



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Microbiologia

Estratégias de diagnóstico etiológico das infecções pneumocócicas

Henrique Fernando de Gouveia Rodrigues

Orientado por:

Professor Doutor José Melo Cristino

Junho 2021

Resumo:

Streptococcus pneumoniae é um dos principais agentes etiológicos de várias doenças infecciosas com um grande impacto mundial, ao nível de morbilidade e mortalidade. O seu diagnóstico etiológico correto e atempado torna-se essencial na prática clínica diária, contribuindo para uma melhor utilização de antibióticos e para uma redução da morbilidade e mortalidade destas infeções.

A introdução de vacinas conjugadas antipneumocócicas teve grande impacto nas infeções pneumocócicas e originou novos desafios. Observou-se, a nível global, uma diminuição da incidência das infeções pneumocócicas causadas por serótipos vacinais, que foi parcialmente contraposto por um aumento, embora de menor relevo, da incidência destas infeções por outros serótipos não incluídos na vacina. Estes efeitos foram mais evidentes e melhor estudados na doença invasiva pneumocócica, a qual era especificamente visada pela vacina, sendo importante, no entanto, não descurar o efeito da vacinação nas infeções pneumocócicas não invasivas. Em Portugal, a vacina PCV13 (Vacina conjugada 13 valente) foi incluída no PNV (Plano Nacional de Vacinação) em 2015.

Estes dados, em conjugação com o desenvolvimento e implementação de novas técnicas para a identificação de *Streptococcus pneumoniae*, como as técnicas de biologia molecular, motivaram a elaboração desta revisão sobre o tema.

Ao longo do texto vão discutir-se os vários métodos de diagnóstico etiológico das infeções pneumocócicas mais prevalentes, entre as quais a rinosinusite aguda e a otite média aguda, e das mais graves, onde se incluem a pneumonia e a meningite, quais as vantagens e limitações de cada técnica diagnóstica e, ainda, quais as perspetivas futuras das mesmas.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; doença pneumocócica não invasiva; doença pneumocócica invasiva; diagnóstico etiológico.

O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

Abstract:

Streptococcus pneumoniae is one of the main agents implicated in several infectious diseases, which have a substantial global impact, concerning mortality and morbidity. A correct and timely etiological diagnosis is, therefore, essential in the day-to-day clinical practice, thus contributing to a better usage of antibiotics and to a significant reduction in the mortality and morbidity of these infections.

The implementation of the PCV13 in Portugal's National Vaccination Program had an important impact on the epidemiology of pneumococcal infections. It led to a decrease in the incidence of pneumococcal disease caused by the vaccine serotypes, which was partially offset by a smaller increase in the incidence of infections caused by serotypes not included in the vaccine. The effects of pneumococcal vaccination were more noticeable and better studied in regard to invasive pneumococcal disease (IPD), which was specifically targeted by the vaccine, yet its effects on non-invasive pneumococcal disease must not be overlooked. In addition, the development and implementation of new methodologies for the identification of *Streptococcus pneumoniae*, such as molecular biology techniques, motivated the writing of the present review.

Throughout this thesis, various methods used to diagnose the most prevalent pneumococcal infections, such as rhinosinusitis and acute otitis media, but also the most severe, in which pneumonia and meningitis are included, will be discussed. Furthermore, the advantages and limitations of each method will be reviewed, as well as their future perspectives.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*; non-invasive pneumococcal disease; invasive pneumococcal disease; etiological diagnosis.

Índice

Introdução:	5
Métodos de Identificação de <i>Streptococcus pneumoniae</i> :	9
Rinossinusite Aguda Bacteriana:	21
Otite Média Aguda:	25
Pneumonia:.....	34
Meningite bacteriana:	47
Conclusão:	56
Referências bibliográficas:.....	59

Introdução:

- Infecções pneumocócicas

As bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) são diplococos Gram-positivo encapsulados que colonizam transitória e frequentemente as vias aéreas superiores, em cerca de 60% das crianças e 2% dos adultos, durante o inverno e a primavera [1,2]. Pneumococo reside na nasofaringe, de forma assintomática na maioria das situações, podendo ser transmitido por doentes com infecção ativa ou por portadores [3]. Os portadores assintomáticos são os principais responsáveis pela transmissão, que ocorre por via aérea através de gotículas. [4]

Apesar de a colonização ser um evento frequente e o causar doença ser um acontecimento raro, *Streptococcus pneumoniae* é um dos principais agentes de várias doenças infecciosas, possuindo um enorme impacto mundial, ao nível de morbilidade e mortalidade. Estas doenças possuem um grande espectro de variabilidade entre si, no que toca à gravidade e à disseminação, permitindo a divisão em doença pneumocócica invasiva (DIP) e não invasiva.

A infecção tem origem na nasofaringe, de onde o microrganismo se pode disseminar localmente no trato respiratório superior e causar rinossinusite ou otite média aguda ou, por exemplo, por via hematogénea, invadir locais que normalmente seriam estéreis, causando DIP, uma entidade que engloba várias doenças como a meningite, a pneumonia com bacteriémia, a osteomielite, a artrite séptica, a peritonite bacteriana espontânea e a bacteriémia oculta, entre outras [5]. A DIP, em contraste com a rinossinusite e otite média aguda, está associada a uma mortalidade considerável e, para os que sobrevivem, a uma morbilidade considerável, especialmente na meningite pneumocócica [3,5].

- Vacinação

Atualmente existem dois tipos de vacinas antipneumocócicas, a vacina pneumocócica polissacárida 23-valente (PPV23) e as vacinas pneumocócicas conjugadas 7, 10 e 13-valentes (PCV7, PCV10, PCV13). No presente existem 98 serótipos conhecidos de

Streptococcus pneumoniae, contudo, apenas alguns causam a maior parte dos casos de doença invasiva, sendo esses os serótipos incluídos nas vacinas [6,7,8].

A PPV23 surgiu em 1983 e abrange os serótipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F, que na época, perfaziam cerca de 85% dos serótipos causadores de DIP [8,9]. Esta vacina foi eficaz na prevenção de doença invasiva pneumocócica e, apesar de não ter diminuído a incidência de Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC), tem sido associada a uma diminuição da gravidade da doença em doentes hospitalizados [10]. A PPV23 induz uma resposta imunitária T-independente que apenas produz anticorpos específicos para cada serótipo incluído na vacina, sem formação de linfócitos B de memória, limitando a duração de proteção antipneumocócica desta vacina. Outro problema prende-se com a fraca imunogenicidade da PPV23 em crianças de idade <2 anos e em doentes idosos e/ou com comorbilidades [11,12].

De forma a ultrapassar as limitações da PPV23 surgiram as PCV. Estas induzem uma resposta imunitária T-dependente com a formação de anticorpos serótipo-específicos e de linfócitos B de memória, resultando em uma proteção antipneumocócica mais duradoura e com níveis mais elevados de anticorpos protetores em todas as idades [9,11]. A PCV7 surgiu em 2000 e abrangia os serótipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F que, na altura, perfaziam cerca de 80-90% dos serótipos causadores de DIP em crianças nos Estados Unidos da América [8]. Após a sua introdução, foi documentada uma diminuição da incidência de DIP causada pelos serótipos alvo da vacina, resultando em um decréscimo geral da incidência de DIP. No entanto, este benefício da vacinação foi parcialmente suplantado pelo aumento gradual da incidência de DIP causada por outros serótipos não incluídos na PCV7 [13].

Dado o surgimento de novos serótipos causadores de DIP, gerou-se a necessidade de estes serem também alvo da vacinação. Em 2009 surgiu a PCV10 que acrescentou os serótipos 1, 5 e 7F aos já existentes na PCV7 e em 2010 surgiu a PCV13 que adicionou os serótipos 3, 6A e 19A aos já abrangidos na PCV10. As PCVs provaram ser altamente eficazes, resultando na diminuição da incidência da DIP até em indivíduos não vacinados, um fenómeno denominado de imunidade de grupo [14].

Em Portugal, a PPV23 foi disponibilizada em 1996, apenas no setor privado sem qualquer participação do Estado, sendo que apenas 10% da população adulta terá sido vacinada com a mesma [14]. As PCVs estiveram disponíveis desde 2001 até meados de 2015, também apenas no mercado privado, inicialmente sob a forma da PCV7 e, mais tarde, sob a forma das PCV10 e PCV13 que foram introduzidas em 2009 e 2010, respetivamente [15]. A PCV10, apesar de se ter mantido no mercado, foi pouco utilizada porque, escassos meses após a sua introdução, surgiu a PCV13. Esta vacina teve preferência na indicação vacinal pois, para além de incluir três serótipos adicionais, estes serótipos eram de particular importância nos casos de DIP em Portugal [16]. No entanto, em contraste com a taxa de vacinação observada na PPV23 nos adultos, a PCV7 foi administrada a 75% de todas as crianças nascidas em 2008. Em 2012 esta taxa baixou para 63% e manteve-se estável nos 61% até 2014, sendo os custos totalmente suportados pelas famílias [17].

Em 2015 a PCV13 foi incluída no plano nacional de vacinação e administrada, de forma gratuita, a todas as crianças nascidas a partir de janeiro de 2015, num esquema de 2+1. É também recomendado um esquema de vacinação sequencial com a PCV13 e PPV23 apenas para doentes pertencentes a grupos considerados de risco [18].

A nível global, em 2015, já 129 países tinham introduzido uma PCV, que reduziu substancialmente o número de casos de DIP causada pelos serótipos abrangidos pela mesma. Nesse ano, estimou-se que tenham existido cerca de 8.9 milhões de casos de pneumonia pneumocócica, o que representou um decréscimo de 37% em relação aos 14.2 milhões de casos relativos ao ano de 2000, data anterior à introdução da PCV [19]. No entanto, em 2016, e apesar do impacto da PCV ser inegável, a infeção por *Streptococcus pneumoniae* manteve-se a maior causa de morbilidade e mortalidade de entre as várias etiologias de infeção respiratória baixa [20].

- A microbiologia e as infeções pneumocócicas

Em 2004, Bartlett chamou à atenção para a diminuição da realização de testes microbiológicos, realçando também o declínio da qualidade da obtenção e tratamento de amostras, no contexto de infeções pulmonares [21]. Tal culminava numa redução da frequência de resultados microbiológicos conclusivos, no âmbito da pneumonia, em

relação aos resultados obtidos há 70 anos atrás [22]. Atualmente, esta afirmação já não é uma realidade, pois o surgimento e implementação na clínica das técnicas de biologia molecular, em junção com as culturas, serologias e pesquisa do antígeno urinário, permitiu melhorar substancialmente a acuidade diagnóstica [23, 24].

Foi neste panorama de relevância epidemiológica e de novos desenvolvimentos na área do diagnóstico das infecções pneumocócicas que se decidiu trabalhar este tema, por considerarmos que a correta e atempada identificação deste agente pode contribuir positivamente para a melhor utilização de antibióticos e para reduções significativas na mortalidade e morbidade da DIP ao nível mundial.

