



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RENATA NAKAMURA MAZZARO MAGNOLER

COLONIZAÇÃO DA OROFARINGE POR *Streptococcus pneumoniae*,
Haemophilus influenzae e *Moraxella catarrhalis* EM UMA POPULAÇÃO DE
ASSENTAMENTO RURAL

Presidente Prudente - SP
2020

RENATA NAKAMURA MAZZARO MAGNOLER

**COLONIZAÇÃO DA OROFARINGE POR *Streptococcus pneumoniae*,
Haemophilus influenzae e *Moraxella catarrhalis* EM UMA POPULAÇÃO DE
ASSENTAMENTO RURAL**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre. - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller

616
M198c

Magnoler, Renata Nakamura Mazzaro.
Colonização da orofaringe por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* em uma população de assentamento rural / Renata Nakamura Mazzaro Magnoler ; orientadora Lizziane Kretli Winkelstroter Eller -- Presidente Prudente, 2020.
34 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2020.
Bibliografia.

1. Otite. 2. Reação em Cadeia da Polimerase
Multiplex. 3. Infecções. 4. Saúde da População Rural. I.
Eller, Lizziane Kretli Winkelstroter. II. Título.

RENATA NAKAMURA MAZZARO MAGNOLER

**COLONIZAÇÃO DA OROFARINGE POR *Streptococcus pneumoniae*,
Haemophilus influenzae e *Moraxella catarrhalis* EM UMA POPULAÇÃO DE
ASSENTAMENTO RURAL**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre. - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 13 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Daniela Vanessa Moris
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Enyara Rezende de Moraes
Universidade Federal de Uberlândia
Patos de Minas – MG

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à meu pai, Roberto, aquele que viveu comigo o meu sonho de ser médica e professora, meu grande incentivador, que se estivesse em sua completa sanidade mental, tenho certeza, estaria se realizando com mais esta etapa que está a se concluir. Meu idealizador, acompanhou desde os meus sete anos de idade a vontade de cursar a faculdade de medicina e quando terminei, me perguntou se eu já tinha me dado por satisfeita, via em seus olhos o brilho esperando a negativa para essa pergunta, disse a ele que não, um dia seria mestre e doutora, que ainda gostaria de trabalhar com pesquisa, para deixar uma verdadeira contribuição para o mundo, que um dia, e que meu nome estaria perpetuado em alguma descoberta. Meu pai, se o Alzheimer não tivesse lhe tirado a capacidade de orgulhar-se, hoje tenho certeza que estaria se orgulhando mais uma vez por este título sonhado e conquistado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me conduziu na escolha desse programa e iluminou meus caminhos. À minha família que torceram e colaboraram comigo durante os períodos que necessitei ausentar-me para os estudos e reuniões, em especial meus filhos, o pequeno bebê Gabriel, que colaborou desde meu ventre e após seu nascimento, quando dormiu a noite toda para a mamãe poder estudar, e o Miguel, que abriu mão de brincar para que eu pudesse concluir meus afazeres no computador, além do meu marido Rafael, que cuidou dos meninos para me dar tranquilidade e disposição para seguir em frente.

Agradeço imensamente a minha orientadora Lizziane, que mostrou saídas quando as ideias iniciais não deram certo, e ainda por tamanha compreensão diante da gravidez no meio do curso, inesperada. A Gabrielle Messias pelo suporte laboratorial durante o processo de construção do trabalho. E ao Dr. Luiz Euribel por todo incentivo, empenho para que o programa se cumprisse.

RESUMO

Colonização da orofaringe por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* em uma população de assentamento rural

A colonização bacteriana exerce papel importante na saúde dos seres humanos. Fatores de risco e inflamatórios podem resultar na conversão do estado assintomático para doença invasiva mediados por patógenos presentes no microbioma local da orofaringe, como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*. Este estudo teve por objetivo avaliar a colonização da orofaringe de moradores de um assentamento rural em relação aos patógenos mais frequentemente isolados nos casos de otite média aguda, como também analisar a presença de variáveis que atuam como fatores de risco para o desenvolvimento da infecção do ouvido médio. Foi realizado a coleta de dados demográficos por meio de questionários e coletas de amostras da orofaringe para identificação dos patógenos por método de cultura e pela reação em cadeia da polimerase multiplex em moradores do assentamento rural Dona Carmem, localizado no Mirante do Paranapanema-SP. Foram incluídas pessoas que tinham interesse de participar do estudo e que morassem no assentamento Dona Carmem. Foram excluídos participantes que receberam qualquer tratamento com antibióticos nas 72 horas antes da amostragem, resultando em 55 participantes do estudo. Foi observado maior número de amostras positivas para os patógenos investigados pela PCR multiplex, revelando uma alta taxa de colonização pelo agente *S. pneumoniae* seguido da espécie *M. catarrhalis*, enquanto o patógeno *H. influenzae* não foi detectado. A vacinação impactou na colonização de *H. influenzae*, entretanto, o mesmo não foi observado para *S. pneumoniae*, provavelmente devido a cobertura vacinal incompleta, colonização por sorotipos não vacinais e baixa soroconversão a vacina. As taxas de colonização para *S. pneumoniae* foram maiores em relação a *M. catarrhalis* em presença de tabagismo, tabagismo passivo, prematuridade, alergia a alimentos, pneumonia de repetição e doença de refluxo gastroesofágico ($p < 0,05$). Foi ainda possível verificar que a idade, o tabagismo, e o tabagismo passivo influenciam na colonização de bactérias *M. catarrhalis*, sendo que o tabagismo também influencia na colonização das bactérias *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* simultaneamente ($p < 0,05$). O estudo demonstra a importância do monitoramento contínuo de sorotipos a fim de fornecer evidências da predominância dos agentes etiológicos de doenças como a otite média aguda. Além disso, os resultados ressaltam a vulnerabilidade dos moradores de assentamentos rurais e a necessidade da implementação de ações mais efetivas de educação e assistência médica.

