

## A reação em cadeia da polimerase na detecção da resistência à penicilina em *Streptococcus pneumoniae*\*

### Polymerase chain reaction used to detect *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin

EDUARDO WALKER ZETTLER <sup>(TE SBPT)</sup> ROSANE M. SCHEIBE, CÍCERO A. G. DIAS, PATRÍCIA SANTAFÉ, JOSÉ DA SILVA MOREIRA, DIÓGENES S. SANTOS, CARLOS CEZAR FRITSCHER

**Introdução:** O *Streptococcus pneumoniae* é o mais freqüente agente etiológico de infecções respiratórias adquiridas na comunidade e sua resistência aos antimicrobianos tem aumentado nos últimos anos. A determinação da resistência é feita rotineiramente por método lento que depende do crescimento em cultura e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A reação em cadeia da polimerase (PCR) detecta os genes responsáveis pela resistência do *Streptococcus pneumoniae* a penicilina em cerca de 8 horas.

**Objetivo:** Comparar a PCR com o método da CIM no diagnóstico da resistência da *Streptococcus pneumoniae* a penicilina.

**Método:** Foram estudadas 153 amostras de *Streptococcus pneumoniae*, isoladas de diferentes sítios anatômicos, usando-se para detecção de mutações nos genes que codificam as proteínas ligadoras de penicilina 1a, 2b e 2x, responsáveis pela resistência à penicilina. A ocorrência das mutações foi correlacionada com a CIM de penicilina, determinada pelo teste de difusão em ágar.

**Resultados:** A resistência global à penicilina do *Streptococcus pneumoniae* foi de 22,8% (16,3% de resistência intermediária e 6,5% de resistência alta). Em proporções estatisticamente significativas, as amostras sensíveis à penicilina não tinham mutações, as intermediárias apenas uma, geralmente na proteína ligadora de penicilina 2x, e as altamente resistentes tinham mutações nas três proteínas investigadas.

**Conclusão:** A PCR é um método rápido para a detecção da resistência à penicilina do *Streptococcus pneumoniae*, que poderá vir a ser utilizado na prática clínica.

**Background:** *Streptococcus pneumoniae* is the most common etiologic agent of community-acquired respiratory infections. In recent years, *S. pneumoniae* resistance to antimicrobial agents has increased. Minimum inhibitory concentration (MIC) is routinely used to determine resistance. Polymerase chain reaction (PCR) detects the genes responsible for *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin within approximately 8 hours.

**Objective:** To compare the PCR and MIC methods in determining *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin.

**Method:** A total of 153 *Streptococcus pneumoniae* samples, isolated from various anatomical sites, were evaluated in order to detect mutations in the genes encoding pbp1a, pbp2a and pbp2x, which are responsible for *Streptococcus pneumoniae* penicillin resistance. A correlation was found between mutations and penicillin MIP, as determined by the agar diffusion method.

**Results:** Overall *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin was 22.8% (16.3% intermediate resistance and 6.5% high resistance). In a statistically significant finding, we observed no mutations in the penicillin-sensitive samples and only one mutation, typically in the gene encoding pbp2x, among the samples with intermediate resistance, whereas mutations in all three genes studied were observed in the high-resistance samples.

**Conclusion:** For determining *Streptococcus pneumoniae* resistance to penicillin, PCR is a rapid method of detection that could well be used in clinical practice.

*J Bras Pneumol* 2004; 30(6) 521-27.

**Descritores:** *Streptococcus pneumoniae*. Resistência à penicilina/métodos. Reação em cadeia por polimerase.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*. Penicillin resistance. Polymerase chain reaction/methods.

\*Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS

Endereço para correspondência: Eduardo Walker Zettler - Rua General Iba Mesquita Ilha Moreira, 180/1401 - Boa Vista. CEP: 91340-190 - Porto Alegre, RS - Tel: 55- 11 3029 1201 - E-mail: ezettler@pucrs.br

Recebido para publicação, em 19/2/04. Aprovado, após revisão, em 12/5/04.

## INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, o *Streptococcus pneumoniae* é o mais freqüente agente etiológico de infecções adquiridas na comunidade que acometem o sistema respiratório e está associado com 3 a 5 milhões de mortes por ano<sup>(1)</sup>. Nos EUA, é responsável por 500.000 casos anuais de pneumonia, 50.000 casos de bacteremia, 3.000 casos de meningite e cerca de 7 milhões de casos de otite média aguda<sup>(2,3)</sup>.

A resistência do pneumococo à penicilina vem aumentando de forma significativa nos últimos anos, particularmente em países europeus como Espanha, França e Hungria, onde alcança até 71% de resistência<sup>(4,5)</sup>. Nos EUA, ela chega a atingir 44% em alguns estados<sup>(6,7)</sup>. Já na Ásia, podemos encontrar alarmantes índices de 70% a 78% de resistência em Hong Kong, Coréia do Sul e Taiwan<sup>(8-10)</sup>.

No Brasil, alguns estudos mostram níveis de resistência próximos a 20%<sup>(11-13)</sup>, mas um trabalho recente detectou resistência à penicilina em 42,1% (26,8% de resistência intermediária e 15,3% de alta resistência) dos isolados oriundos de três países latino-americanos (Argentina, Brasil e México)<sup>(14)</sup>.

A resistência do *S. pneumoniae* aos antibióticos beta-lactâmicos deve-se exclusivamente a mutações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PLP), que são o seu alvo natural, que impedem a ligação e as tornam indiferentes aos beta-lactâmicos, ou seja, diminuem a afinidade de ligação com essas drogas. Em isolados altamente resistentes ocorre uma redução da capacidade de ligação às moléculas de antibióticos em pelo menos 3 das 5 PLP existentes: PLP 1a, PLP 2x e PLP 2b<sup>(15-17)</sup>.

A determinação da resistência é realizada rotineiramente utilizando-se testes de mensuração da concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico testado, através de métodos laboratoriais como o teste de diluição em ágar, que é o recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Esses métodos apresentam como principal inconveniente o tempo necessário para a obtenção do resultado, geralmente superior a 48 horas<sup>(18)</sup>. Utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) é possível detectar-se as mutações responsáveis pela resistência do pneumococo à penicilina em tempo bem mais curto, próximo a 8 horas<sup>(19)</sup>.

Com o atual crescimento da resistência do pneumococo, torna-se imperioso o desenvolvimento de uma técnica diagnóstica rápida e confiável, capaz

de proporcionar uma terapêutica precoce e adequada aos casos de infecção por cepas resistentes. Assim, este estudo tem como objetivo principal comparar a PCR com o teste de diluição em ágar e determinação da CIM no diagnóstico da resistência do *S. pneumoniae* à penicilina.

## MÉTODO

No período de janeiro de 1997 a setembro de 2000, no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, foi realizado este estudo transversal de prevalência. Foram estudadas 197 amostras clínicas de *S. pneumoniae*, identificadas pelas técnicas laboratoriais convencionais, isoladas de qualquer sítio anatômico nos laboratórios de microbiologia de sete hospitais de Porto Alegre (RS), representativos da comunidade local, escolhidos por conveniência, e que colaboraram com o estudo (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Hospital da Criança Santo Antônio, Hospital Mãe Deus, Hospital Moinhos de Vento, Hospital Nossa Senhora da Conceição e Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)<sup>(18)</sup>. Foram consideradas amostras coletadas de um mesmo paciente, simultaneamente ou em tempos distintos. Amostras não identificadas como pneumococo através dos métodos convencionais padronizados pelo *National Committee for Clinical Laboratory*<sup>(18)</sup>, e amostras sem a identificação do gene *lytA* pela PCR, conforme técnica descrita a seguir, foram excluídas do estudo.

A CIM de penicilina foi medida através do teste de diluição em ágar em meio *Mueller-Hinton* (Oxoid Unipath Ltd.; Hampshire, Inglaterra) contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Os pontos de corte foram aqueles publicados pelo *National Committee for Clinical Laboratory*<sup>(18)</sup>: sensíveis (CIM  $\leq$  0,06 mg/mL), resistência intermediária (CIM de 0,12 a 1,0 mg/mL), e alta resistência (CIM  $\geq$  2,0 mg/mL). A cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619 foi empregada para controle de qualidade do teste de susceptibilidade<sup>(18)</sup>.