Ao longo desta revisão vão discutir-se os vários métodos laboratoriais de identificação e caracterização de *Streptococcus pneumoniae*, as suas vantagens e limitações e, posteriormente, a aplicação destes nas estratégias de diagnóstico etiológico das várias infecções pneumocócicas. Entre este grupo de infecções serão abordadas as de maior prevalência, como a rinosinusite aguda e a otite média aguda, mas também as mais graves, de onde se destacam a pneumonia e a meningite. Apesar da sua inegável importância para o tema, não será feita uma alusão particular à bacteriemia oculta, dada a sua abordagem diagnóstica passar pela análise do sangue (hemoculturas), a qual é idêntica à das outras DIPs.

Métodos de Identificação de *Streptococcus pneumoniae*:

A identificação microbiana convencional de *Streptococcus pneumoniae* tem por base a coloração Gram e o seu isolamento em cultura, com posterior análise da morfologia e características fenotípicas das colónias formadas [25].

- Métodos convencionais dependentes de cultura

O método da coloração de Gram é um teste de baixo custo e de fácil realização que pode permitir uma identificação preliminar de pneumococo, dependendo do contexto clínico e do produto colhido no doente, ao serem observados diplococos Gram positivo na amostra [26].

As bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae* são, em geral, fastidiosas, apresentando maior crescimento em meio de gelose sangue incubado a 35-37°C em atmosfera com acréscimo de 5-10% CO₂, podendo também crescer em meio de gelose chocolate [27]. É importante que os meios de cultura contenham 5% de sangue, tais como os referidos anteriormente, pois as diferentes reações hemolíticas (alfa, beta e gama) em meio sólido são utilizadas para classificar e distinguir os vários tipos de estreptococos.

Pneumococo forma colónias pequenas de coloração cinzenta que, ocasionalmente, possuem um aspeto mucoide e apresentam uma zona verde circundante correspondente à alfa-hemólise [27]. Inicialmente estas colónias possuem um aspeto elevado/com relevo, não sendo fácil a sua distinção de colónias de *Streptococcus viridans*, que também apresentam alfa-hemólise [27]. Após 24-48h, as colónias pneumocócicas adquirem um aspeto achatado e com depressão central que lhes é característico e sugestivo da sua identificação que, no entanto, deve ser confirmada através de provas de identificação [27].

- Provas de identificação

Após a análise morfológica, pneumococo pode ser identificado através da realização dos testes da catalase, da suscetibilidade à optoquina, e da solubilidade em bÍlis em simultâneo [27]. No entanto, na prática clínica de rotina, vários laboratórios escolhem

reservar o teste da solubilidade em bÍlis apenas para casos que suscitem dÍvidas e que necessitem de confirmação [27].

A catalase é uma enzima que não é produzida pelos estreptococos e o seu teste consiste em verificar a presença/ausência da sua produção [27]. O teste da catalase é primariamente utilizado para diferenciar entre os vários géneros de cocos Gram-positivo, sendo as bactÍrias do género *Staphylococcus* catalase-positiva e as do género *Streptococcus* e *Enterococcus* catalase-negativa [27]. A suscetibilidade à optoquina permite a identificação presuntiva de um estreptococo alfa-hemolítico como sendo *Streptococcus pneumoniae* [27]. Em caso de um resultado ambÍguo em relação à suscetibilidade à optoquina, a solubilidade em bÍlis distingue também pneumococo de todos os outros estreptococos alfa-hemolíticos, visto os restantes serem insolúveis na bÍlis [27, 28].

A identificação microbiana convencional desta bactÍria não é infalível, existindo vários casos reportados de *Streptococcus pneumoniae* não solúveis em bÍlis ou resistentes à optoquina, e também de outros *Streptococcus* do grupo *Mitis* suscetÍveis à optoquina ou solúveis em bÍlis [29, 30]. Não obstante, estes testes continuam a ser a chave para a identificação fenotÍpica de pneumococo, sendo o teste da solubilidade em bÍlis considerado ainda o método mais eficaz [28, 30, 31].

Os métodos de identificação baseados na cultura possuem várias vantagens como o baixo custo e a alta especificidade, que permitem a sua implementação a nível mundial, mas também a vantagem de fornecerem um isolamento que proporciona a realização de provas/testes adicionais, como o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) e a serotipagem [25, 32]. No entanto, em relação ao isolamento de *Streptococcus pneumoniae*, a cultura apresenta algumas dificuldades que diminuem a sua sensibilidade, como a tendência do pneumococo para autolisar quando atinge a fase de crescimento estacionário, o tratamento antibiótico prévio à colheita de amostras e a própria colheita das amostras [25, 33].

Dada a baixa sensibilidade das culturas em certos contextos, existe a necessidade de identificar *Streptococcus pneumoniae* por outros métodos que lhes sejam

independentes. As principais alternativas à cultura microbiana são os testes de detecção de antigénio e técnicas de biologia molecular como a PCR [33].

- MALDI-TOF

Na última década, a identificação microbiológica foi revolucionada pela introdução da MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight mass spectrometry*) que rapidamente se tornou o método de eleição para a identificação microbiana nos laboratórios mais avançados, tendo mesmo vindo a substituir os métodos fenotípicos convencionais em alguns destes [32, 34, 35]. Este é um método que torna possível a ionização das proteínas, após o tratamento da amostra com uma matriz. Esta matriz absorve energia de um laser, resultando na sua vaporização e ionização. Estes iões possuem uma determinada massa e carga, que irão definir o tempo que estes demoram a alcançar o detetor do instrumento. De acordo com estes parâmetros, o instrumento gera um espectro das proteínas que é comparado com espectros presentes na sua base de dados, permitindo uma identificação do microrganismo analisado [32, 34, 36].

Atualmente o método de identificação microbiana com recurso à espetrometria MALDI-TOF é baseado na cultura seletiva prévia do microrganismo a identificar, da qual é isolada uma colónia e aplicado o tratamento com matriz [32, 34, 37]. As principais vantagens deste método são o facto de este permitir a identificação de praticamente todos os microrganismos patogénicos bacterianos e fúngicos, e a rapidez com que apresenta os seus resultados, que geralmente antecedem os apresentados pelas culturas em mais de 24 horas, possibilitando um início mais precoce de antibioterapia dirigida [36, 37].

O MALDI-TOF pode também ser utilizado, com bons resultados, na identificação rápida de bactérias em hemoculturas positivas, desde que as amostras sejam incubadas em meio sólido por cerca de 5 horas [37]. Por outro lado, de forma a encurtar ainda mais o tempo para a obtenção de resultados, foi estudada a aplicação do MALDI-TOF diretamente sobre hemoculturas positivas, no entanto esta abordagem exige um processamento rigoroso de difícil implementação na prática clínica comum [37, 38].

A distinção entre *Streptococcus pneumoniae* e os restantes estreptococos do grupo *Mitis* apresenta-se, igualmente, como um problema na identificação microbiana com MALDI-TOF. Embora MALDI-TOF seja capaz de identificar corretamente a grande maioria dos isolamentos de *Streptococcus pneumoniae*, o mesmo não se verifica com *Streptococcus mitis/oralis* que, em alguns casos, são incorretamente identificados como pneumococo [32, 39].

Apesar de persistirem alguns erros, os resultados desta identificação têm vindo a melhorar com as atualizações das bases de dados. Esta persistência levou alguns autores a sugerir que o problema se deva ao baixo poder de resolução dos instrumentos que utilizam esta tecnologia [29, 34, 35, 39]. Múltiplas estratégias têm sido propostas de forma a ultrapassar esta dificuldade, como a pesquisa de picos de massa específicos dos *Streptococcus mitis/oralis* ou o uso de algoritmos de análise adicionais. Não obstante, nenhuma destas estratégias tem vindo a ser implementada pelos fabricantes dos instrumentos, visto tratarem-se de técnicas morosas, com alguma dificuldade técnica e ainda sem a eficácia desejada e/ou comprovada que justifique o seu uso rotineiro [35, 39, 40, 41].

- Pesquisa do antigénio urinário

O método indireto de deteção de pneumococo mais utilizado é a pesquisa do antigénio do polissacarídeo C na urina, que é um componente da parede celular comum a todos os serótipos de *Streptococcus pneumoniae* [42]. Este teste, de nome comercial BinaxNOW®, é um teste imunocromatográfico *in vitro* cujo resultado pode ser lido manualmente e interpretado, em aproximadamente 15 minutos, no qual a presença de uma linha de coloração rosa/violeta é indicativa de um teste positivo e a sua ausência é sinónima de um teste negativo [43].

BinaxNOW® é principalmente útil em casos de doentes que tenham sido medicados previamente com antibióticos, revelando boa sensibilidade mesmo após vários dias de antibioterapia, ao contrário do que se verifica nas culturas [44, 45]. Este teste apresenta, aproximadamente, uma sensibilidade de 74% e especificidade de 94% no diagnóstico da pneumonia adquirida na comunidade [42]. Devido à sua alta especificidade, um resultado negativo faz-nos pensar em outras etiologias que não *Streptococcus*

pneumoniae e portanto permite reduzir custos ao ajudar a orientar o diagnóstico etiológico e a seleção da antibioterapia empírica [46]. No entanto, um resultado positivo, não nos permite diagnosticar uma infeção por pneumococo. O teste pode ser falsamente positivo em casos de colonização assintomática do trato respiratório superior, principalmente em crianças, pode também permanecer positivo alguns meses após a infeção, sendo necessário identificar infeções pneumocócicas prévias nos doentes, pode igualmente originar uma reação cruzada com outras bactérias do género *Streptococcus* e, pode ainda resultar em falsos-positivos devido a efeitos das vacinas antipneumocócicas [25, 44, 47, 48].

Apesar de inicialmente concebido como um teste de deteção de antigénio na urina, o BinaxNOW® encontra-se também validado para uso em líquido cefalorraquidiano (LCR), apresentando boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da meningite pneumocócica [49]. Por outro lado, tratando-se de um líquido estéril, a deteção do antigénio pneumocócico no LCR indica infeção e nunca colonização [49]. O teste é também utilizado em amostras de expetoração, líquido pleural, lavado broncoalveolar e até em hemoculturas positivas, apresentando resultados que, apesar de promissores em alguns destes produtos, devem ser interpretados com cautela visto que estes usos não estão validados pelo fabricante [25, 50, 51]. A pesquisa do antigénio pneumocócico, ao não ser infalível e ao não permitir conhecer a suscetibilidade aos antimicrobianos, nunca deve substituir a cultura, mas sim complementá-la na prática clínica comum [47, 51].

Nos últimos anos surgiram novos testes de imunofluorescência para a deteção de antigénio do polissacarídeo C na urina e LCR. Entre eles o mais amplamente utilizado e estudado é o Sofia *Streptococcus pneumoniae* FIA test®, no qual, o resultado é lido automaticamente e apresentado de forma quantitativa e objetiva, em cerca de 10mins, representando uma vantagem em relação ao BinaxNOW®, que é de leitura manual, ao facilitar a interpretação do teste [42, 43, 52]. Este teste, aparentemente, apresenta uma maior sensibilidade e igual especificidade que o BinaxNOW®, podendo, no futuro, provar ser um teste superior para a deteção do antigénio do polissacarídeo C. Contudo, esta afirmação carece de ser comprovada por mais estudos e de maior dimensão [42, 43, 52].