Palavras-chave: Otite. PCR Multiplex. Infecções. Vacina

ABSTRACT

Colonization of the oropharynx by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in a rural settlement population

Bacterial colonization plays an important role in the health of human beings. Risk and inflammatory factors can result in the conversion of the asymptomatic state to invasive disease mediated by pathogens present in the local oropharyngeal microbiome, such as *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. This study aimed to evaluate the oropharynx colonization of residents of a rural settlement in relation to the pathogens most frequently isolated in cases of acute otitis media, as well as to analyze the presence of variables that act as risk factors for the development of ear infection. Demographic data was collected through questionnaires and oropharyngeal sample collections for identification of the pathogens by culture method and by the multiplex polymerase chain reaction in residents of the rural settlement Dona Carmem, located at Mirante do Paranapanema-SP. People who were interested in participating in the study and who lived in the settlement Dona Carmem were included. Participants who received any treatment with antibiotics within 72 hours before sampling were excluded, resulting in 55 study participants. A greater number of positive samples was observed for the pathogens investigated by multiplex PCR, revealing a high rate of colonization by the *S.pneumoniae* followed by the species *M. catarrhalis*, while the pathogen *H. influenzae* was not detected. Vaccination impacted the colonization of *H. influenzae*, however, the same was not observed for *S. pneumoniae*, probably due to incomplete vaccination coverage, colonization by non-vaccine serotypes and low seroconversion to the vaccine. Colonization rates for *S. pneumoniae* were higher than for *M. catarrhalis* in the presence of smoking, passive smoking, prematurity, food allergy, recurrent pneumonia and gastroesophageal reflux disease ($p < 0.05$). It was also possible to verify that age, smoking, and passive smoking influence the colonization of *M. catarrhalis* bacteria, and smoking also influences the colonization of *M. catarrhalis* and *S. pneumoniae* bacteria simultaneously ($p < 0.05$). The study demonstrates the importance of continuous monitoring of serotypes in order to provide evidence of the predominance of the etiological agents of diseases such as acute otitis media. In addition, the results highlight the vulnerability of rural settlement residents and the need to implement more effective education and health care actions.

Keywords: Otitis. Multiplex Polymerase Chain Reaction. Infections. Vaccines.

LISTA DE SIGLAS

MS	– Mato Grosso do Sul
MST	– Movimento dos Sem Terra
OMA	– Otite Média Aguda
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PR	– Paraná
PCR	– Reação em Cadeira de Polimerase
RRAS 11	– Rede Regional de Assistência à Saúde

LISTA DE FIGURA

- Figura 1 - Em (A) os estados brasileiros com destaque para o estado de São Paulo e o Pontal do Paranapanema. Em (B), Os municípios que compõem o Pontal do Paranapanema com ênfase no Assentamento Dona Carmem e os estados vizinhos MS: Mato Grosso; PR: Paraná. Em verde, o parque estadual Morro do Diabo..... 15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência de primers utilizados na PCR Multiplex para identificação de <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. Influenzae</i> e <i>M. catharralis</i>	18
Tabela 2 -	Resultados encontrados na identificação dos patógenos envolvidos na OMA por métodos convencionais e moleculares ...	19
Tabela 3 -	Percentuais de colonização por <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i> e por ambos os patógenos em relação aos dados demográficos dos moradores do assentamento rural Dona Carmem, Mirante do Paranapanema-SP.....	20
Tabela 4 -	Percentuais de colonização bacteriana dos moradores do assentamento rural Dona Carmem, Mirante do Paranapanema-SP em relação a fator de risco para o desenvolvimento de OMA.....	21

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO – Colonização da orofaringe por <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Moraxella catarrhalis</i> em uma população de assentamento rural.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO	21
REFERÊNCIAS.....	25
APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO	29
ANEXO A - NORMAS “PATHOGENS AND GLOBAL HEALTH”	30

Colonização da orofaringe por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* em uma população de assentamento rural

Renata Nakamura Mazzaro Magnoler¹, Gabrielle Messias de Souza^{1,2}, Michel Ulloffo do Nascimento¹, Luiz Euribel Prestes Carneiro¹, Edilson Flores³, Valéria Cataneli Pereira^{1,2}, Lizziane Kretli Winkelstroter Eller^{1,2}

¹Curso de Mestrado em Ciências da Saúde-Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil

²Faculdade de Ciências da Saúde, Curso biomedicina, Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil

³Departamento de Estatística, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Presidente Prudente, SP, Brasil

Autor correspondente: Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller

Rua José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária,

Presidente Prudente - SP, Brasil

CEP: 19050-920

Email: lizzianekretli@gmail.com

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Pathogens and Global Health, Fator de impacto 1.969, Qualis A4

Resumo

A colonização bacteriana exerce papel importante na saúde dos seres humanos. Fatores de risco e inflamatórios podem resultar na conversão do estado assintomático para doença invasiva mediados por patógenos presentes no microbioma local da orofaringe, como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*. Este estudo teve por objetivo avaliar a colonização da orofaringe de moradores de um assentamento rural em relação aos patógenos mais frequentemente isolados nos casos de otite média aguda, como também analisar a presença de variáveis que atuam como fatores de risco para o desenvolvimento da infecção do ouvido médio. Foi realizado a coleta de dados demográficos por meio de questionários e coletas de amostras de orofaringe para identificação dos patógenos por método de cultura e pela reação em cadeia da polimerase multiplex em moradores do assentamento rural Dona Carmem, localizado no Mirante do Paranapanema-SP. Foram inclusas pessoas que tinham interesse de participar do estudo e que morassem no assentamento Dona Carmem. Foram excluídos participantes que receberam qualquer tratamento com antibióticos nas 72 horas antes da amostragem, resultando em 55 participantes do estudo. Foi observado maior número de amostras positivas para os patógenos investigados pela PCR multiplex, revelando uma alta taxa de colonização pelo agente *S.pneumoniae* seguido da espécie *M. catarrhalis*, enquanto o patógeno *H. influenzae* não foi detectado. A vacinação impactou na colonização de *H. influenzae*, entretanto, o mesmo não foi observado para *S. pneumoniae*, provavelmente devido a cobertura vacinal incompleta, colonização por sorotipos não vacinais e baixa soroconversão a vacina. As taxas de colonização para *S. pneumoniae* foram maiores em relação a *M. catarrhalis* em presença de tabagismo, tabagismo passivo, prematuridade, alergia a alimentos, pneumonia de repetição e doença de refluxo gastroesofágico ($p < 0,05$). Foi ainda possível verificar que a idade, o tabagismo, e o tabagismo passivo influenciam na colonização de bactérias *M. catarrhalis*, sendo que o tabagismo também influencia na colonização das bactérias *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* simultaneamente ($p < 0,05$). O estudo demonstra a importância do monitoramento contínuo de sorotipos a fim de fornecer evidências da predominância dos agentes etiológicos de doenças como a otite média aguda. Além disso, os resultados ressaltam a vulnerabilidade dos moradores de assentamentos rurais e a necessidade da implementação de ações mais efetivas de educação e assistência médica.

Palavras-chave: Otite. PCR Multiplex. Infecção. Vacina.