As amostras isoladas nos meios de cultura foram simultaneamente submetidas à PCR para detecção do gene *lytA* do *S. pneumoniae*, conforme descrito por Ubukata *et al.*<sup>(19)</sup>, para confirmação da identificação bacteriana e de mutações nas PLP 1a, 2b e 2x, conforme protocolo introduzido por Jalal *et al.*<sup>(20)</sup>, como descrito a seguir.

Colônias isoladas de *S. pneumoniae* foram retiradas do meio de cultura através de raspagem com alça de platina e colocadas em tubo com 50 ml de água bidestilada, para a extração do DNA bacteriano. A seguir, eram adicionados 50 ml de proteinase K. O material era então incubado a 50°C durante 16 horas. Em seguida, era feita a inativação da proteinase K, a 95°C por 10 minutos.

Para a seleção dos iniciadores, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) derivados do gene *lytA* do *S. pneumoniae*, e dos genes que codificam as PLP 2b e 2x de *S. pneumoniae* sensíveis à penicilina e a PLP 1a de *S. pneumoniae* resistente à penicilina, que apresentavam as seqüências a seguir:

Código	Gene	Seqüência (5'-3')
B1	PLP 2b	ACT CAG GCT TAC GGT CAT T
B2	PLP 2b	ACG AGG AGC CAC ACG AAC AC
X1	PLP 2x	GTC ATG CTG GAG CCT AAA TT
X2	PLP 2x	AAC CCG ACT AGA TAA CCA CC
A1	PLP 1a	AGG TCG GTC CTA GAT AGA GCT
A2	PLP 1a	GAG CTA CAT AGC CAG TGT CTC
SPN1	<i>lytA</i>	TGA AGC GGA TTA TCA CTG GC
SPN2	<i>lytA</i>	GCT AAA CTC CCT GTA TCA AGC G

Foram preparadas duas misturas para as reações, uma contendo os *primers* para amplificação dos genes das PLPs 2b e 2x e a outra contendo os *primers* dos genes da PLP 1a e do gene *lytA*, conforme descrição a seguir: 5 ml tampão específico para a *Taq* DNA polimerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U *Taq* DNA polimerase 5 U/ml (Gibco), 200 mM mistura equimolar dos nucleotídeos trifosfatados, 50 pmol de cada um dos dois pares de *primers*.

Para a preparação da amostra a ser amplificada e dos controles negativo e positivo, misturavam-se 2 ml do DNA extraído de *S. pneumoniae* com 48 ml da mistura-mestra. Como controle negativo da reação utilizavam-se 2 ml de água bidestilada adicionados a 48 ml da mistura de reação. Como controle positivo, na mistura 1, utilizavam-se 2 ml de DNA extraído da amostra de *S. pneumoniae* já identificada previamente como sensível à penicilina e, na mistura 2, 2 ml de DNA extraído de amostra identificada como resistente, adicionados a 48 ml de cada mistura de reação.

Com relação aos ciclos de amplificação, as amostra preparadas com os respectivos controles positivo e negativo eram colocadas no termociclador e submetidas a 35 ciclos, após uma desnaturação

inicial a 94°C por três minutos. Cada ciclo consistia de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante dois minutos. Após os 35 ciclos de amplificação, os tubos eram submetidos a uma extensão final a 72°C durante sete minutos.

Para a eletroforese, separavam-se 20 ml da solução resultante, que eram aplicados no gel de agarose 2% (SIGMA), contendo 2 mg/ml de brometo de etídio (SIGMA). A eletroforese era realizada a 15 volts/cm, com duração de aproximadamente 30 minutos. O gel era visualizado sob luz ultravioleta e gravado no GELDOC 1000, utilizando-se o software *Molecular Analyst* (Biorad). As amostras positivas produziam uma banda visível com os seguintes tamanhos: PLP 2b: 359 pares de bases, PLP 2x: 277 pares de bases, PLP 1a: 423 pares de bases, gene *lytA*: 273 pares de bases (Figura 1).