- PCR

As técnicas que têm por base a PCR, ao não requererem o isolamento prévio do microrganismo em cultura, são muitas vezes aplicadas diretamente nas amostras clínicas como a expectoração, o sangue, o líquido pleural e o LCR [29, 53, 54, 55]. A seleção dos genes-alvo é de grande importância, sendo que, idealmente, estes devem ser exclusivos/específicos de *Streptococcus pneumoniae*, estando constantemente presentes em todas as estirpes desta bactéria, ao mesmo tempo que estão ausentes em outros *Streptococcus* do grupo *Mitis* [29].

O grupo *Mitis* é composto por 13 espécies diferentes, entre elas *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pseudopneumoniae*, os quais possuem entre si uma semelhança de sequência superior a 99%, no caso específico do 16S RNA [40, 56]. Isto faz com que a sequenciação do 16S rRNA, que geralmente é considerada o método de referência para a identificação de várias espécies bacterianas, veja a sua utilidade bastante reduzida na identificação dos estreptococos deste grupo [29, 31, 57].

A distinção entre pneumococo e os outros estreptococos *Mitis* é de grande importância para a correta caracterização epidemiológica das doenças pneumocócicas e da prevalência de resistências a antibióticos nas mesmas, uma vez que os restantes estreptococos deste grupo estão frequentemente associados a taxas mais altas de resistência à penicilina e à multiresistência [29, 58].

O método independente de cultura atualmente preconizado pelo CDC é um teste de *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) cujo alvo é o gene *lytA* (*lytA*-CDC). A pesquisa deste gene é recomendada devido a este ser altamente conservado dentro da espécie e codificar um fator de virulência ubíquo e específico de pneumococo. Contudo, genes homólogos de *lytA* foram já detetados em outras espécies estreptocócicas intimamente relacionadas, resultando em erros de identificação [28, 33, 59, 60].

Outros genes para além do *lytA* foram estudados como potenciais alvos para a identificação de *Streptococcus pneumoniae*, entre eles o gene *ply*, o gene *psaA*, o gene

cpsA, os genes *piaA* e *piaB*, e mais recentemente os Spn9802, Spn9828 e SP2020/SPN0001, entre outros [59-61]. Os genes *ply* e *psaA* caíram rapidamente em desuso por demonstrarem menor especificidade na identificação do pneumococo, quando comparados aos restantes [59, 61]. O gene *cpsA*, por outro lado, mostrou alta sensibilidade e especificidade, sendo particularmente útil na distinção entre *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pseudopneumoniae* [61]. Os genes *piaA* e *piaB*, apesar de não serem ubíquos em pneumococo, ao estarem ausentes em algumas estirpes não capsuladas, são altamente específicos do mesmo e aumentam a especificidade da PCR se os genes *piaA* ou *piaB* forem pesquisados juntamente com *lytA* [60, 61]. SP2020, também denominado de SPN0001, é outro alvo que inicialmente foi descrito como sendo único e característico de *Streptococcus pneumoniae*, mas que acabou por ser identificado em outras espécies estreptocócicas não pneumocócicas [59, 62]. Não obstante, apresenta grande sensibilidade e especificidade para a identificação de pneumococo e, quando pesquisado juntamente com *lytA* parece não resultar em erros de identificação [59].

Isoladamente, nenhum dos genes alvo acima referidos tem a capacidade de distinguir corretamente *Streptococcus pneumoniae* de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus pseudopneumoniae* [29, 61]. Como tal, diferentes estudos recomendam a pesquisa de vários genes em combinação, de forma a serem obtidos resultados mais fiáveis [29, 61]. Atualmente o CDC ainda só recomenda a realização da RT-PCR visando a pesquisa de *lytA*, pelo que serão necessários realizar mais estudos, e possivelmente pesquisar novos alvos mais específicos, antes de poderem ser tiradas conclusões sobre a superioridade de um alvo em relação a outro.

O uso da PCR é particularmente útil em amostras que resultaram em culturas negativas, aumentando consideravelmente a sensibilidade do diagnóstico etiológico das infeções pneumocócicas [63, 64]. No entanto, a PCR, para além da já referida reatividade cruzada com outros estreptococos do grupo *Mitis*, apresenta igualmente dificuldade em distinguir entre colonização e infeção pneumocócica, daí que os seus resultados devam ser sempre analisados de acordo com o enquadramento clínico [61, 63].

- Métodos de sequenciação

A troca de informação genética entre os estreptococos do grupo *Mitis* é uma das razões pela qual a sua correta identificação, ao nível da espécie, é tão problemática [29]. As abordagens de sequenciação de múltiplos *loci*, como o *Multilocus Sequence Typing* (MLST), tentam ultrapassar esta dificuldade, focando-se na sequenciação dos genes *housekeeping* (que desempenham funções metabólicas, entre outros) de *Streptococcus pneumoniae*, dados estes serem considerados mais estáveis e de menor propensão à recombinação génica, em relação aos restantes [29, 65]. Esta técnica tem por base a amplificação dos *loci* de interesse por PCR, que são posteriormente sequenciados e cuja análise dos perfis alélicos é feita com recurso à base de dados PubMLST [29].

Apesar de a técnica MLST ser principalmente utilizada na genotipagem de *Streptococcus pneumoniae*, para estudos epidemiológicos e vigilância em surtos, sendo considerada o método de eleição para tal, esta também pode ser utilizada na sua identificação, com o intuito de distinguir pneumococo dos restantes estreptococos do grupo *Mitis* [65, 66]. O esquema de MLST para pneumococo, ao sequenciar 7 *loci* de *housekeeping* considerados específicos desta bactéria (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* e *ddl*), tem a capacidade de, com elevado nível de confiança, incluir ou excluir uma bactéria como sendo *Streptococcus pneumoniae* [29, 66].

Ao basear-se na PCR, MLST possui a vantagem de poder ser aplicada diretamente nas amostras clínicas, como o LCR, não necessitando de isolamento prévio em cultura [29]. Outras vantagens da sequenciação por MLST incluem a alta reprodutibilidade dos resultados e o elevado poder de discriminação da técnica [65, 67]. No entanto, esta abordagem apresenta várias limitações que travam a sua implementação na prática clínica comum, como a necessidade de equipamento e pessoal especializado, o alto nível de exigência técnica, o tempo de obtenção desses resultados, e ainda o elevado custo deste método de identificação microbiana [53, 65, 66]. Tudo isto, juntamente com o facto de que a técnica MLST só pode ser utilizada para diferenciar entre organismos filogeneticamente próximos, dada a enorme variabilidade do conteúdo genómico das diferentes bactérias, faz com que esteja reservada apenas para casos selecionados [53, 68].

Os recentes avanços nas tecnologias de sequenciação total do genoma (WGS) e a sua crescente disponibilização, em grande escala, criaram novas possibilidades de identificação microbiológica [66]. Através da sequenciação de nova-geração (NGS), a versatilidade da MLST tem vindo a ser expandida com recurso a diferentes marcadores moleculares como as proteínas ribossómicas (rMLST) e sequências polimórficas repetidas (MLVA), entre outros. Estas novas técnicas que têm por base a NGS, ao possuírem um maior grau de discriminação, permitem uma melhor vigilância epidemiológica em surtos, em relação com a MLST convencional [27, 66, 67, 69]. Com a contínua diminuição dos custos de sequenciação e com a devida uniformização, num futuro próximo, estas tecnologias poderão vir a integrar a prática clínica laboratorial [67].

- Serotipagem

A cápsula polissacarídica representa o principal fator de virulência de *Streptococcus pneumoniae* [70]. A identificação do tipo de cápsula, denominada serotipagem, representa uma etapa importante na identificação e caracterização de pneumococo. A reação de Quellung é o método de eleição para realizar a serotipagem, sendo capaz de identificar 92 serótipos diferentes [70]. Esta consiste numa reação de imunoprecipitação, que apenas testa um serótipo capsular de cada vez, o que torna a sua realização um processo demorado e de custo considerável [70]. Dadas estas limitações, e visto o serótipo capsular não alterar significativamente a resposta clínica do doente ao tratamento, a realização da serotipagem encontra-se limitada a laboratórios de referência e de investigação [29, 70]. No entanto, apesar de não ser realizada na prática clínica de rotina, a determinação dos serótipos capsulares é um componente essencial e de extrema importância na vigilância epidemiológica das infeções pneumocócicas [70]. Ao dar a conhecer a distribuição dos serótipos causadores de DIP, a serotipagem contribui para a atualização da composição das novas vacinas antipneumocócicas [27, 71].

Nem todos os tipos de *Streptococcus pneumoniae* são distinguidos através da reação de Quellung, como são exemplo os serótipos 6A e 6C que apenas são identificados com o uso da PCR [65]. Algumas estirpes de pneumococo escapam também à reação de

Quellung e a outras técnicas de serotipagem como a PCR pois, ao não possuírem cápsula, não podem ser serotipadas, sendo denominadas de pneumococos não serotipáveis/não encapsulados [65]. A genotipagem/tipagem molecular ultrapassa estas dificuldades da serotipagem e, em simultâneo, caracteriza as bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae* com maior detalhe, possuindo, portanto, grande utilidade na vigilância epidemiológica de surtos [65]. No entanto, a genotipagem estende-se para além do âmbito deste trabalho e não será abordada com maior detalhe.

- Teste de suscetibilidade antimicrobiana

As infeções pneumocócicas graves, como a pneumonia ou a meningite, exigem antibioterapia imediata. Para a seleção da terapêutica antibiótica apropriada é importante uma identificação rápida e fiável do agente patogénico, juntamente com uma interpretação correta dos resultados do TSA [60]. Os métodos convencionais de deteção de resistências bacterianas, como a difusão em agar com discos, a microdiluição em caldo e os métodos automatizados, são largamente utilizados e padronizados para a prática clínica laboratorial de rotina. No entanto, ao requerem crescimento bacteriano em cultura, demoram a produzir resultados [72]. Como tal, o tratamento antibiótico tem de ser, muitas vezes, administrado empiricamente, tendo em consideração os agentes patogénicos mais prevalentes e a as suas taxas de resistência a nível local [73].

Os antibióticos mais utilizados no tratamento das infeções por *Streptococcus pneumoniae* são os beta-lactâmicos, os macrólidos e as quinolonas. Em Portugal, pneumococo revela uma baixa e estável taxa de resistência às penicilinas, ao resto dos beta-lactâmicos e, também às fluoroquinolonas, contrastando com a elevada e crescente prevalência de resistências aos macrólidos [73, 74].