INTRODUÇÃO

A colonização bacteriana exerce grande importância na saúde, interferindo diretamente na homeostase e possibilitando a resposta imunológica do organismo^(1,2). A região da orofaringe é colonizada por uma ampla variedade de microrganismos, que podem atuar como comensais e potenciais patógenos. Os principais microrganismos que colonizam esta região são as espécies *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*⁽³⁾. Os portadores assintomáticos desses patógenos podem transmitir os mesmos para outras pessoas, assim como favorecem a susceptibilidade a infecções do trato respiratório superior, especialmente a otite média aguda^(4,5).

A colonização da orofaringe por microrganismos patogênicos pode ser influenciada pela microbiota local de forma direta e/ou indireta, além do sistema imunológico do paciente⁽⁴⁾. Outros fatores também podem ser cruciais neste processo como a idade, frequência no uso de antimicrobianos, sazonalidade, aglomerados, área geográfica em que vive, compartilhamento de objetos, condições ambientais e socioeconômicas^(6,7).

Países em desenvolvimento apresentam as maiores taxas de colonização de patógenos respiratórios como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis* visto que o nível socioeconômico está associado a um menor acesso a vacinação e ao sistema de saúde, baixos níveis de escolaridade e infraestruturas deficientes⁽⁷⁾.

No Brasil, cerca de 30 milhões de pessoas vivem em áreas rurais, representando cerca de 16% da população brasileira. Destes, uma parcela crescente reside em assentamentos rurais. No entanto, essas áreas apresentam condições adversas para a vida e a saúde, como descarte inadequado de resíduos, acesso inadequado à água potável e superlotação em casa, favorecendo o aumento da morbimortalidade de doenças transmissíveis, mortalidade infantil, incidência de endemias e o incremento de doenças crônico-degenerativas⁽⁸⁾. Desta forma, esta população tem como marca histórica um complexo quadro de vulnerabilidade com uma grande desigualdade e dificuldade de acesso às mais diversas políticas públicas⁽⁹⁾.

O estado de São Paulo é reconhecido por ser o mais industrializado e maior economia no Brasil. Entretanto, é um estado que apresenta uma grande assimetria em relação à economia, educação e saúde da sua população⁽¹⁰⁾. O estado de São Paulo fica na região sudeste do Brasil sendo composto por 645 municípios e dividido em 15 mesoregiões, que por sua vez se dividem em microrregiões (Figura 1A). A Rede Regional de Assistência à Saúde 11 (RRAS11), composta por 45 municípios e uma população de cerca de 950.000 habitantes está inserida na mesorregião 8. Como parte da RRAS11 está o Pontal do Paranapanema,

região composta por 32 municípios e situada no extremo oeste, sendo uma das mais pobres do estado (Figura 1B). Tem uma localização estratégica por ligar os estados de Mato Grosso, Paraná e o Mercosul. Nas últimas três décadas tem sido palco de muitos conflitos sociais pela disputa de terras envolvendo produtores rurais e o movimento dos sem terra (MST). A região tem uma das maiores densidades de assentamentos rurais do país, sendo o município de Mirante do Paranapanema o que apresenta o maior número. Muitos desses assentamentos são caracterizados por baixo desenvolvimento socioeconômico, fornecimento insuficiente de água potável e instalações sanitárias e podem ser fonte de doenças infecciosas, especialmente bacterianas e parasitárias (Fig 1) ^(11,12).

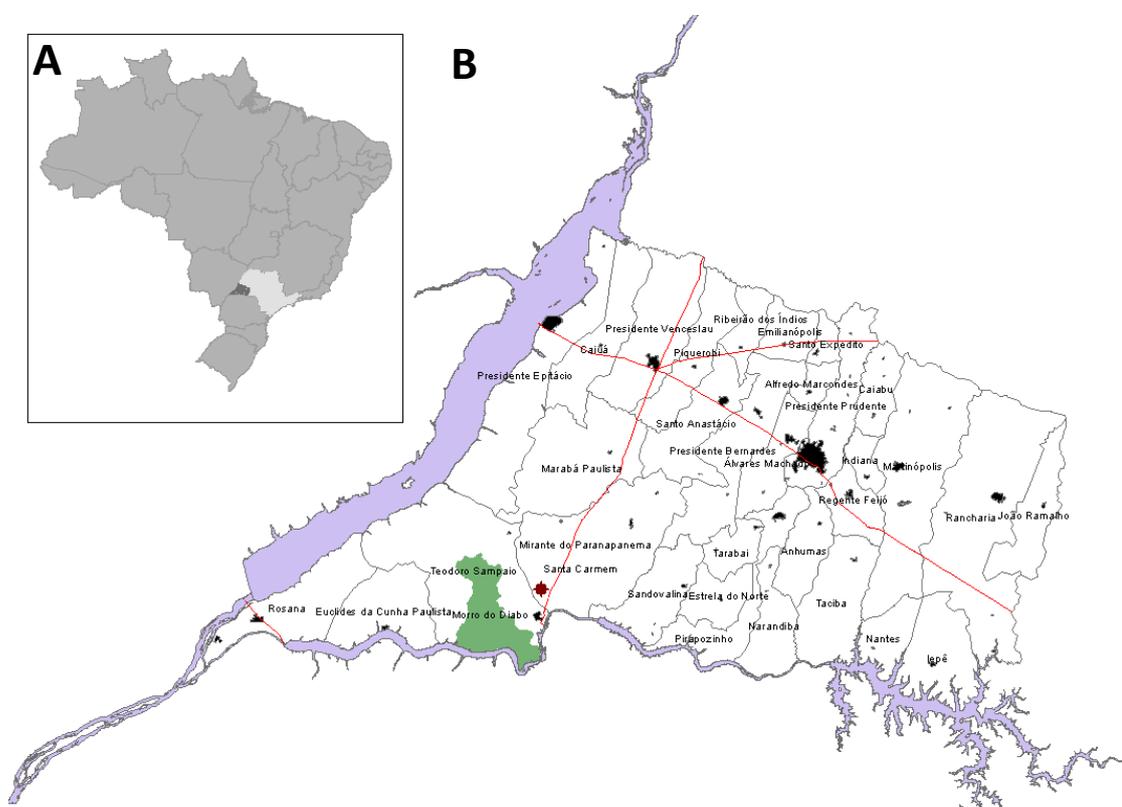


Figura 1. Em (A) os estados brasileiros com destaque para o estado de São Paulo e o Pontal do Paranapanema. Em (B), Os municípios que compõem o Pontal do Paranapanema com ênfase no Assentamento Dona Carmem e os estados vizinhos MS: Mato Grosso; PR: Paraná. Em verde, o parque estadual Morro do Diabo.