A análise estatística foi realizada relacionando-se inicialmente o número de mutações em cada amostra, determinado pela PCR, com o grau de resistência das mesmas, determinado pela sua CIM. Em cada grupo de amostras com diferentes números de mutações (nenhuma mutação, 1 mutação, 2 mutações ou 3 mutações), foi feita uma comparação pareada entre os graus de resistência das mesmas (sensíveis x intermediárias, sensíveis x resistentes e intermediárias x resistentes), utilizando-se o teste do Qui-quadrado para comparação entre proporções (heterogeneidade), com um grau de liberdade, aplicando-se a correção de Yates, considerando-se um nível de significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). A seguir foi feita a relação entre as mutações em cada uma das três PLP estudadas com o grau de resistência das amostras determinado pela CIM. Em cada grupo de amostras com mutação numa determinada PLP (PLP 1a, PLP 2b ou PLP 2x) foi realizada uma comparação pareada entre o grau de resistência das mesmas (sensíveis x intermediárias, sensíveis x resistentes e intermediárias x resistentes), também se empregando o teste do Qui-quadrado para comparação entre proporções (heterogeneidade), com um grau de liberdade, aplicando-se a correção de Yates, sendo igualmente considerado um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

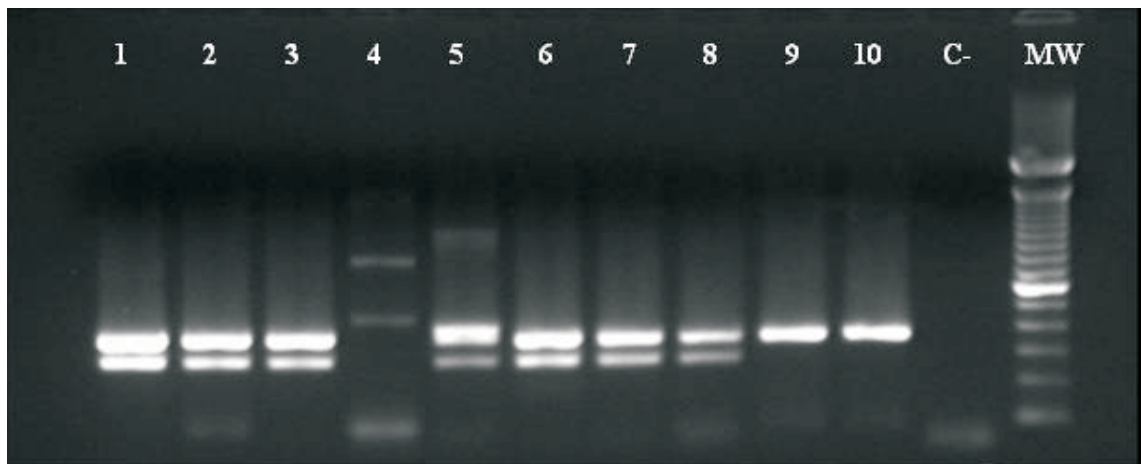


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados usando *primers* derivados dos genes das PLP 2b e PLP 2x de *S. pneumoniae* sensíveis à penicilina. Os tamanhos destes produtos da PCR são de 359 e 277 pares de bases respectivamente. Colunas 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8: amostras sensíveis; colunas 9 e 10: amostras com resistência intermediária; coluna 4: amostra com alta resistência; coluna C-: controle negativo; coluna MW: marcador de peso molecular.

## RESULTADOS

Das 197 amostras identificadas inicialmente como *S. pneumoniae* nos laboratórios de microbiologia dos hospitais de origem, 34 (17,2%) foram excluídas do estudo por não crescerem no meio de cultura após terem sido descongeladas (morte bacteriana), ou por não se confirmar a identificação da espécie bacteriana através dos testes microbiológicos.

Restaram 163 amostras que foram submetidas simultaneamente aos testes de determinação da CIM e à PCR para detecção das mutações nas PLP 1a, 2b e 2x e amplificação do gene *lytA*, para confirmação da identificação bacteriana. A presença do gene *lytA* foi verificada em 153 amostras. As 10 amostras que não apresentaram este gene foram excluídas da análise final.