Os beta-lactâmicos inibem a síntese da parede celular bacteriana através da sua ligação às *penicillin-binding proteins* (PBPs). Existem 6 tipos de PBPs, as PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b, PBP2x e PBP3. Em *Streptococcus pneumoniae* a resistência aos beta-lactâmicos parece estar maioritariamente associada a mutações nos genes que codificam as PBP1a, PBP2b e PBP2x, impedindo a sua ligação a estes alvos. Contudo, esta resistência é na grande maioria equivalente a uma não suscetibilidade às penicilinas, podendo ser ultrapassada com um aumento da dose administrada, sem qualquer impacto clínico

negativo para os doentes, isto no caso da PAC [75, 76]. Na meningite pneumocócica, por outro lado, a resistência às penicilinas condiciona a escolha do antibiótico, devendo optar-se por penicilina/amoxicilina caso haja suscetibilidade às mesmas (MIC <0.1 µg/mL) ou por uma cefalosporina de terceira geração caso seja verificada resistências às penicilinas (MIC >0.1 µg/mL) [77].

Os macrólidos ligam-se reversivelmente ao 23S rRNA, de forma a inibir a síntese proteica dependente de RNA [75]. A resistência a macrólidos de *Streptococcus pneumoniae* pode ocorrer por metilação do alvo ribossómico dos macrólidos, codificado pelo gene *ermB*, ou por uma bomba de efluxo, codificada pelo gene *mefA*. O primeiro mecanismo é responsável pelo fenótipo MLS_B que está associado a MICs bastante elevadas para macrólidos (MIC > 64mg/L) e a resistência cruzada a macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B. O mecanismo da bomba de efluxo dá origem ao fenótipo M, que confere resistência moderada (MICs entre 1-32 mg/L) apenas aos macrólidos de 14 e 15 átomos (eritromicina, claritromicina e azitromicina), sendo portanto suscetível aos macrólidos de 16 átomos, às lincosamidas e à estreptogramina B [76, 78, 79]. A metilação do alvo ribossómico é o mecanismo de resistência a macrólidos, em *Streptococcus pneumoniae*, mais comum a nível mundial e na maioria dos países europeus, incluindo Portugal. Em contraste, nos EUA e no Reino Unido, a resistência por bomba de efluxo apresenta-se como o mecanismo mais prevalente [75, 78, 79].

O papel da PCR no TSA tem vindo a ser alvo de estudos, dado ter a capacidade de detetar os genes que conferem resistência a vários antibióticos e apresentar resultados em poucas horas [72, 80]. A título de exemplo, a deteção por PCR de PBPs *wild-type* (sem mutação) poderá ser indicadora de suscetibilidade aos beta-lactâmicos em *Streptococcus pneumoniae* [57]. No entanto, é de salientar que a presença de um gene de resistência não significa que haja sempre expressão fenotípica dessa resistência. Como tal, a PCR não se propõe a substituir os métodos convencionais de TSA mas propõe-se sim a complementá-los, pois apenas tem o potencial de prever as possíveis suscetibilidades e resistências a antimicrobianos [72, 81].

Com apenas um teste, a WGS procura prever a suscetibilidade de um microrganismo a todos os antibióticos, através da análise da sua informação genética. Contudo, tal como

na PCR, a relação entre resistência fenotípica e genotípica é complexa e ainda não compreendida na sua totalidade. Esta tecnologia carece ainda de estudos adicionais, pois a maioria deles concentra-se na descoberta de novos mecanismos de resistência e não na predição da resistência fenotípica através dos dados da sequenciação total do genoma. Considerando o anteriormente exposto, a falta de protocolos e de bases de dados uniformizados, esta tecnologia apenas representa uma possibilidade futura e ainda não tem aplicação na prática clínica de rotina [81].

Rinossinusite Aguda Bacteriana:

- Definição

A rinossinusite é uma doença inflamatória da mucosa nasal e dos seios perinasais, podendo ser classificada em aguda (<4 semanas) ou crónica (>12 semanas), consoante a duração da sua sintomatologia [82]. O diagnóstico é essencialmente clínico, perante queixas de rinorreia, obstrução nasal, voz nasalada e dor maxilar ou facial [83].

- Etiologia e epidemiologia

A maior parte dos casos de Rinossinusite Aguda (RSA) tem etiologia viral, tendo a restante minoria uma etiologia bacteriana. Contudo, esta doença infecciosa constitui a 5ª causa mais frequente de prescrição antibiótica, sendo estes receitados em 75% dos casos [83, 84]. Os principais agentes bacterianos na RSA são: *Streptococcus pneumoniae* (20%-45%), *Haemophilus influenzae* (20%-43%), *Moraxella catarrhalis* (14%-28%) e *Staphylococcus aureus* (8%-11%) [85]. Uma etiologia bacteriana deve ser suspeitada na presença de rinorreia purulenta acompanhada de dor facial que persista durante 10 dias ou que piore dentro do prazo de 10 dias após uma melhoria inicial [86].

Na Rinossinusite Crónica (RSC), por outro lado, vários estudos tentaram identificar uma relação causal com diversas bactérias, entre elas *Streptococcus pneumoniae*, sem resultados conclusivos, à exceção de *Staphylococcus aureus* que demonstrou uma associação positiva com RSC. Com o advento das técnicas de biologia molecular, ganhou força a teoria de que esta poderá ser uma doença multifatorial, na qual a desregulação da microbiota desempenha um papel central [87].

Visto *Streptococcus pneumoniae* não ser um agente etiológico relevante na RSC, neste trabalho será desenvolvida apenas a RSA e os seus métodos de diagnóstico etiológico. No entanto, perante uma inexistência de literatura específica sobre a identificação de *Streptococcus pneumoniae* na RSA, será apresentada apenas uma abordagem geral do seu diagnóstico bacteriológico.

A história natural da RSA é bastante favorável, sendo que cerca de 85% dos doentes experiencia uma resolução completa do quadro em 7 a 15 dias, sem necessitar de

antibioterapia [85]. Uma revisão sistemática sobre o papel da antibioterapia na RSA concluiu que não existia lugar para ela na RSA não complicada, em adultos, uma vez que os riscos superavam o pouco benefício observado [88]. Tal vai ao encontro das recomendações das mais recentes *guidelines* europeias, que preconizam uma atitude expectante e de tratamento sintomático nos casos de RSA ligeira a moderada [89].

Ao contrário do que é habitual na clínica das restantes infeções bacterianas, o diagnóstico de RSA bacteriana não implica a administração de antibioterapia empírica, estando esta reservada apenas para complicações que, apesar de raras, podem ser graves devido ao risco de invasão da órbita ou do Sistema Nervoso Central [84]. No entanto, como já referido, 75% dos casos de RSA ainda são medicados empiricamente com antibióticos [83], demonstrando uma incoerência entre as recomendações e a prática clínica, que pode ter consequências no diagnóstico etiológico.

- Diagnóstico etiológico

Atualmente, o diagnóstico etiológico não está preconizado na RSA bacteriana não complicada, sendo uma das razões o facto de não influenciar o tratamento. O exame bacteriológico cultural do conteúdo dos seios perinasais deve ser considerado apenas em certos casos, tais como presença de complicações da rinosinusite, resistência à antibioterapia ou suspeita de um agente etiológico incomum (doentes imunocomprometidos) [84].

- Métodos de cultura

Os seios maxilar e etmoidal são os mais afetados na rinosinusite [90], daí que o método de referência para o diagnóstico de RSA bacteriana seja a punção do seio maxilar, que é o único passível de ser puncionado, com aspiração de material para cultura. Este procedimento é invasivo, com riscos e dor associados, e só deve ser realizado por pessoal especializado, nomeadamente otorrinolaringologistas, encontrando-se fora do alcance da maior parte dos clínicos [84].

As possíveis complicações da punção do seio maxilar são lesão ocular, infeção do local de punção, lesão dos tecidos moles e/ou enfisema subcutâneo da região malar, hemorragia, e lesão do canal lacrimal. Todavia, estas são raras e estão maioritariamente

ligadas à inexperiência do médico, ocorrendo em apenas 4% dos casos [90]. Outras limitações deste método de diagnóstico prendem-se com o facto de apenas ser puncionado o seio maxilar, o qual pode não ser a origem da infeção, pelo que pode enviesar erroneamente os resultados da cultura [91].

Outros métodos de cultura foram propostos como alternativa à punção do seio maxilar, tais como a drenagem do meato médio por via endoscópica e a cultura de zaragatoa nasofaríngea.

Ao analisar a correlação entre os resultados das culturas das secreções obtidas por zaragatoa nasofaríngea e por drenagem endoscópica do meato médio, com os resultados obtidos na punção do seio maxilar, um estudo concluiu que esta era superior na segunda. As culturas da nasofaringe apresentaram maior taxa de falsos positivos, provavelmente devido a contaminação no vestibulo nasal [92].

A endoscopia nasal com drenagem do meato médio é vista como a melhor alternativa à punção do seio maxilar, por ser minimamente invasiva e apresentar uma concordância de resultados de 76,3% a 87% (dependendo das bactérias consideradas), com os observados na punção [91]. No entanto, sofre da mesma limitação, porque a endoscopia nasal é realizada apenas por otorrinolaringologistas. De forma a ultrapassar esta dificuldade, propôs-se que a colheita da amostra fosse feita por observação direta do meato médio por rinoscopia anterior, com recurso a zaragatoa, manobra fácil e passível de ser executada por qualquer médico. A sensibilidade deste método revelou ser inferior à da colheita de amostra por endoscopia nasal mas superior à da cultura de zaragatoa nasofaríngea, tendo sido recomendado num ambiente de cuidados primários onde haja a impossibilidade de realizar os métodos invasivos mais sensíveis [92].

O meato médio é o local de drenagem dos seios etmoidal, frontal e maxilar, sendo que os resultados da colheita e cultura de amostras deste local pode, em teoria, retratar com maior fiabilidade o agente etiológico da RSA ao não se cingir apenas ao seio maxilar [91]. Uma meta-análise de 2006 refere que efetivamente a drenagem do meato médio por via endoscópica é mais sensível que a punção do seio maxilar. Todavia, outra meta-análise de 2015 relata o oposto, afirmando que a maior sensibilidade metodológica se alcança com a punção [93].

É de ressaltar que existem poucos estudos recentes sobre o diagnóstico etiológico da RSA, a dimensão amostral é reduzida e, por isso, não nos foi possível inferir, com rigor, sobre a superioridade ou inferioridade de um método de colheita e cultura em relação a outro, havendo a necessidade de realização de estudos adicionais.

Transversais a todos estes métodos estão as limitações das culturas, que podem ser falsamente negativas devido ao uso empírico de antibioterapia, ao transporte, armazenamento e manuseamento impróprio das amostras, ou devido à presença de microrganismos fastidiosos que são dificilmente cultivados [94].

- Técnicas de biologia molecular

Dadas as limitações, impraticabilidade e baixa sensibilidade dos métodos culturais, as técnicas de biologia molecular como a PCR e as técnicas de *next-generation sequencing* (NGS) vieram ganhar destaque nos últimos anos. Estas técnicas apresentam sensibilidades superiores às reportadas na punção do seio maxilar, não são afetadas por administração de antibioterapia prévia e, apesar de a PCR não ter a capacidade de distinguir entre colonização e infeção, a sua combinação com a NGS permite uma análise quantitativa e qualitativa dos microrganismos que, apesar de carecer de mais estudos, aparenta permitir essa distinção [95, 96].