Assim, considerando o impacto social, econômico e na saúde desta população, além da escassez de estudos que tratam sobre a temática em assentamentos rurais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a colonização da orofaringe de moradores de um assentamento

rural em relação aos patógenos mais frequentemente isolados nos casos de otite média aguda, como também analisar a presença de variáveis que atuam como fatores de risco para o desenvolvimento da infecção do ouvido médio.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos e tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, observacional e epidemiológico submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista, respeitando a Resolução nº 196/96 sobre pesquisas envolvendo seres humanos. Todos os participantes e/ou responsáveis foram convidados a assinar o termo de assentimento/Termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto está devidamente cadastrado no comitê de ética com registro CAAE 92660318.4.0000.5515.

Local e período da coleta

A coleta das informações e das amostras foi conduzida no assentamento Dona Carmem em Mirante do Paranapanema – São Paulo, Brasil (Figura 1B) nos meses de fevereiro de 2019 a maio de 2019. Foram incluídas pessoas que tinham interesse de participar do estudo e que morassem no assentamento Dona Carmem. Foram excluídos participantes que receberam qualquer tratamento com antibióticos nas 72 horas antes da amostragem, resultando em 55 participantes do estudo.

Coleta das amostras

Todos os participantes selecionados foram registrados em um diário de triagem e avaliadas para elegibilidade do estudo. Foram registradas informações demográficas, estado de vacinação pneumocócica (autodeclaração), e outras variáveis para o desenvolvimento da otite média aguda por meio de um questionário (Anexo A). Após a coleta de dados demográficos uma amostra da orofaringe foi coletada por swab estéril umedecido com salina (0,85%) com movimentos leves nas amígdalas. As amostras coletadas foram armazenadas no meio de transporte que acompanha o swab e imediatamente encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da Universidade do Oeste Paulista. O início das análises não ultrapassou mais que cinco horas após a coleta.

Isolamento e identificação por meio de cultura

No laboratório de microbiologia, as amostras foram semeadas em ágar chocolate e ágar sangue e mantidos 37°C em jarra de anaerobiose. A identificação bacteriana dos agentes patogênicos foi realizada utilizando procedimentos bacteriológicos padrão: *S. pneumoniae* foi identificado por teste com optoquina e bile; A identificação de *H. influenzae* foi baseada na coloração de Gram, no crescimento de ágar de chocolate, na falta de crescimento em ágar de tripticase com sangue de carneiro suplementado com fator de crescimento (Factor X e Fator V). A identificação de *M. catarrhalis* foi baseado na coloração de Gram, reação oxidase positiva e perfil característico nos testes bioquímicos. Além disso, foi realizado análise da hemólise em ágar sangue. Após os testes, as colônias bacterianas eram armazenadas em caldo Brain Heart Infusion enriquecido com 5% de sangue de carneiro e congelada a -70°C para posterior análise por reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizadas como cepa padrão *Haemophilus influenzae* 00434/ IAL, *Streptococcus pneumoniae* 00752/ IAL 4490 e *Moraxella catarrhalis* ATCC25238.

Detecção de S. pneumoniae, H. influenzae e M. catarrhalis por reação da polimerase em cadeia

As amostras anteriormente armazenadas foram submetidas a técnica de fenol-clorofórmio para extração do DNA bacteriano presente na mesma. Subsequentemente, o DNA foi quantificado, avaliado a pureza e qualidade e mantido à temperatura de -20°C⁽¹³⁾.

A análise genotípica das cepas foi baseada na amplificação genética a partir da técnica de PCR Multiplex (reação em cadeia da polimerase) onde foram utilizados os DNAs extraídos previamente. O mix de PCR multiplex foi composto de primers superiores para *H. influenzae*(1,4 mM), *M. catarrhalis* (0,2mM) *S. pneumoniae*(0,04 mM) e o primer comum inferior (0,4 mM), DNTPs (200 mM), tampão (Tris-HCl 10 mM [pH 8,8]), MgCl₂ (1,5 mM), KCl (50 mM) e 0,1% de Triton X-100. Para cada reação foi utilizado 3U de Taq polimerase. O volume da reação foi de 50 ul. O protocolo de amplificação da reação consistiu de: 3 min de desnaturação inicial antes da adição de enzima em seguida foi realizado 38 ciclos de 94 °C/30s, 66 °C/45s e 72 °C/1 min, seguido por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio(3mg/ml) visualizados por iluminação de luz UV⁽¹⁴⁾.

Os fragmentos de DNA foram comparados com um marcador de DNA de 1000 pb. A presença (+) e ausência (-) das bandas no gel foram indicativas para presença ou ausência da espécie bacteriana na amostra.

Os primers utilizados estão listados na Tabela 1, conforme descrito na literatura por Hendolin et al. ⁽¹⁴⁾.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados na PCR Multiplex para identificação de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis* isoladas das amostras da orofaringe de moradores do assentamento rural Dona Carmem, Mirante do Paranapanema-SP.

Primers	Sequência	Amplicon (pb)
Lower primer 21-mer	5'-CTA CGC ATT TCA CCG CTA CAC-3'	
<i>H. influenzae</i>	5'-CGT ATT ATC GGA AGA TGA AAG TGC-3'	525
<i>M. catarrhalis</i>	5'-CCC ATA AGC CCT GAC GTT AC-3'	264
<i>S. pneumoniae</i>	5'-AAG GTG CAC TTG CAT CAC TAC C-3'	484

Para a análise dos dados foram utilizadas técnicas de estatística descritiva e inferencial. Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória univariada para observar a distribuição de frequências das variáveis estudadas. Para a análise das variáveis foi utilizado o teste qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foi obtido um total de 55 questionários respondidos e amostras coletadas. A dificuldade de locomoção, baixos níveis de escolaridade e péssima infraestrutura influenciaram diretamente a adesão dos participantes no estudo, resultando em um número de amostras menor do que o esperado para região.

No método de cultura convencional, 10,9% das amostras apresentaram culturas negativas, enquanto o percentual de culturas inconclusivas foi de 89,09% (presença de outros microrganismos) ($p < 0,05$). Este alto índice, pode ser justificado pela presença de microrganismos de outras espécies (não identificados neste trabalho), também possivelmente devido a característica fastidiosa dos agentes bacterianos *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*, assim, como a presença de bacterias viáveis, mas não cultiváveis ou ainda tratamento prévio com antimicrobianos. Além disso, vale ressaltar que a coleta de amostras da orofaringe requer habilidade devido dificuldade de coleta sem a contaminação com a microbiota bucal, este fato também pode ter contribuído para o alto índice de amostras inconclusivas.