A distribuição da resistência do *S. pneumoniae* nas 153 amostras restantes no estudo, testadas através do método de diluição em ágar de acordo com a sua CIM é mostrada na Tabela 1.

Inicialmente, relacionou-se o número de mutações em cada amostra com o grau de resistência das mesmas, determinado pela CIM. Obteve-se a proporção de amostras sensíveis, de resistência intermediária e de alta resistência com determinado número de mutações e verificou-se a significância estatística das diferenças (Tabela 2).

Não ocorreram amostras resistentes no grupo de amostras sem mutações. A comparação entre amostras sensíveis e intermediárias mostrou-se significativa ( $\chi^2 = 33,89$ ;  $p < 0,0005$ ).

Não ocorreram amostras com alta resistência no grupo de amostras em que havia uma mutação. A comparação das amostras sensíveis com as de resistência intermediária mostrou-se significativa, com predomínio das sensíveis ( $\chi^2 = 16,277$ ;  $p < 0,0005$ ).

Com relação às amostras com duas e três mutações, não houve amostras sensíveis, e houve diferença significativa comparando-se as resistências intermediária e alta. Houve predomínio de cepas com resistência intermediária no grupo com duas mutações ( $\chi^2 = 0,006$ ;  $p = 0,942$ ) e de cepas com alta resistência no grupo com três mutações ( $\chi^2 = 21,843$ ;  $p < 0,0005$ ).

A seguir, correlacionou-se a presença de mutação em cada uma das três PLP isoladamente com os índices de resistência determinados pela CIM, aplicando-se o teste estatístico para analisar a significância das diferenças encontradas (Tabela 3).

A mutação na PLP 2b determinou ausência de amostras sensíveis. Houve predomínio de alta resistência em relação à resistência intermediária ( $\chi^2 = 18,308$ ;  $p < 0,0005$ ).

Quanto à mutação na PLP 2x, a comparação entre amostras sensíveis e intermediárias foi significativa:  $\chi^2 = 25,304$  ( $p < 0,0005$ ); a comparação entre amostras



sensíveis e resistentes também foi significativa: Qui-quadrado = 18,388 (p < 0,0005); e a comparação entre amostras intermediárias e resistentes não foi significativa:  $\chi^2 = 0,572$  (p = 0,4539).

Com relação à mutação na PLP 1a, não houve amostras sensíveis. Ela determinou predomínio de alta resistência (intermediárias x resistentes:  $\chi^2 = 21,843$  (p < 0,0005) (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

A resistência do *S. pneumoniae* à penicilina em Porto Alegre aumentou consideravelmente nos últimos anos. No estudo de Chatkin *et al.*<sup>(21)</sup>, de 1989, era de apenas 3,2%, e atingiu 22,8% no período de nosso estudo. Este índice é semelhante aos encontrados por Sessegolo *et al.*<sup>(11)</sup> e Levin *et al.*<sup>(12)</sup> no Estado de São Paulo na década de 1990 (24%). Mais recentemente, Mendes *et al.*<sup>(14)</sup> estudaram amostras pneumocócicas isoladas em três países da América Latina (Argentina, Brasil e México) e encontraram níveis ainda mais elevados de resistência (42,1%).

É importante ressaltar que entre as cepas resistentes que encontramos, a maioria apresentou resistência intermediária à penicilina (16,3%), e apenas 6,5% demonstraram alta resistência. Conforme já descrito por diversos autores, as amostras com resistência intermediária têm apresentado boa resposta clínica à penicilina em altas doses<sup>(22,23)</sup>, enquanto que as altamente resistentes podem causar uma maior morbi-mortalidade<sup>(24,25)</sup>.

Em comparação com levantamentos realizados em outros países, a resistência do pneumococo em nosso meio ainda permanece em níveis inferiores. Nos EUA, por exemplo, o mais recente relatório epidemiológico, publicado por Karlowsky *et al.*<sup>(6)</sup>, investigando 27.828 cepas de *S. pneumoniae* isoladas em vários estados norte-americanos, revelou 18,4% de alta resistência à penicilina.