As técnicas de biologia molecular têm vindo a ser utilizadas no estudo da RSC e da sua microbiota, não se encontrando bem estudadas no contexto da RSA devido ao diagnóstico etiológico não estar preconizado na RSA não complicada. Como tal, serão necessários mais estudos, e com maior dimensão de amostras, sobre os métodos de diagnóstico etiológico na RSA para documentar as suas sensibilidades, especificidades e, em geral, a superioridade de um método em relação a outro, na questão de um possível isolamento e valorização de *Streptococcus pneumoniae*.

Otite Média Aguda:

- Definição

A OMA é uma infecção purulenta do ouvido médio que afeta mais frequentemente crianças abaixo dos 2 anos de idade, sendo característico o início abrupto da sintomatologia. A apresentação clínica de otalgia, otorreia (em caso de rotura espontânea da membrana timpânica), febre, letargia, vômitos e anorexia é comum mas inespecífica, podendo ser confundida com outras infecções do trato respiratório, não permitindo o diagnóstico [97, 98]. Alterações *de novo* na membrana timpânica como eritema, sinais inflamatórios e abaulamento da mesma, mas também a presença de líquido purulento no ouvido médio ou de otorreia no canal auditivo não secundária a otite externa, são sinais característicos da OMA e quando associados a um quadro clínico típico, são altamente sugestivos deste diagnóstico [99, 100].

- Etiologia e epidemiologia

Anualmente existem mais de 700 milhões de casos de otite média, sendo a faixa etária dos 6-24 meses de idade a mais afetada [101, 102]. Como tal, a otite média é a principal razão de vinda ao serviço de urgência (SU) pediátrico e de prescrição de antibióticos a nível mundial, constituindo um problema *major* de saúde pública, de grande impacto socioeconómico [103].

Esta doença engloba um grupo heterógeno de entidades inflamatórias do ouvido médio, entre elas a otite média aguda (OMA), a otite média com derrame (OME) e a otite média crónica supurativa (OMCS), podendo qualquer uma delas condicionar graves perdas auditivas, que impactam negativamente o desenvolvimento e aprendizagem destas crianças [104]. Independentemente da sua apresentação clínica, a otite média constitui uma doença multifatorial e complexa, na qual os agentes bacterianos e virais, individualmente ou em associação, estão fortemente implicados [103]. Entre os agentes etiológicos virais mais comuns destacam-se os vírus *influenza*, rinovírus, adenovírus e vírus sincicial respiratório (VSR), sendo que as bactérias mais frequentemente associadas à otite média são *Streptococcus pneumoniae* (27,8%), *Haemophilus influenzae* (23,1%) e *Moraxella catarrhalis* (7%), todas potenciais colonizadores da

nasofaringe [101-103]. *Streptococcus pyogenes*, apesar de menos comum e normalmente encontrado em grupos etários mais velhos, é também um agente etiológico de relevo na OMA, dado estar associado a quadros mais graves da doença e a maiores taxas de complicações da mesma [97].

As complicações das otites médias podem dividir-se em extracranianas e intracranianas, sendo o seu diagnóstico clínico e imagiológico (habitualmente por TAC). Estas geralmente manifestam-se clinicamente de forma semelhante às otites não complicadas, por vezes apresentando também outros sintomas como vertigens, paralisia facial e/ou outras alterações neurológicas [105]. Entre as complicações extracranianas distinguem-se a mastoidite aguda, a labirintite e a paralisia facial periférica, sendo a mastoidite a mais comum e mais frequentemente associada à OMA. Quanto às complicações intracranianas, estas são relativamente mais raras e podem ser de cariz infeccioso, nas quais se incluem infeções do SNC como a meningite, empiema e/ou abscessos cerebrais, ou de cariz trombótico, como é o caso da tromboflebite do seio lateral [105]. As complicações intracranianas são acompanhadas de um maior grau de morbidade e mortalidade, sendo a meningite a mais frequente destas complicações. Não obstante, toda e qualquer complicação de uma otite média implica um grande grau de morbidade e até de mortalidade se não tratada atempadamente, exigindo internamento hospitalar e antibioterapia [105].

Cerca de 81% dos casos de OMA, em crianças, resolve-se espontaneamente sem necessidade de antibioterapia, sendo que a taxa de resolução dos casos tratados com antibióticos ronda os 93% [99]. Regra geral, a antibioterapia na OMA não apresenta um perfil risco/benefício favorável na maior parte dos casos, apenas demonstrando uma ligeira superioridade, em relação ao placebo, na redução da intensidade das otalgias após as 24h, e na redução da incidência de perfurações timpânicas e de otites contralaterais [99]. Assim sendo, as *guidelines* atuais preconizam uma estratégia de vigilância sem medicar, durante as primeiras 48-72h após o diagnóstico, com o objetivo de reduzir os custos e evitar os efeitos adversos e a propagação de estirpes resistentes inerentes à antibioterapia [106]. Não obstante, a OMA é ainda responsável por cerca de 25% dos casos de prescrição de antibióticos na prática clínica [106]. A decisão de não medicar e manter sob vigilância deve ser avaliada caso a caso, e só deverá ser tomada

em crianças que cumpram os critérios de idade igual ou superior a 2 anos, com OMA unilateral de gravidade ligeira a moderada ou com OMA bilateral ligeira [106].

É inegável o impacto da OMA sobre a qualidade de vida da população mais jovem e das suas famílias, uma vez que acarreta um impacto económico considerável devido à sua elevada prevalência [107]. E, apesar da maioria dos episódios iniciais de OMA não ser grave, episódios subsequentes possuem um maior risco de complicações [108]. Como tal, a prevenção de recorrências mas também de novos casos de OMA é atualmente uma das principais prioridades da Pediatria [107, 108]. No entanto, esta infeção representa um grande desafio do ponto de vista da vacinação devido à enorme diversidade de microrganismos que podem causar OMA, e além disso esta doença afeta maioritariamente os grupos etários mais jovens, cuja imaturidade relativa do sistema imunitário deve ser tida em consideração aquando da elaboração de vacinas [97].

Epidemiologicamente, a OMA é frequentemente precedida por uma infeção viral das vias aéreas superiores, sendo este um passo importante na sua patogénese. Praticamente todos os vírus do trato respiratório alto podem predispor à otite média bacteriana secundária, apesar do nível de propensão para a otite variar entre os diferentes vírus [101]. Os mecanismos por detrás desta predisposição estão geralmente associados a uma supressão da resposta imunitária por parte do hospedeiro, mas fatores bacterianos diversos desempenham também um papel importante. Outras alterações do hospedeiro, auxiliadas por uma potencial co-colonização nasofaríngea de outros agentes bacterianos como *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* podem modular e influenciar a transição da colonização pneumocócica para um estadio sintomático de doença [101]. Como tal, a vacinação anual contra o vírus *Influenza* é recomendada pela *American Academy of Family Physicians* e pela *American Academy of Pediatrics* para todas as crianças com idade > 6 meses, resultando numa redução absoluta de 4% dos casos de OMA, e de 30% a 55% dos casos de OMA no inverno (época das infeções respiratórias) [99, 100]. Em Portugal, por outro lado, a vacinação anual contra a gripe só se encontra recomendada para certos grupos prioritários, entre eles, as crianças com idade > 6 meses que possuam doenças crónicas ou que sejam imunodeprimidas [109].

Existe uma relação temporal clara entre a colonização bacteriana da nasofaringe e o risco de vir a desenvolver OMA. A colonização precoce por *Streptococcus pneumoniae* está associada a maiores taxas de colonização por outros agentes bacterianos e a maior frequência de infecções respiratórias nestas crianças [110]. Tal sugere que uma infecção pneumocócica inicial possa então criar uma predisposição a otites médias mais complexas e de maior gravidade. Por conseguinte, a prevenção da OMA passa por prevenir, também, a colonização nasofaríngea infantil por pneumococo, através das PCVs [110]. Diferenças significativas entre a microbiota das crianças vacinadas com a PCV7 e os das crianças não vacinadas foram notadas em alguns estudos, sugerindo que a vacinação antipneumocócica possa, potencialmente, apresentar outros benefícios para além da proteção imediata contra a OMA, pois ao alterar os padrões de colonização nasofaríngea estará a, subseqüentemente, diminuir o risco de futuras recorrências, sequelas e/ou complicações da OMA [110].

Ao possuir uma longa lista de possíveis agentes etiológicos e em virtude do diagnóstico microbiológico da OMA não se realizar por rotina, torna-se difícil quantificar o impacto exato da vacinação antipneumocócica sobre a OMA [110]. O impacto das PCV na OMA pneumocócica, apesar de menor em relação ao seu efeito nas DIP, é bastante satisfatório, resultando numa redução de 10-26% de recorrências e num decréscimo de 24-32% no número de casos graves e/ou com complicações [101]. Com a introdução da PCV7, ao nível mundial, registou-se uma diminuição da incidência da OMA de todas as causas na ordem dos 0-7% dependendo da região [101, 111]. Tal deve-se ao facto de que, apesar de ter sido verificada uma real redução das otites médias pneumocócicas, esta fez-se acompanhar de um aumento concomitante de infecções pneumocócicas de serótipos não abrangidos pela vacina mas também de infecções por outros agentes etiológicos, resultando apenas em uma ligeira modificação da incidência da OMA [101, 110]. Por outro lado, a introdução da PCV13 nos planos de vacinação de vários países, resultou numa diminuição de 24-68% da OMA de todas as causas, em áreas com elevadas taxas de colonização e doença pneumocócica, o que sugere uma eficácia acrescida desta vacina nestas áreas, em parte devido ao efeito de imunidade de grupo [101].

- Diagnóstico etiológico

Não existe um método de referência para o diagnóstico da OMA, sendo este maioritariamente clínico e baseado na otoscopia, podendo ser complementado através da avaliação funcional da membrana timpânica, que melhor esclarece quanto à afeção do ouvido médio [99, 100]. A realização da otoscopia e/ou timpanometria requer material específico que nem sempre está disponível e, no caso concreto da otoscopia, depende da experiência/prática do clínico, o que lhe confere algum carácter de subjetividade. Sendo assim, torna-se difícil estudar esta infeção, existindo ainda muitas dúvidas quanto ao seu diagnóstico e tratamento [97].

Streptococcus pneumoniae constitui o agente bacteriano mais comum na OMA, mas é também uma bactéria de interesse em outros tipos de otite média, constituindo a principal causa de infeções recorrentes e de complicações pós-infeciosas [101]. As crianças com OMA pneumocócica geralmente apresentam febre mais alta e sinais inflamatórios locais mais exuberantes em relação às outras etiologias bacterianas, excetuando talvez a OMA causada por *Streptococcus pyogenes*, a qual se caracteriza por um quadro clínico de ainda maior exuberância e que será abordada posteriormente neste trabalho. Por outro lado, uma OMA que se manifeste bilateralmente, também com sintomas oculares, num doente que já tenha sido tratado previamente com antibióticos, é mais sugestiva de *Haemophilus influenzae* [103]. Contudo, estes quadros clínicos são apenas sugestivos e não permitem inferir, com certeza, quanto à etiologia específica da doença, sendo necessário, para tal, a colheita de amostras de líquido purulento proveniente do local de infeção (ouvido médio) e a sua posterior análise microbiológica [99].