No método de identificação por PCR multiplex, *S. pneumoniae* o principal patógeno envolvido em casos de otite média, estava presente em 69,6% das amostras seguido pela

presença de *M. catarrhalis* em 60%, demonstrando valores similares para colonização ($p>0,05$). A técnica molecular também permitiu a identificação concomitante das duas espécies em 49% das amostras (Tabela 2). O patógeno *H. influenzae* não foi identificado nas amostras ($p<0,05$).

Tabela 2. Resultados encontrados na identificação dos patógenos envolvidos na OMA por métodos convencionais e moleculares.

Identificação dos patógenos por técnicas moleculares e convencionais					
Método de cultura convencional		Método de PCR multiplex			
Negativas	Inconclusivas	<i>S. Pneumoniae</i>	<i>M. catarrhalis</i>	<i>H. Influenzae</i>	<i>S.pneumoniae</i> + <i>M. catarrhalis</i>
10,9% (N=6)	89,09 (N=49)	69,09% (N=38)	60% (N=33)	0% (N=0)*	49% (N=27)

*valor estatisticamente diferente em relação ao encontrado para *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e ambos patógenos ($p<0,05$).

Em relação ao perfil clínico-epidemiológico foi observado que colonização por *S. pneumoniae* foi menor em indivíduos com menos de 1 ano de idade e entre 16 a 20 anos. É também mais comum em indivíduos de cor branca e parda, renda familiar maior que R\$1.500,00 e que fizeram o uso de antimicrobianos três vezes ao ano ($p<0,05$) (Tabela 3). Para *M. catarrhalis* ficou evidenciada sua presença principalmente em indivíduos com até 5 anos, cor branca ou parda, renda familiar menor que R\$1.500,00 e uso de antimicrobiano duas vezes ao mês ($p<0,05$). A colonização concomitante foi mais frequente em crianças com 2 a 5 anos, sexo feminino, cor branca e parda, renda familiar menor que R\$1.500,00 e uso de antimicrobiano 2 a 3 vezes ao ano ($p<0,05$).

Tabela 3. Percentuais de colonização por *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e por ambos os patógenos em relação aos dados demográficos dos moradores do assentamento rural Dona Carmem, Mirante do Paranapanema-SP.

Características sócio-demográficas		<i>S. pneumoniae</i> (%)	<i>M. catarrhalis</i> (%)	Ambos (%)
IDADE	<1 ano (3,6% n=2) ^{ac}	50 *	100 *	50
	2 a 5 anos (12,7% n=7) ^{ac}	71,40	100*	85,71 *
	5 a 10 anos (30,9% n=17) ^b	68,75	56,25	50
	11 a 15 anos (29,0% n=16)	73,30	66,60	60
	16 a 20 anos (7,2% n=4)	50*	50	50
	>21 anos (16,3% n=9) ^{ab}	66,6	11,10	11,10
SEXO	Feminino (52,7% n=29) ^b	75,86	65,51	58,62*
	Masculino (47,2% n=26) ^{bc}	62,50	53,80	38,46
COR	Branco (34,5% n=19) ^{ab}	68,42	52,63	47,36
	Pardo (63,7% n=37) ^b	69,40	63,80	50
	Negro (1,8% n=1)	0*	0 *	0*
RENDA	<R\$900 (67,3% n= 37)	70,37	59,25	59,25
	>R\$900 a <1500 (30,9% n=17)	68,42	68,42	57,80
	>1500 (1,8% n=1) ^{ab}	100*	0 *	0 *
ANTIMICROBIANOS	Negativa (56,6% n=31) ^{bc}	60	56,66	40
	2x ao ano (29% n=16) ^{ab}	87,50	56,25	56,25*
	3x ao ano (9% n=5) ^{ab}	100 *	60	60*
	2x ao mês (5,4% n=3) ^{ac}	33,3	100 *	33,3

^a diferença estatística entre a colonização de *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* ($p < 0,05$)

^b diferença estatística entre a colonização de *S. pneumoniae* e ambos os patógenos ($p < 0,05$)

^c diferença estatística entre a colonização de *M. catarrhalis* e ambos os patógenos ($p < 0,05$)

* diferença estatística para a colonização em cada características demográficas ($p < 0,05$)

Os percentuais de colonização em relação a potenciais fatores de risco para OMA podem ser visualizados na Tabela 4. As taxas de colonização para *S. pneumoniae* foram maiores em relação a *M. catarrhalis* em presença de tabagismo, tabagismo passivo, prematuridade, alergia a alimentos, pneumonia de repetição e doença de refluxo gastroesofágico ($p < 0,05$). Foi ainda possível verificar que a idade, o tabagismo, e o tabagismo passivo influenciam na colonização de bactérias *M. catarrhalis*, sendo que o tabagismo também influencia na colonização das bactérias *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* simultaneamente ($p < 0,05$).

A má formação crânio facial foi a condição mais relevante em influenciar a colonização por *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* isoladamente ou concomitantemente (100%), seguido da pneumonia de repetição (75%) ($p < 0,05$).

Tabela 4. Percentuais de colonização bacteriana dos moradores do assentamento rural Dona Carmem, Mirante do Paranapanema-SP em relação a fator de risco para o desenvolvimento de OMA.

Fatores de risco para OMA	Taxa de colonização (%)		
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. catarrhalis</i>	Ambos
Tabagismo (n=5) ^{ab}	60%	0%	0%
Tabagismo passivo (n=19) ^{ab}	61,90%	42,80%	38,09%
Vacinação completa (n=42) ^c	70,73%	63,41%	48,78%
Prematuridade (n=8) ^{ab}	60,50%	37,50%	37,50%
Má formação crânio facial (n=1)	100% *	100%*	100%*
Trauma orofacial (n=0)	0%	0%	0%
Aleitamento materno (n=50) ^b	65,30%	61,22%	48,97%
Alergia a alimentos (n=2) ^{ab}	100%*	50%	50%
Alergia a medicamentos (n=2) ^{ac}	33,33%	66,60%	33,33%
Rinite (n=16) ^b	64,70%	58,82%	47,05%
Sinusite de repetição (n=3)	75%*	75%*	75%*
Pneumonia de repetição (n=4) ^{ab}	100% *	50%	50%
Frequência escolar (n=36) ^b	66,60%	59,25%	48,14%
Uso de corticoides (n=7) ^{bc}	71,42%	71,42%	57,14%
Doença de refluxo gastroesofágico (n=6) ^{ab}	57,14%	42,85%	42,85%