No presente estudo, encontramos uma associação significativa entre a presença de mutações nos genes que codificam as PLP do *S. pneumoniae* e os índices de resistência à penicilina *in vitro*, determinados pela CIM. As amostras sensíveis caracterizaram-se, em proporção estatisticamente significativa dos casos (p < 0,05), pela ausência de mutações nas PLP, as de resistência intermediária pela ocorrência de apenas uma mutação, geralmente na PLP 2x, e as altamente resistentes pela presença de mutações nas três PLP. A presença de mutação isolada na PLP 1a ou na PLP 2b ocorreu em número significativamente maior de

**TABELA 1**  
Níveis de resistência das amostras de *S. pneumoniae*

Nível de resistência	Número de amostras (%)
Sensível (CIM ≤0,06 mg/mL)	118 (77,2%)
Intermediária (CIM 0,12 a 1,0 mg/mL)	25 (16,3%)
Alta (CIM ≥ 2,0 mg/mL)	10 (6,5%)
Total:	153

CIM: concentração inibitória mínima.

**TABELA 2**  
Relação entre o número de mutações e o nível de resistência

	Sensível	Intermediária	Alta
Sem mutações	86 (73%)*	2 (8%)	0 (0%)
1 mutação	32 (27%)	18 (72%)*	0 (0%)
2 mutações	0 (0%)	4 (16%)**	1 (10%)
3 mutações	0 (0%)	1 (4%)	9 (90%***)
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>25</b>	<b>10</b>

\* comparação sensíveis x intermediárias: p < 0,05. \*\* comparação intermediárias x alta resistência: p = não significativo. \*\*\* comparação intermediárias x alta resistência: p < 0,05

**TABELA 3**  
Relação entre as mutações em cada PLP e o nível de resistência

	Sensível	Intermediária	Alta
PLP 2b	0 (0%)	7 (28%)	10 (100%)*
PLP 2x	32 (27%)	21 (84%)**	10 (100%***)
PLP 1a	0 (0%)	1 (4%)	9 (90%****)
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>25</b>	<b>10</b>

\* comparação intermediárias x alta resistência: p < 0,05  
\*\* comparação sensíveis x intermediárias: p < 0,05  
\*\*\* comparação sensíveis x alta resistência: p < 0,05; comparação intermediárias x alta resistência: p = não significativo  
\*\*\*\* comparação intermediárias x alta resistência: p < 0,05  
PLP: proteína ligadora de penicilina.

amostras com alta resistência do que naquelas com resistência intermediária. Já a mutação na PLP 2x não foi capaz de ser discriminada entre amostras com resistência intermediária ou alta. A associação de mutações em duas ou três PLP correlacionou-se significativamente com a expressão de alta resistência à penicilina. Estes resultados estão em concordância com outros estudos que têm demonstrado que as mutações no genoma da PLP 2x isoladamente resultam em baixo nível de resistência à penicilina, enquanto que a alta resistência à penicilina requer alterações genéticas também nas PLP 1a e 2b<sup>(26-30)</sup>.

Ubukata *et al.*<sup>(19)</sup> estudaram a presença de mutações em genes da PLP 2b de 1.062 amostras clínicas de *S. pneumoniae* através da PCR, encontrando correlação com os achados da CIM de penicilina em 98,9% das amostras sensíveis e 70,3% das resistentes.

Nagai *et al.*<sup>(30)</sup> avaliaram a presença de mutações nos genes das PLP 2b e 2x em 218 amostras de *S. pneumoniae* isoladas de crianças no Japão. As mutações na PLP 2x foram observadas em diversas cepas com resistência intermediária à penicilina. Em 41,3% das amostras sensíveis ao cefotaxime encontraram-se mutações nos genes da PLP 2x, o que sugere que o mecanismo de resistência pode ocorrer mesmo em cepas suscetíveis aos antimicrobianos, e pode preceder a resistência detectada *in vitro*. Em nosso estudo, este achado reproduziu-se, tendo sido encontradas em 84% das amostras com resistência intermediária à penicilina a presença de mutação na PLP 2x, o que mostra que este pode ser um marcador de menor nível de resistência. Assim, não foi possível a discriminação entre amostras intermediárias e altamente resistentes à penicilina utilizando-se as alterações na PLP 2x isoladamente, mas foi possível diferenciar significativamente as cepas sensíveis das que apresentavam algum grau de resistência (intermediária ou alta).