- Métodos de cultura
 - Exsudado do ouvido médio

A colheita de amostras de líquido do ouvido médio coloca vários desafios. Na maioria dos casos, este líquido encontra-se inacessível, por detrás da membrana timpânica, sendo necessário recorrer a procedimentos invasivos como a timpanocentese, para obter uma amostra para análise [99]. Previamente à realização desta técnica, e de forma a minimizar a possibilidade de contaminação da amostra, quaisquer exsudados presentes no canal auditivo externo devem ser removidos, possibilitando assim uma

interpretação mais fidedigna dos resultados da sua análise microbiológica [112]. Tratando-se a timpanocentese de uma técnica invasiva e dolorosa, apenas realizada por otorrinolaringologistas, esta não é recomendada por rotina, por motivos éticos e de impraticabilidade da sua realização ao nível dos cuidados de saúde primários, estando normalmente reservada apenas para casos em que se verifique falência terapêutica ou a presença de complicações graves da OMA [108, 113, 114]. Casos em que os sinais clínicos e otoscópicos de OMA persistam após 48-72h, ou recorram num curto período de tempo após a realização de um ou mais ciclos completos de antibioterapia, ou casos em que surjam complicações intracranianas durante o curso do tratamento, devem ser considerados como exemplos de falência terapêutica, devendo então ser equacionada a colheita de uma amostra para análise microbiológica [100, 115]. Além de permitir identificar o agente etiológico responsável e realizar o TSA, de forma a dirigir o tratamento, a timpanocentese é também, nestes casos, um ato terapêutico, pois a drenagem do líquido permite aliviar a pressão no ouvido médio, diminuindo a intensidade das queixas álgicas [99, 116].

Ao perfurar a membrana timpânica durante a timpanocentese, existe a preocupação de que esta não cicatrize totalmente, principalmente nos casos de OMA dado o processo inflamatório subjacente. Esta preocupação é substanciada em resultados de estudos em modelos animais, nos quais foi constatado um atraso na cicatrização da membrana timpânica [116]. No entanto, vários estudos em humanos, nos quais os doentes foram submetidos a dupla timpanocentese, (sendo a primeira diagnóstica e a segunda de controlo) mostraram que em 90% dos casos a perfuração da timpanostomia encerrava por completo em 4-6 dias, independentemente da etiologia da otite, da idade do doente, ou da existência de história prévia de OMA [116]. Foi também demonstrado, no mesmo estudo, que a realização de duas timpanocenteses consecutivas estava associada a taxas de cicatrização igualmente satisfatórias, não tendo sido documentado qualquer aumento de risco de falha na cicatrização da membrana timpânica [116]. A falta de influência da etiologia ou do grau do processo inflamatório na cicatrização da membrana timpânica deve-se, provavelmente, ao facto da inflamação ocorrer principalmente ao nível da lâmina própria da membrana timpânica, ao passo que a cicatrização envolve essencialmente a camada epitelial da mesma [116].

➤ Exsudado da nasofaringe

Visto a colonização nasofaríngea, muitas vezes, anteceder a otite média, em casos de impossibilidade de colheita de amostras de líquido proveniente do ouvido médio, recomendou-se o recurso ao estudo microbiológico da nasofaringe, de forma a obter alguma informação quanto ao agente etiológico mais provável e o seu TSA [104]. Esta prática, no entanto, não é de todo consensual, existindo grande discórdia entre autores quanto à sua utilidade clínica. A cultura nasofaríngea possui várias limitações, que dificultam a sua interpretação, particularmente em crianças (grupo etário na qual a grande maioria dos casos de OMA ocorre, e no qual as taxas de colonização pneumocócica nasofaríngeas são altas), pois não permite distinguir entre colonização assintomática e doença, podendo a nasofaringe de um indivíduo estar colonizada por mais que um agente em simultâneo, sendo difícil identificar, com elevado grau de confiança, qual deles o causador de doença [117].

Estudos que relacionaram os resultados de culturas nasofaríngeas, em crianças com OMA, com os resultados das culturas do líquido do ouvido médio das mesmas crianças, demonstraram valores preditivos negativos altos no que concerne a cultura nasofaríngea, não obstante, também foram registados valores preditivos positivos baixos e altamente variantes entre os agentes bacterianos mais comuns (VPP de 22-44% para pneumococo, 50-71% para *Haemophilus influenzae* e 17-19% para *Moraxella catarrhalis*) [100]. Estes resultados não permitem afirmar, com confiança, o racional de que as culturas nasofaríngeas são um substituto viável à cultura de uma amostra proveniente do local de infeção, no caso da OMA [117, 118]. Como tal, e apesar de ser defendida por alguns autores, dada a enorme dificuldade de interpretação dos seus resultados, devida às limitações previamente enunciadas, a cultura nasofaríngea não desempenha um papel no diagnóstico etiológico da OMA. Por outro lado, as culturas nasofaríngeas não são completamente isentas de utilidade em relação às otites médias, desempenhando um papel na vigilância epidemiológica das mesmas, ao oferecer uma boa alternativa para monitorizar a incidência de estirpes resistentes a antibióticos e a incidência dos diferentes serótipos de pneumococo após a implementação das PCV, de forma a melhor avaliar o seu efeito [113, 117].

➤ Otite média aguda com perfuração da membrana do tímpano

Cerca de 7% dos casos de OMA são acompanhados de perfuração espontânea da membrana timpânica [113]. Tipicamente, esta perfuração é de pequenas dimensões e está situada no quadrante ântero-inferior da *pars tensa* da membrana, apresentando resolução espontânea num período de poucos dias e sem complicações, sendo portanto apenas classificada como uma complicação ligeira da OMA [106]. Nestes casos, pode ser colhida uma amostra de material biológico proveniente do ouvido médio, sem necessidade de realização de timpanocentese. No entanto, existe um risco acrescido de contaminação destas amostras por microrganismos comensais do canal auditivo externo [104, 113].

Regra geral, apenas os resultados que indiquem *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ou *Streptococcus pyogenes* como organismos causadores da doença são valorizados, em casos de perfuração timpânica espontânea. Por outro lado, resultados que correspondam a organismos como *Pseudomonas aeruginosa* ou mesmo a *Staphylococcus aureus* são de maior dificuldade de interpretação, visto estes serem comensais do ouvido externo e agentes frequentes de otite externa, e não pertencerem ao grupo de agentes etiológicos comuns de OMA [113]. Alguns estudos sugerem ainda que a OMA complicada com perfuração espontânea da membrana timpânica seja uma entidade nosológica distinta da OMA sem esta complicação [108]. Dados desses estudos parecem sugerir que pelo menos alguns dos casos de perfuração espontânea da membrana timpânica estejam ligados a agentes etiológicos específicos, nomeadamente *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* [108]. Não obstante, tais estudos apresentam várias limitações que não nos permitem avaliar, com elevado grau de certeza, a verdadeira importância de pneumococo como uma causa direta desta perfuração [108].

○ PCR

A maior parte do nosso conhecimento da otite média e da sua etiologia provém de estudos cujos resultados se basearam, acima de tudo, em métodos culturais de identificação bacteriana [104]. Estudos recentes têm vindo a explorar a utilização da PCR na otite como método de diagnóstico microbiológico complementar, tendo esta

permitido a identificação de “novos” microrganismos cuja importância na otite média não é ainda totalmente conhecida, como são exemplo organismos fastidiosos como *Alloiococcus otitidis* e outros microrganismos não-cultiváveis [104]. Tratando-se a PCR de uma técnica de identificação que tem por base a detecção e amplificação de DNA, esta não exige a viabilidade do microrganismo em questão, para produzir um resultado positivo. Sendo assim, a PCR torna-se particularmente útil em casos em que as culturas apresentaram um resultado negativo, sobretudo em doentes previamente submetidos a antibioterapia [103]. Não obstante, e apesar das metodologias PCR apresentarem valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica superiores aos das culturas, a interpretação dos seus resultados deve ser enquadrada no quadro clínico e confirmada, de preferência, através de um outro método de identificação microbiológica, dado esta técnica não distinguir entre colonização e infeção [103]. É importante ressaltar que a PCR do exsudado do ouvido médio apresenta as mesmas dificuldades de colheita de amostra referidas previamente em relação nas culturas, e como tal, a sua aplicação na prática clínica comum cinge-se a reduzido número de casos nos quais haja indicação para realização de timpanocentese.

Pneumonia:

- Definição

A pneumonia consiste numa inflamação aguda do parênquima pulmonar de origem infecciosa, e é definida por um critério imagiológico, que inclui a identificação de infiltrados pulmonares por RX ou TAC torácicos, juntamente com 2 outros critérios clínicos, entre eles, a exacerbação ou aparecimento *de novo* de tosse produtiva, dispneia, taquipneia, toracalgia, febre/hipotermia, sudorese e alterações focais identificadas *de novo* ao exame objetivo do tórax [63, 119].

- Etiologia e epidemiologia

Pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é definida como qualquer pneumonia que se desenvolva fora do hospital ou em menos de 48h após o internamento hospitalar, num doente que não se encontrava previamente hospitalizado ou a residir em lar ou instituição equivalente [74]. A incidência da PAC varia entre 1.2-11.6/1000 adultos por ano, sendo mais frequente em certos grupos de risco como os mais idosos e os doentes com doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) [42]. No entanto a sua verdadeira incidência é incerta, dado que apenas 20-25% dos doentes são hospitalizados e não se trata de uma doença de declaração obrigatória [42, 120].

Os agentes patogénicos mais frequentemente isolados na PAC são *Streptococcus pneumoniae* (20-30%), *Haemophilus influenzae* (3-10%), *Legionella pneumophila* (2-8%), *Mycoplasma pneumoniae* (1-6%), *Chlamydia pneumoniae* (4%), bacilos Gram-negativos (3-5%) e outras causas (10-20%) [42, 120]. Através da interpretação destes dados conclui-se que, apesar da implementação a nível mundial das PCV, *Streptococcus pneumoniae* mantém o seu lugar como principal agente etiológico da PAC, apesar de ter sofrido uma redução significativa na sua frequência de 35-40%, na era pré-PCV, para 20-30% na era pós-PCV [119, 121].

A PAC pneumocócica pode ser classificada como invasiva ou não invasiva. Esta é uma distinção importante tanto a nível epidemiológico como também a nível diagnóstico e de prognóstico. A variante invasiva, para além do eventual isolamento do agente em

produtos do aparelho respiratório, é diagnosticada através de uma hemocultura positiva para *Streptococcus pneumoniae*, sinónima de bacteriemia. Por outro lado, a variante não invasiva é diagnosticada pela identificação de *Streptococcus pneumoniae* em uma amostra não estéril, mais frequentemente a expetoração, ou por um resultado positivo da pesquisa do antigénio urinário de pneumococo, na presença de hemoculturas negativas [46, 122].