^a diferença estatística entre a colonização de *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* ($p < 0,05$)

^b diferença estatística entre a colonização de *S. pneumoniae* e ambos os patógenos ($p < 0,05$)

^c diferença estatística entre a colonização de *M. catarrhalis* e ambos os patógenos ($p < 0,05$)

* diferença estatística para a colonização em cada microrganismo

DISCUSSÃO

A característica fastidiosa dos agentes patogênicos envolvidos nos casos de otite média aguda, assim como a tendência da espécie *S. pneumoniae* se submeter a autólise resultam em resultados falsos negativos em relação ao crescimento bacteriano em cultura e falhas durante o processo de identificação pela mesma ^(15,16). Desta forma, 89,09% das amostras não obtiveram resultados conclusivos baseados em técnicas convencionais de cultura, fato contestado pelos resultados obtidos a partir da técnica da PCR multiplex que possibilitou a detecção das espécies bacterianas pela análise específica do material genético bacteriano e também permitindo a identificação de mais um de um patógeno de forma rápida

e eficaz. No entanto no Brasil, ainda há desafios na aplicação desta técnica na rotina dos laboratórios devido aos custos elevados e a necessidade de equipe especializada ^(17,18).

A orofaringe é o principal reservatório para colonização de potenciais patógenos, atuando como órgão alvo para desenvolvimento de infecções de vias aéreas⁽³⁾. O patógeno identificado com maior frequência foi *S. pneumoniae*, responsável por infecções que variam de leves a invasivas, associado a taxas de mortalidade e morbidade significativas em todo o mundo ⁽¹⁹⁾. Na sequência, *M. catarrhalis*, microrganismo importante nas infecções do trato respiratório que recentemente se tornou o principal agente envolvido nos casos de otite média aguda episódica e recorrente ⁽²⁰⁾ e sua prevalência varia de acordo com as características do portador. Foi observada uma maior colonização de *M. catarrhalis* em crianças com até 5 anos. Isso se justifica pois após o primeiro ano de vida, temos os maiores picos de sua colonização e na sequência um declínio com a idade à medida que aumenta a diversidade de microrganismos da microbiota e devido o amadurecimento do sistema imunológico⁽²¹⁾.

Ainda que a vacina conjugada pneumocócica, obrigatória no calendário de imunizações brasileiro e oferecida desde 2010 ofereça uma redução importante na carga de doenças causadas por *S. pneumoniae*, indivíduos que declaram estar com a imunização atualizada, apresentaram uma alta taxa de colonização, principalmente crianças menores de 10 anos. Várias hipóteses devem ser consideradas, como cobertura vacinal incompleta (3 doses mais um reforço até 10 anos), colonização por sorotipos não vacinais ⁽³⁾ e baixa soroconversão a vacina. Desta forma, nos últimos anos que cerca de 30% das crianças >2 anos e <10 anos não soroconvertem para pneumo-10⁽²²⁾.

No entanto, a vacina conjugada contra a *H. influenza* tipo B pode estar associada aos resultados negativos em ambas as técnicas para o patógeno *H. influenzae*. A introdução desta vacina em 1999 diminuiu acentuadamente os casos de meningite causados por esse microrganismo. Além disso, pode também interferir também em sua taxa de colonização e transmissão e conseqüentemente aumentando a presença de *S. pneumoniae*, visto que estes patógenos competem naturalmente pelo sítio de colonização^(23,24).

Os percentuais de colonização dos indivíduos que relataram ter recebido aleitamento materno foram relativamente altos, cerca de 65, 61 e 48% respectivamente para *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e ambos concomitantemente. Entretanto, relatos da literatura demonstram que o aleitamento materno fornece imunoglobulinas importantes na defesa do organismo contra microrganismos. A principal imunoglobulina presente no leite materno é a IgA responsável por ligar-se a microrganismos impedindo a sua aderência as superfícies mucosas, passo importante para colonização ^(25,26). No presente estudo, provavelmente, outros

fatores foram envolvidos neste processo, ao favorecer a colonização mesmo com o aleitamento materno.

Indivíduos que passaram por episódios de pneumonias, sinusites de repetição e uso de corticoides obtiveram maiores percentuais de colonização pelos agentes envolvidos nos casos de OMA, com destaque para *S. pneumoniae*, o que está de acordo com estudos anteriores, especialmente em populações urbanas^(27,28). No entanto, existem poucos estudos sobre esse fenômeno em populações rurais, e até onde sabemos nenhum em assentamentos rurais. A taxa de 100% de colonização para indivíduos que apresentam má formação crânio facial é de extrema importância, principalmente para os que apresentam anormalidades na trompa de Eustáquio, fatores envolvidos no aumento das chances de reincidência da infecção, assim como maior desenvolvimento de agravos⁽²⁹⁾, deste modo, a colonização por *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* os torna susceptíveis ao desenvolvimento da otite média aguda e aos possíveis danos decorrentes da mesma.

Grande parcela dos indivíduos que apresentaram colonização bacteriana por *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* demonstraram renda familiar menor que R\$ 1.500,00. As condições econômicas exercem importante papel na prevalência das infecções do ouvido médio, desta forma, populações rurais como as do presente estudo estão mais expostas as mesmas⁽³⁰⁾.

Foi observado uma alta porcentagem de colonização em indivíduos com frequente antibioticoterapia. A exposição a altas frequências no uso de antimicrobianos exerce potencial para a seleção de cepas resistentes colonizadoras da microbiota, fator de risco para desenvolvimento de infecções por bactérias multirresistentes e também para transmissão vertical destas cepas^(31,32).

O tabagismo, assim como o tabagismo passivo ao proporcionar o contato com a nicotina e os produtos do tabaco tornam-se fatores responsáveis por elevar a susceptibilidade a infecções do ouvido decorrentes a invasão e proliferação de patógenos, visto que, o tabaco diminui a função mucociliar da trompa de Eustáquio. Desta forma, os dados do presente estudo evidenciam que estes hábitos atuam como potenciais fatores de riscos para colonização bacteriana por patógenos envolvidos em doenças de vias aéreas como a otite média aguda^(6,24,26).

A frequência escolar, assim como a prematuridade, traumas orofaciais e doenças de refluxo gastroesofágico são relatados como contribuintes para predisposição do desenvolvimento da otite média aguda, auxiliando na transmissão dos patógenos envolvidos na mesma pelos portadores assintomáticos^(6,33). Baseando-se nestas características não foi

observado associação para a colonização dos patógenos pesquisados no presente estudo, evidenciado a necessidade de uma busca mais aprofundada por indivíduos presentes nestes grupos a fim de conferir resultados de maior confiabilidade a cerca destes fatores.