A detecção da PLP 1a através da PCR foi utilizada por du Pleiss *et al.*<sup>(29)</sup> em 183 isolados clínicos de *S. pneumoniae*, que obtiveram uma concordância de 98,3% entre os resultados da PCR e os dados de CIM de penicilina. Os valores preditivos positivo e negativo desta técnica molecular foram de 100% na detecção de amostras com CIM <sup>s</sup> 1 mg/mL. Similarmente, em nossas amostras com alta resistência à penicilina, encontramos a presença de mutação na PLP 1a em 90% dos casos (9/10 casos). Em apenas uma amostra, classificada como altamente resistente à penicilina pelas diretrizes do *National Committee for Clinical Laboratory*, não se detectou alteração na PLP 1a. Essa amostra apresentava CIM = 2,0 mg/mL, valor que se encontra exatamente em cima do ponto de corte que divide as amostras entre intermediárias ou altamente resistentes à penicilina. No entanto, essa diferença entre os métodos fenotípicos e genotípicos neste caso isolado não afetou a efetividade do método.

O único estudo prévio que analisou a presença de mutações nas três PLP (1a, 2b e 2x), simultaneamente, relacionando-as com a resistência bacteriana, foi o de Jalal *et al.*<sup>(20)</sup>, que, estudando 230 isolados clínicos de *S. pneumoniae*, identificou 93% das amostras sensíveis, 85% das intermediárias e 100% das altamente resistentes através da PCR. No entanto, as mutações na PLP 1a não tiveram boa correlação com a resistência *in vitro* e foram excluídas da análise de dados, que se limitou à avaliação das PLP 2b e 2x. Mesmo assim, os resultados alcançados foram considerados potencialmente úteis clinicamente, apesar de não ter sido feita uma análise estatística mais aprofundada.

Um fator muito importante na abordagem de um paciente com infecção pneumocócica é a introdução precoce da terapêutica antimicrobiana, o que pode ser decisivo na evolução e prognóstico da doença<sup>(31,32)</sup>. Através dos métodos microbiológicos convencionais leva-se, no mínimo, 24 horas para o crescimento e identificação do germe nos meios de cultura e mais 24 horas para a realização dos testes de suscetibilidade<sup>(18)</sup>. Todas as etapas da técnica da PCR descritas no presente estudo podem ser realizadas em até 8 horas, e há a confirmação do agente etiológico e a identificação do seu nível de resistência simultaneamente, o que possibilita um início de tratamento muito mais rápido e adequado.

Desta forma, através do presente estudo pretendemos demonstrar a potencial aplicabilidade clínica da técnica da PCR na detecção precoce da resistência bacteriana do *S. pneumoniae*, devido à sua rapidez e facilidade de execução em laboratórios adequadamente equipados.

## REFERÊNCIAS

1. Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis. 1997;24(Suppl 1):S85-8.
2. Marston BJ, Plouffe JF, File TM, Hackman, BA, Salstrom SJ, Lipman HB, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization: results of a population-based active surveillance study in Ohio. JAMA. 1997;157:1709-18.
3. Ruiz-Gonzales A, Falguera M, Nogues A, Rubio-Caballero M. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. Am J Med. 1999;106:385-90.
4. Jones ME, Blosser-Middleton RS, Critchley IA, Karlowsky JA, Thornsberry C, Sahn DF. In vitro susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: a European multicenter study during 2000-2001. Clin Microb Infect. 2003;9:590-9.