A PAC pneumocócica invasiva pertence ao grupo das DIP, estando portanto associada a uma maior morbidade e mortalidade em relação à PAC não invasiva, assumindo um mesmo grau de gravidade da doença no momento da admissão do doente [123, 124]. De todas as DIP, 80-90% constituem pneumonias invasivas e 5-10% constituem bacteriemia com/sem outro foco ou meningites. Dentro do grupo da PAC causada por *Streptococcus pneumoniae*, apenas 20-30% são invasivas, sendo os restantes 70-80% não invasivas [122]. Contudo, a verdadeira incidência da pneumonia pneumocócica invasiva é de difícil previsão, já que a sua epidemiologia está intimamente relacionada com as práticas de imunização de cada região e o seu diagnóstico é baseado principalmente nas hemoculturas (mas também, em menor número de casos, na análise microbiológica do líquido pleural) que, ao não serem sempre realizadas e ao possuírem baixa sensibilidade, estão longe de serem consideradas um teste ideal para este diagnóstico, levando à conclusão de que a sua incidência seja significativamente subestimada. A baixa sensibilidade das hemoculturas e o risco de contaminação durante a colheita da amostra denotam a necessidade urgente de um novo teste diagnóstico para as DIP [123, 125].

- Diagnóstico etiológico

Atualmente, os padrões de qualidade da microbiologia assentam em 4 pilares fundamentais, o produto colhido e a sua origem, o potencial patogénico dos microrganismos identificados, a concentração desse microrganismo na amostra e a influência prévia de antibióticos sobre a mesma [126]. Estes padrões são especialmente importantes na PAC, onde as considerações metodológicas impactam significativamente os resultados da análise microbiológica [119, 127].

As investigações microbiológicas correntes para a identificação das causas bacterianas e virais da PAC incluem hemoculturas, culturas da expetoração, secreções brônquicas, lavados bronco-alveolares e do líquido pleural (quando disponíveis), serologias para as bactérias atípicas (*Mycoplasma spp.* e *Chlamydia spp.*), PCR e pesquisa do antígeno urinário de pneumococo e de *Legionella pneumophila* [63].

O agente responsável pela PAC permanece desconhecido em cerca de 30-60% dos casos, mesmo com uma investigação microbiológica adequada. Isto deve-se, em parte, à baixa acuidade diagnóstica dos vários testes microbiológicos, derivada da dificuldade na obtenção de produtos do trato respiratório de alta qualidade [119, 120]. Por outro lado, o tratamento prévio com antibióticos diminui significativamente a sensibilidade das culturas, sendo a extensão do seu efeito difícil de quantificar, ao depender de vários fatores como o tipo de antibiótico, a duração da administração prévia à obtenção da amostra, o tipo de amostra e a suscetibilidade do agente patogénico [128].

- Biópsia pulmonar

A árvore traqueobrônquica e os pulmões são geralmente estéreis abaixo da laringe [120], daí que o método ideal para a determinação da etiologia de uma pneumonia, apenas do ponto de vista do diagnóstico etiológico, seja através da análise de uma amostra obtida diretamente do local de infeção, o pulmão, evitando os riscos de contaminação com a microbiota das vias aéreas superiores [63, 129]. As biópsias pulmonares, transbrônquicas ou transtorácicas, representam um método de diagnóstico invasivo e, como tal, são principalmente utilizadas apenas em casos onde os benefícios superem os riscos, como é o caso da avaliação citológica na suspeita de doença maligna. Não obstante, as biópsias pulmonares podem ser utilizadas para detetar infeção e, no caso particular da pneumonia, apenas as transtorácicas foram estudadas em maior escala, pelo que somente os resultados destas serão apresentados neste trabalho [129].

As principais complicações da biópsia pulmonar são as hemoptises e o pneumotórax e sucedem em cerca de 5% das intervenções, sendo na sua grande maioria apenas transitórias. Coagulopatias, hiperinsuflação torácica e suspeita de infeção por *Pneumocystis jirovecii* são, logicamente, contraindicações para esta técnica e só deve

ser utilizada em doentes que apresentem grandes consolidações pulmonares periféricas identificadas previamente por um método imagiológico, de forma a minimizar os riscos, e em locais que possuam a capacidade de lidar com as possíveis complicações [128, 130].

Os resultados das culturas das amostras obtidas através da biópsia pulmonar variam consideravelmente em cada estudo, mas estes aparentam diagnosticar o agente etiológico da pneumonia em 11-17% dos casos, atingindo valores mais elevados, na ordem dos 30-40% se forem utilizadas outras técnicas de diagnóstico como a PCR [128-130]. Um pulmão de um indivíduo saudável é praticamente estéril e, como tal, a especificidade da cultura destes produtos é muito elevada, pois o potencial de contaminação da amostra é diminuto [130]. Sob outra perspetiva, nos doentes com DPOC, por possuírem colonização bacteriana abaixo do nível da laringe, a acuidade diagnóstica desta técnica diminui, dado o potencial de existirem resultados falsos-positivos [126].

Durante anos, a biópsia pulmonar transtorácica foi considerada o método de referência do diagnóstico da pneumonia e contribuiu significativamente para o conhecimento atual [127, 128]. No entanto foi abandonada devido às preocupações quanto ao seu perfil de segurança, à não aceitação por parte dos doentes em serem submetidos ao procedimento e devido ao sentimento de que esta era na maioria das vezes desnecessária [126]. Esta técnica continua a ter a sua utilidade em certos doentes nos Cuidados Intensivos ou com pneumonias nosocomiais, em que o diagnóstico etiológico correto e rápido é de extrema importância para dirigir o tratamento.

- Sangue / Hemoculturas

Apesar de as hemoculturas serem consideradas o método de referência para a deteção de bacteriemia, a sua utilidade em doentes com PAC é controversa [131]. Estas só têm utilidade nos casos de pneumonia com bacteriemia e, como já referido anteriormente, aplicam-se apenas a uma pequena percentagem das PAC, devido à disseminação da infeção ocorrer, principalmente, a nível local e não por via hematogénea.

As hemoculturas são positivas em apenas 20-30% dos casos de PAC pneumocócica [119] e, como tal, positivas em ainda uma menor percentagem de todas as PAC, cerca de 2% a 9%, dependendo de os doentes se encontrarem em regime de ambulatório ou

hospitalar, respetivamente [132]. Tudo isto, em junção com o potencial risco de contaminação por parte da microbiota da pele, e com o facto de os seus resultados positivos raramente levarem à alteração da antibioterapia empírica que estava a ser administrada, demonstra que as hemoculturas não devem ser realizadas por rotina nas PAC não graves [132-134]. No entanto, a sua especificidade permanece bastante elevada para o diagnóstico de bacteriemia. Certas considerações metodológicas são essenciais para maximizar a sensibilidade diagnóstica das hemoculturas. Devem ser colhidas várias amostras, devendo ser puncionado um local distinto de cada vez e, para maximizar a sensibilidade, as colheitas devem ser realizadas em tempos diferentes, pois a bacteriemia é frequentemente intermitente [129, 135, 136]. Cada amostra deve ter pelo menos 10ml no adulto, uma vez que o volume de sangue é o principal fator determinante da sensibilidade das hemoculturas, a qual aumenta a cada mililitro adicional [129, 135, 136].

Os valores da sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de pneumonia por *Streptococcus pneumoniae* são difíceis de apurar e variam muito entre estudos, dado não existir um verdadeiro teste de referência. Não obstante, de forma a poder ser traçado um paralelo entre os vários métodos de diagnóstico etiológico neste trabalho, foi decidido utilizar os valores obtidos por um desses estudos no qual foram comparados os métodos mais comumente utilizados na análise de amostras sanguíneas. As hemoculturas apresentam, portanto, uma sensibilidade e uma especificidade diagnósticas de pneumococo de 12,9% e de 100%, respetivamente [137].

O valor deste teste microbiológico prende-se com a identificação de microrganismos menos comuns, e, como tal, potencialmente não abrangidos pela antibioterapia empírica, cujo atraso no tratamento adequado pode ter consequências graves. Por isso as hemoculturas são ainda recomendadas no caso das PAC graves, sendo este subgrupo de doentes o único a demonstrar um potencial benefício das hemoculturas, ao possuir uma maior incidência de bacteriemia em comparação com as PAC não graves e uma maior incidência de microrganismos multirresistentes [133, 134, 138]. Porém, esta recomendação carece de mais estudos que a apoiem [138].

O uso da PCR em amostras sanguíneas tem sido alvo de estudo por apresentar uma sensibilidade superior à das hemoculturas, mantendo uma elevada especificidade. Estes valores de sensibilidade e especificidade são difíceis de avaliar pois, na ausência de um verdadeiro método de referência, as hemoculturas têm de ser consideradas o termo comparativo. Não obstante, a pesquisa do gene *lytA* por RT-PCR no sangue demonstra uma sensibilidade de 17,1% e uma especificidade de 97,4% [137].

Os valores da sensibilidade da PCR em amostras sanguíneas são extremamente baixos em comparação com aqueles obtidos na análise de outras amostras e devem-se a fatores inerentes ao próprio sangue e à natureza da técnica. O sangue contém elevadas quantidades de ADN humano que é um inibidor da PCR e, como tal, é um dos responsáveis pela diminuição da sensibilidade desta técnica. Outro fator adjuvante é a difícil lise da parede celular de *Streptococcus pneumoniae* quando contida em sangue, prejudicando a extração de ADN de pneumococo e por conseguinte a sensibilidade da PCR. Quanto à especificidade, esta não é de 100% devido à reatividade cruzada deste teste com outros estreptococos do grupo *mitis* [137, 139].

A identificação do gene *lytA* por PCR só será positiva no sangue em casos de pneumonia bacteriémica e, dado o pequeno incremento de sensibilidade acompanhado de perda de especificidade em relação às hemoculturas e o facto de apenas pesquisar pneumococo, faz com que esta técnica seja apenas utilizada em estudos, não possuindo qualquer papel na clínica, de momento.

- Expetoração / Secreções brônquicas

Sendo a expetoração proveniente das vias respiratórias inferiores e podendo ser colhida de forma não invasiva, representa um produto de elevada importância diagnóstica pois é originária do local de infeção [129]. Cerca de 60% dos doentes adultos é capaz de produzir uma amostra de expetoração, sendo este o produto que mais frequentemente se encontra disponível para análise microbiológica na pneumonia e cujo resultado da cultura é utilizado para estabelecer o diagnóstico presuntivo de pneumonia bacteriana e para guiar as decisões clínicas, na maior parte dos casos [26, 126, 140].

Vários estudos demonstram que a acuidade diagnóstica da cultura da expetoração, no caso específico da pneumonia pneumocócica, varia entre 10-86% dependendo da

qualidade dessa expectoração e do uso prévio de antibióticos, atingindo os 86% nos casos em que os doentes não tenham sido tratados com antibióticos e a expectoração seja de boa qualidade [132, 141].