O baixo número de pessoas entrevistadas e de amostras colhidas constituiu uma das principais limitações deste estudo. Populações rurais, por terem suas casas distantes umas das outras, não terem horários definidos para ir e voltar ao trabalho e principalmente por serem objetos de pesquisa de grande número de instituições são pouco aderentes a esses projetos.

CONCLUSÃO

O método por PCR detectou maior número de amostras positivas para a presença de *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* se comparado com o método convencional de cultura. A vacina para *H. Influenzae* provavelmente teve um impacto na redução da sua colonização na orofaringe das amostras. Entretanto, este fato não foi observado com a vacinação para pneumococos. O estudo demonstra a importância do monitoramento contínuo de sorotipos a fim de fornecer evidências da predominância dos agentes etiológicos de doenças como a OMA. Além disso, os resultados ressaltam a vulnerabilidade dos moradores de assentamentos rurais e a necessidade da implementação de ações mais efetivas de educação e assistência médica.

AGRADECIMENTOS

Projeto financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo processo 2018/08097-7.

REFERÊNCIAS

1. Kates AE, Dalman M, Torner JC, Smith TC. *The nasal and oropharyngeal microbiomes of healthy livestock workers*. PLoS ONE 2019; 14(3): e0212949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212949>
2. Parlet CP, Brown MM, Horswill, AR. *Commensal Staphylococci Influence Staphylococcus aureus Skin Colonization and Disease*. Trends in Microbiology 2019; 27(6):497-507. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>
3. Mulu W, Yizengaw E, Alemu M, Mekonnen D, Hailu D, Ketemaw K, et al. *Pharyngeal colonization and drug resistance profiles of Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, and Haemophilus influenzae among HIV infected children attending ART Clinic of Felegehiwot Referral Hospital, Ethiopia*. PLoS ONE 2018; 13(5): e0196722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196722>
4. Steenhuijsen Piters WAA, Jochems SP, Mitsi E, et al. *Interaction between the nasal microbiota and S. pneumoniae in the context of live-attenuated influenza vaccine*. Nat Commun 2019;10(1):2981. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10814-9>
5. Korona-Glowniak I, Zychowski P, Siwiec R, et al. *Resistant Streptococcus pneumoniae strains in children with acute otitis media– high risk of persistent colonization after treatment*. BMC Infectious Diseases 2018; 18:478. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3398-9>
6. Castillo JG, Teja-Marina J, Candel FJ, et al. *BAHNG score: predictive model for detection of subjects with the oropharynx colonized by uncommon microorganisms*. Rev Esp Quimioter 2017; 30(6):422-428. PMID: 29115367
7. García-Rodríguez JA, Fresnadillo MJM. *Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens*. J antimicrob Chemother 2002; 50:58-72. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf506>
8. Freitas NR, Teles SA, Caetano KAA, et al. *Hepatitis E seroprevalence and associated factors in rural settlers in Central Brazil*. Rev Soc Bras Med Trop 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0105-2017>.
9. Macedo JP, Dimenstein M, Silva BIB, et al. *Apoio social, transtorno mental comum e uso abusivo de álcool em assentamentos rurais*. Temas psicol 2018 26(3). <http://dx.doi.org/10.9788/TP2018.3-01Pt>
10. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Estado da Saúde. Available on: www.sistema.saude.sp.gov Accessed in January, 22, 2020.

11. Prestes-Carneiro LE, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, et al. *Seroprevalence of toxoplasmosis, toxocariasis and cysticercosis in a rural settlement, São Paulo State, Brazil*. *Pathog Glob Health*. 2013;107(2):88–95. doi:10.1179/2047773213Y.0000000079
12. Prestes-Carneiro LE, Daniel LAF, Almeida LC, et al. *Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo State, Brazil*. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):251. doi:10.1186/s13071-019-3496-6
13. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning - a laboratory manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
14. Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors JJ. *Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions*. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2854–2858. PMID: 9350746
15. Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. *Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant Streptococcus pneumoniae in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective*. *Clin Microbiol Rev* 2016;29(3):525–552. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-15>
16. Yoo MH, Cho YS, Choi J, et al. *Microbiological Results From Middle Ear Effusion in Pediatric Patients Receiving Ventilation Tube Insertion: Multicenter Registry Study on the Effectiveness of Ventilation Tube Insertion in Pediatric Patients With Chronic Otitis Media With Effusion: Part I*. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2018;11(3):181–185. <https://doi.org/10.21053/ceo.2017.01473>
17. Farajzadah Sheikh A, Saki N, Roointan M, et al. *Identification of Alloiococcus otitidis, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis and Haemophilus influenzae in Children With Otitis Media With Effusion*. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3): e17985. <https://doi.org/10.5812/jjm.17985>
18. Bahri TD.; Goudarzi M, Ghafoori, SM, et al. *Comparing culture and Multiple PCR methods to examine fastidious bacteria in otitis externa and media*. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2017;11(2):871. <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.2.25>
19. Lisher JP, Tsui HT, Ramos-Montañez S, et al. *Biological and Chemical Adaptation to Endogenous Hydrogen Peroxide Production in Streptococcus pneumoniae D39*. *mSphere*. 2017;2(1): e00291-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00291-16>
20. Ren D, Pichichero ME. *Vaccine targets against Moraxella catarrhalis*. *Expert Opin Ther Targets* 2016;20(1):19–33. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1081686>