5. Dobay O, Rozgonyi F, Hajdu E, Nagy E, Knausz M, Amyes SG. Antibiotic susceptibility and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from Hungary. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:887-93.
6. Karlowsky JA, Thornsberry C, Jones ME, Evangelista AT, Critchley IA, Sahm DF. Factors associated with relative rates of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: results from the TRUST Surveillance Program (1998-2002). *Clin Infect Dis.* 2003;36:963-70.
7. Hoban D, Waites K, Felmingham D. Antimicrobial susceptibility of community-acquired respiratory tract pathogens in North America in 1999-2000: findings of the PROTEKT surveillance study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45:251-9.
8. Lee HJ, Park JY, Jang SH. High incidence of resistance to multiple antimicrobials in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from a university hospital in Korea. *Clin Infect Dis.* 1995;20:826-35.
9. Kim SN, Kim SW, Choi IH. High incidence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in South Korea. *Microb Drug Resist.* 1996;2:401-6.
10. Lo WT, Wang CC, Yu CM, Chu ML. Rate of nasopharyngeal carriage, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* among children in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36:175-81.
11. Sessegolo JF, Levin AS, Levy CE, Asensi M, Facklam RR, Teixeira LM. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. *J Clin Microbiol.* 1994;12:906-11.
12. Levin AS, Teixeira LM, Sessegolo JF, Barone AA. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to antimicrobials in São Paulo, Brazil: clinical features and serotypes. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1996;38:187-92.
13. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Winokur P, Kugler KC, Pfaller MA, et al. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in latin american medical centers with a diagnosis of pneumonia: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;32:289-301.
14. Mendes C, Marin ME, Quinones F, Sifuentes-Osornio J, Siller CC, Castanheira M, et al. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). *Braz J Infect Dis.* 2003;7:44-61.
15. Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis.* 1992;15:77-83.
16. Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol.* 1994;2:361-5.
17. Ikeda F, Yokota Y, Ikemoto A, Teratani N, Shimomura K, Kanno H. Interaction of beta-lactam antibiotics with the penicillin-binding proteins of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Chemotherapy.* 1995;41:159-64.
18. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical microbiology.* Washington (DC): ASM Press; 1999. p.283-96.
19. Ubukata K, Asahi Y, Yamane A, Konno M. Combinational detection of autolysin and penicillin-binding protein 2B genes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR. *J Clin Microbiol.* 1996;34:592-6.
20. Jalal H, Organji S, Reynolds J, Bennett D, O'Mason E Jr, Millar MR. Determination of penicillin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* using the polymerase chain reaction. *Mol Pathol.* 1997;50:45-50.
21. Chatkin JM, Fritscher CC, Rodrigues LF. Sensibilidade do *Streptococcus pneumoniae* aos antimicrobianos: resultados preliminares. *Rev Med PUCRS.* 1989;1:81-6.
22. Ewig S, Ruiz M, Torres A, Marco F, Martinez JA, Sanchez M, et al. Pneumonia acquired in the community through drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1835-42.
23. File TM Jr. Treating community-acquired pneumonia caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Respir Dis.* 1999;20:833-42.
24. Dowell SF, Butler JC, Giebink GS, Jacobs MR, Jernigan D, Musher DM, et al. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance – a report from the Drug-Resistant *S. pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Pediatr Infect Dis J.* 1999;8:1-9.
25. Pachecho TR, Cooper CK, Hardy DJ, Betts RF, Bonnez W. Failure of cefotaxime treatment in an adult with *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Am J Med.* 1997;102:303-5.
26. Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ. Genetic diversity of penicillin-binding proteins 2B e 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1938-44.
27. Barcus VA, Ghanekar K, Yeo M, Coffey TJ, Dowson CG. Genetics of high-level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;126:299-304.
28. Smith AM, Klugman KP. Alterations in PBP 1a essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1329-33.
29. du Pleiss M, Smith AM, Klugman KP. Application of pbp1A PCR in identification of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1999;37:628-32.
30. Nagai K, Matsuo Y, Tsumura N, Sakata Y, Kato H. Antimicrobial susceptibilities and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in southwestern Japan and correlation of penicillin-binding proteins 2b and 2x mutations in susceptibilities of penicillin G and cefotaxime. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37:107-13.
31. Bartlett JG, Mundy L. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med.* 1995;333:1618-24.
32. Bohte R, Hermans J, Broek PJ. Early recognition of *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:201-5.