al. Indirect effects of childhood pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Heal. 2017;5(1):e51–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30306-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30306-0)
22. Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, Adrian P V., Antonio M, Hare KM, et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of Streptococcus pneumoniae: Updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. Vaccine. 2014;
23. Krone CL, van de Groep K, Trzciński K, Sanders EAM, Bogaert D. Immunosenescence and pneumococcal disease: An imbalance in host-pathogen interactions. Lancet Respir Med. 2014;2(2):141–53.
24. Krone CL, Wyllie AL, Van Beek J, Rots NY, Oja AE, Chu MLJN, et al. Carriage of Streptococcus pneumoniae in aged adults with influenza-like-illness. PLoS One. 2015;10(3):1–15.
25. Trzciński K, Bogaert D, Wyllie A, Chu MLJN, van der Ende A, Bruin JP, et al. Superiority of Trans-Oral over Trans-Nasal Sampling in Detecting Streptococcus pneumoniae Colonization in Adults. PLoS One. 2013;8(3):11–3.
26. Wyllie AL, Rümke LW, Arp K, Bosch AATM, Bruin JP, Rots NY, et al. Molecular surveillance on Streptococcus pneumoniae carriage in non-elderly adults; little evidence for pneumococcal circulation independent from the reservoir in children. Sci Rep. 2016;6(September):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep34888>
27. Wyllie AL, Chu MLJN, Schellens MHB, Gastelaars JVE, Jansen MD, Van Der Ende A, et al. Streptococcus pneumoniae in saliva of Dutch primary school children. PLoS One. 2014;
28. Carvalho M da G, Pimenta FC, Moura I, Roundtree A, Gertz RE, Li Z, et al. Non-pneumococcal mitis-group streptococci confound detection of pneumococcal capsular serotype-specific loci in upper respiratory tract. PeerJ. 2013;1:e97. Available from: <https://peerj.com/articles/97>

29. Newton R, Hinds J, Wernisch L. Empirical Bayesian models for analysing molecular serotyping microarrays. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):88. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/88>
30. Turner P, Hinds J, Turner C, Jankhot A, Gould K, Bentley SD, et al. Improved detection of nasopharyngeal cocolonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1784–9.
31. Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova M V., Filimonova A V., Ilina EN, Dubovickaya VA, et al. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol*. 2011;11(7):1709–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.010>
32. Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho MDGS, Steigerwalt AG, et al. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4686–96.
33. Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, Broughton K, Woodard G, Sturgeon D, et al. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: Characterization of “atypical” pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun*. 2000;68(3):1374–82.
34. Skov Sørensen UB, Yao K, Yang Y, Tettelin H, Kilian M. Capsular Polysaccharide Expression in Commensal *Streptococcus* Species : Genetic and Antigenic Similarities to *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*. 2016;7(6):1–17.
35. Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail M a, Linden M Van Der, Mcgee L, et al. Europe PMC Funders Group Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. 2013;331(6016):430–4.
36. Donati C, Hiller NL, Tettelin H, Muzzi A, Croucher NJ, Angiuoli S V., et al. Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. *Genome Biol*. 2010;11(10):R107. Available from: <http://genomebiology.com/2010/11/10/R107>
37. Rodrigues F, Danon L, Morales-Aza B, Sikora P, Thors V, Ferreira M, et al. Pneumococcal serotypes colonise the nasopharynx in children at different densities. *PLoS One*. 2016;11(9):4–11.

38. Rodrigues F, Morales-Aza B, Holland R, Gould K, Hinds J, Gonçalves G, et al. Resurgence of serotype 19F carriage in preschool children in Portugal in the context of continuing moderate conjugate pneumococcal vaccine uptake. *Clin Infect Dis*. 2013;57(3):473–4.
39. Satzke C, Dunne EM, Porter BD, Klugman KP, Mulholland EK, Vidal JE, et al. The PneuCarriage Project: A Multi-Centre Comparative Study to Identify the Best Serotyping Methods for Examining Pneumococcal Carriage in Vaccine Evaluation Studies. *PLoS Med*. 2015;12(11):1–30.
40. Grivea IN, Tsantouli AG, Michoula AN, Syrogiannopoulos GA. Dynamics of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage with high heptavalent pneumococcal conjugate vaccine coverage in Central Greece. *Vaccine*. 2011;29(48):8882–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.074>
41. Antigenes FP. A Review of Pneumococcal Vaccines : Current Polysaccharide Vaccine. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2016;21(1):27–35.
42. Song JY, Nahm MH, Moseley MA. Clinical implications of pneumococcal serotypes: Invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *Journal of Korean Medical Science*. 2013.