21. Chonmaitree T, Jennings K, Golovko G, et al. *Nasopharyngeal microbiota in infants and changes during viral upper respiratory tract infection and acute otitis media*. PLOS ONE 2017;12(7): e0180630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180630>
22. Carneiro LEP, Pelizari G, Pereira, DHB, Primo LS, Vasconcelos DM. *The role of a single dose of pneumo-23 vaccine in preventing recurrent respiratory tract infection in patients of a tertiary public infectious diseases/immunodeficiencies ambulatory*. Journal of Infection Diseases and Treatment 2019; 43. DOI: 10.21767/2472-1093-C1-007).
23. Madhi SA. *Pneumococcal conjugate vaccine and changing epidemiology of childhood bacterial meningitis*. J Pediatr 2015;91: 108-110.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.11.001>
24. Park B, Nizet V, Liu GY. *Role of Staphylococcus aureus Catalase in Niche Competition against Streptococcus pneumoniae*. Journal of Bacteriology 2008;190(7):2275-2278.
<https://doi.org/10.1128/JB.00006-08>
25. Wiertsema SP, Leach AJ. *Theories of otitis media pathogenesis, with a focus on Indigenous children*. Med J Aust 2009;191(9): S50-4. PMID: 19883357
26. Garcia MV, Azevedo MF, Testa JRG, Barbosa C, Luiz L. *The influence of the type of breastfeeding on middle ear conditions in infants*. Braz J Otorhinolaryngol 2012;78(1):8-14. <https://doi.org/10.1590/S1808-86942012000100002>
27. Yousef YE, El-Magd EAA, El-Asheer OM, Kotb S. *Impact of Educational Program on the Management of Chronic Suppurative Otitis Media among Children*. International Journal of Otolaryngology 2015;1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/624317>
28. Libson S, Dagan R, Greenberg D, et al. *Nasopharyngeal Carriage of Streptococcus pneumoniae at the Completion of Successful Antibiotic Treatment of Acute Otitis Media Predisposes to Early Clinical Recurrence, The Journal of Infectious Diseases* 2005;191(11): 1869–1875. <https://doi.org/10.1086/429918>

29. Bluestone CD. *Epidemiology and pathogenesis of chronic suppurative otitis media: implications for prevention and treatment*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1998; 42(3):207-223. [https://doi.org/10.1016/S0165-5876\(97\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0165-5876(97)00147-X)
30. Wahid FL, Khan A, Khan IA. *Complications of chronic suppurative otitis media: challenge for a developing country*. The Turkish Journal of Ear Nose and Throat 2014;24(5): 265-70. <https://doi.org/10.5606/kbbihtisas.2014.144777>
31. Zhang L, Prietsch SOM, Mendes AP, et al. *Inhaled corticosteroids increase the risk of oropharyngeal colonization by Streptococcus pneumoniae in children with asthma*. Respirology 2013;18(2):272-7. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02280.x>.
32. Ohlsson A, Shah VS. *Intrapartum antibiotics for known maternal Group B streptococcal colonization*. Cochrane Database of Systematic Reviews 2014; 6: CD007467. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007467.pub4>.
33. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, et al. *Antibiotic usage and risk of colonization and infection with antibiotic-resistant bacteria: a hospital population-based study*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(10):4264–4269. <https://doi.org/10.1128/AAC.00431-09>
34. Bogaert D, Groot de R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease*. The Lancet Infectious Diseases 2004;4(3):144-154. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7)

APÊNDICE - A**QUESTIONÁRIO**

Idade

Sexo M F Cor branca negra parda amarelo Frequente Creche ou escola sim não Tabagismo passivo sim não Uso de Antibióticos nos últimos 30 dias sim não Aleitamento materno sim não Sintomas de Refluxo Gastroesofágico sim não Recebeu vacina antipneumocócica sim não Pneumonias de repetição sim não Sinusites de repetição sim não Prematuridade sim não Mama deitado sim não Mal formações crânio faciais sim não Alergias alimentares sim não se sim, qual(is)?

ANEXO A

NORMAS “PATHOGENS AND GLOBAL HEALTH”

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal’s requirements.

Author Services

For general guidance on every stage of the publication process, please visit our Author Services website.

Editing Services

For editing support, including translation and language polishing, explore our Editing Services website

Editorial Manager

This journal uses Editorial Manager to peer review manuscript submissions. Please read the guide for Editorial Manager authors before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

This title utilises format-free submission. Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. For more detail see the format-free submission section below.

Contents

About the Journal

Peer Review and Ethics

Preparing Your Paper

Structure

Word Limits

Format-Free Submissions

Editing Services

Checklist

Using Third-Party Material

Submitting Your Paper

Data Sharing Policy

Publication Charges

Copyright Options

Complying with Funding Agencies

Open Access

My Authored Works

Reprints

About the Journal

Pathogens and Global Health is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's Aims & Scope for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Pathogens and Global Health accepts the following types of article: original articles, review articles, commentaries.

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be double blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about what to expect during peer review and read our guidance on publishing ethics.

Preparing Your Paper Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Format-Free Submission

Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. Manuscripts may be supplied as single or multiple files. These can be Word, rich text format (rtf), open document format (odt), or PDF files. Figures and tables can be placed within the text or submitted as separate documents. Figures should be of sufficient resolution to enable refereeing.

There are no strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the essential elements needed to evaluate a manuscript: abstract, author affiliation, figures, tables, funder information, and references. Further details may be requested upon acceptance.

References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. Author name(s), journal or book title, article or chapter title, year of publication, volume and issue (where appropriate) and page numbers are essential. All bibliographic entries must contain a corresponding in-text citation. The addition of DOI (Digital Object Identifier) numbers is recommended but not essential.

The journal reference style will be applied to the paper post-acceptance by Taylor & Francis. Spelling can be US or UK English so long as usage is consistent.

Note that, regardless of the file format of the original submission, an editable version of the article must be supplied at the revision stage.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, visit this website.

Checklist: What to Include

Author details. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCIDiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. Read more on authorship. Should contain an unstructured abstract of 250 words.

Graphical abstract (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .tiff. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.

You can opt to include a video abstract with your article. Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.

Between 5 and 6 keywords. Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization.

Funding details. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

For single agency grants

This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].

For multiple agency grants

This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].

Disclosure statement. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.

Data availability statement. If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). Templates are also available to support authors.

Data deposition. If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a recognized data repository prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.

Supplemental online material. Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about supplemental material and how to submit it with your article.

Figures. Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our Submission of electronic artwork document.

Tables. Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

Equations. If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about mathematical symbols and equations.

Units. Please use SI units (non-italicized).

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on requesting permission to reproduce work(s) under copyright.

Submitting Your Paper

This journal uses Editorial Manager to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in Editorial

Manager. Please read the guidelines above and then submit your paper in the relevant Author Centre, where you will find user guides and a helpdesk.

Please note that Pathogens and Global Health uses Crossref™ to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to Pathogens and Global Health you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about sharing your work.

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis Basic Data Sharing Policy. Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see this information regarding repositories.

Authors are further encouraged to cite any data sets referenced in the article and provide a Data Availability Statement.

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. Read more on publishing agreements.

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open

access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about sharing your work.

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our Open Select publishing program, making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check open access funder policies and mandates [here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our Author Services website.

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via My Authored Works on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your free eprints link, so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to promote your research.

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also order print copies of the journal issue in which your article appears.

Queries

Should you have any queries, please visit our Author Services website or contact us [here](#).

Updated 30-01-2019