Em geral a expectoração está sujeita à contaminação orofaríngea durante o processo da colheita da amostra, dificultando a interpretação dos resultados da cultura. Esta deve ser induzida sob uma tosse profunda e rapidamente analisada ou preservada para evitar o crescimento de contaminantes [126, 142] Como tal, as amostras de expectoração devem ser analisadas quanto à sua qualidade previamente ao seu processamento. A análise da qualidade da expectoração tem por base a coloração Gram, onde é observado o número de leucócitos polimorfonucleares e de células epiteliais pavimentosas presentes num campo de menor ampliação (100x). A presença de menos de 10 células epiteliais e mais de 25 polimorfonucleares é o critério mais utilizado para caracterizar uma amostra de expectoração como sendo de boa qualidade, representativa do trato respiratório inferior. Uma amostra de expectoração que contenha poucos leucócitos polimorfonucleares e grande quantidade de células epiteliais pavimentosas provavelmente apresenta contaminação orofaríngea, pelo que deve ser rejeitada para cultura. Seguindo estes critérios, a cultura da expectoração passa a possuir sensibilidade e especificidade aceitáveis para o diagnóstico de pneumonia pneumocócica [142-144].

Previamente à cultura, as amostras devem também ser analisadas quanto à presença de bactérias, algo que é fácil de fazer visto estas já terem sido submetidas à coloração de Gram aquando da análise da sua qualidade. Os resultados desta coloração irão facilitar a interpretação dos resultados da cultura e apresentam, numa amostra de boa qualidade, um elevado valor preditivo positivo e uma sensibilidade e especificidade diagnósticas boas para *Streptococcus pneumoniae* na ordem dos 70% e 93%, respetivamente [26]. No entanto é um teste cujo resultado negativo não permite excluir a etiologia bacteriana da pneumonia e, como tal, vários estudos questionam a sua utilização, já que amostras de expectoração de boa qualidade são difíceis de obter e a toma prévia de antibióticos condiciona vários resultados falsos-negativos [26, 145].

Tal como acontece com as hemoculturas, as *guidelines* mais recentes da *American Thoracic Society* não recomendam a coloração Gram nem a cultura da expectoração

rotineiramente na PAC ligeira a moderada, sendo estes reservados apenas para os casos de PAC grave, onde o seu valor diagnóstico é mais elevado [132].

No caso específico da identificação do gene *lytA* por PCR na expetoração, a sensibilidade e especificidades diagnósticas de pneumonia pneumocócica, em amostras de boa qualidade, rondam os 75-95% e 80-96%, respetivamente, dependendo do estudo e método diagnóstico à qual a PCR é comparada, sendo estes valores relativamente semelhantes àqueles reportados nas culturas [146, 147]. Os resultados da PCR mantêm-se praticamente inalterados mesmo em doentes que já tenham iniciado antibioterapia previamente à colheita da amostra, representando uma vantagem em relação às culturas. No entanto, o verdadeiro valor deste teste encontra-se, potencialmente, na utilização da *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR), que ao permitir quantificar as cópias de ADN por mililitro na expetoração pode permitir a diferenciação entre colonização e infeção pneumocócica. Não obstante, ainda não se encontram definidos valores *cut-off* para este fim, sendo necessários mais estudos e, como tal, de momento a utilização da PCR nas amostras de expetoração não é utilizada na prática clínica [146, 147].

- Indução da expetoração

A grande maioria das crianças e uma percentagem considerável dos adultos tem dificuldade em produzir uma amostra de expetoração. Como tal, vários estudos sugerem a realização do procedimento de indução da expetoração, de forma a obter uma amostra para análise. Este procedimento é principalmente utilizado em crianças imunocomprometidas, e/ou com suspeitas de tuberculose, ou em casos de exacerbação de fibrose quística, onde o diagnóstico microbiológico é de grande importância para a seleção da terapêutica apropriada [129, 143, 148]. Não obstante, o interesse desta técnica, em doentes hospitalizados por PAC, tem vindo a aumentar [148].

Tal como na expetoração que ocorre naturalmente, a expetoração induzida corre também o risco de contaminação orofaríngea, independentemente de ter sido colhida através de sucção por cateter ou não. Desta forma, as amostras devem ser analisadas quanto à sua qualidade previamente a qualquer estudo microbiológico, e os resultados desses estudos devem também ser interpretados com cautela, já que partilham os

mesmos condicionantes de sensibilidade e especificidade diagnóstica que qualquer outra amostra de expetoração [129, 143].

Os possíveis efeitos adversos desta técnica incluem dessaturações dos níveis de $O_2 > 5\%$ por períodos de tempo superiores a 15 minutos, broncospasmo com necessidade *de novo*/aumento de dose de broncodilatadores, prostração ou redução do nível de consciência, e potencialmente morte. Como tal, qualquer doente que apresente crises convulsivas nas últimas 24h, perda dos reflexos de proteção da via aérea definida por um GCS < 8 , saturações de $O_2 < 92\%$, ou que tenha sofrido recentemente uma crise de broncospasmo grave, é um doente que apresenta uma contraindicação para a realização da indução da expetoração [148].

Apesar dos graves riscos inerentes a esta técnica, o perfil de segurança da indução da expetoração foi avaliado por alguns estudos internacionais em larga escala, principalmente em crianças com PAC grave. Nestes, este procedimento demonstrou ser bem tolerado, com capacidade de produzir amostras de boa qualidade em mais de 60% dos casos, e ser relativamente seguro ao apresentar menos de 1% de efeitos adversos nos mais de 4500 casos estudados [143, 148].

A indução da expetoração carece de mais estudos em adultos antes de poderem ser retiradas conclusões quanto ao seu papel no diagnóstico etiológico das pneumonias, sendo que, provavelmente, apenas será utilizada em casos selecionados, nos quais o diagnóstico etiológico seja de tal maneira importante que os benefícios superem os riscos inerentes ao procedimento.

- Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar representa uma alternativa viável para a obtenção de uma amostra proveniente das vias respiratórias inferiores, caso não tenha sido possível obter uma amostra de expetoração / secreções brônquicas de forma não invasiva. Este procedimento invasivo apresenta um bom perfil de segurança e as amostras produzidas apresentam baixo risco de contaminação orofaríngea, contribuindo para um aumento da sensibilidade e especificidade do diagnóstico etiológico das pneumonias [126, 129, 149].

Este método de diagnóstico etiológico é de grande utilidade nos casos de pneumonias nosocomiais e associadas ao ventilador nas unidades de cuidados intensivos. No entanto, na PAC é considerado desnecessário devido aos riscos inerentes ao procedimento e dada a existência de várias alternativas não invasivas já previamente discutidas. Não obstante, pode e deve ser utilizado em casos de PAC grave que não respondam à terapêutica bem como em outros casos selecionados [126, 129, 149].

- Amostras do trato respiratório superior

A grande disponibilidade e facilidade de obtenção das amostras do trato respiratório superior torna a sua utilização bastante apelativa no diagnóstico etiológico da pneumonia, dadas as dificuldades em produzir uma amostra respiratória proveniente das vias aéreas inferiores. No entanto, a cultura e PCR das amostras provenientes da nasofaringe/orofaringe não permitem a distinção entre colonização e infecção no caso de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, que constituem os principais agentes etiológicos na PAC e, como tal, não tem interesse no diagnóstico etiológico desta entidade [129, 150].

- Derrame pleural/Empiema

A introdução da PCV teve um impacto significativo na diminuição da incidência da PAC e da taxa de complicações desta. No entanto, possivelmente devido à alteração da distribuição dos serótipos de *Streptococcus pneumoniae* causadores da doença, a incidência de derrames pleurais parapneumónicos e de empiemas tem vindo a aumentar desde então. Estas representam as complicações mais frequentes na PAC infantil, sendo que *Streptococcus pneumoniae* representa o agente etiológico responsável em mais de 60% delas [53].

Um derrame pleural pode ter várias causas, sendo que as doenças malignas (27%), a insuficiência cardíaca (21%), a pneumonia (19%) e a tuberculose (9%) representam as 4 principais [151]. E, segundo as *guidelines* da *British Thoracic Society*, desde que o derrame pleural não aparente ser resultado de um estado edematoso como a insuficiência cardíaca, nesses derrames, particularmente nos unilaterais, deve ser realizada uma toracocentese ecoguiada para a recolha de uma amostra para análise citológica, bioquímica e microbiológica [152].

Quanto ao estudo microbiológico, é realizada a coloração Gram e subsequente cultura da amostra, por rotina, resultando na identificação do agente patogénico em cerca de 20-25% dos casos. Esta acuidade diagnóstica pode atingir os cerca de 80% se a este estudo forem adicionadas as técnicas de PCR e pesquisa do antígeno do pneumococo (BinaxNOW®) [53, 127, 151].

O líquido pleural é uma ótima amostra para o estudo microbiológico, já que este é estéril em condições não-infecciosas, e portanto um resultado positivo será diagnóstico de infeção, não podendo ser confundido com contaminação ou colonização. Como tal, e dada a sua elevada sensibilidade e rapidez em produzir resultados, a PCR apresenta-se como a técnica de diagnóstico etiológico de eleição nos derrames pleurais parapneumónicos, possibilitando a implementação de uma antibioterapia dirigida mais precoce perante um resultado positivo [151].

Vários estudos têm vindo a aplicar o teste BinaxNOW® diretamente no líquido pleural e, apesar de tal uso não se encontrar validado pelo fabricante, o teste apresentou uma sensibilidade entre os 70-90% e uma especificidade entre os 70-100% para a deteção de pneumococo, dependendo do estudo [127]. Estes resultados continuam a ser inferiores àqueles obtidos com a PCR e, ao não estar validado, não é um teste cuja realização possa ser recomendada neste momento, necessitando de mais estudos [127]. No entanto, a sua realização em crianças com derrame pleural pode representar uma grande vantagem com superior valor diagnóstico, já que ao contrário da pesquisa do antígeno pneumocócico na urina, a pesquisa do mesmo no líquido pleural não apresenta resultados falsos positivos devido à colonização assintomática de *Streptococcus pneumoniae* [153].

No caso particular das pneumonias pneumocócicas pediátricas complicadas (complicações estas que se entendem por pneumonias acompanhadas por derrame pleural parapneumónico ou empiema), as hemoculturas e culturas do líquido pleural são frequentemente negativas [17]. Por vezes, a colheita das amostras para cultura é feita posteriormente à administração de antibioterapia, no entanto, este dado, por si só, não justifica a baixa acuidade diagnóstica das culturas de líquido pleural nestes casos [17]. Como já referido, existem atualmente 98 serótipos confirmados de *Streptococcus*

pneumoniae, sendo que alguns deles possuem maior potencial invasivo que outros. Relativamente às pneumonias pneumocócicas pediátricas complicadas, o serótipo 3 é de particular interesse pois, apesar de estar contido na PCV13, é atualmente o serótipo mais comum neste tipo de pneumonias [17]. Pneumococo raramente cresce em cultura de líquido pleural, podendo justificar a baixa acuidade diagnóstica desta nos empiemas e derrames pleurais, não obstante, é facilmente identificado por PCR. Como tal, as técnicas de diagnóstico baseadas na PCR têm vindo a ganhar bastante destaque na análise microbiológica das infeções pneumocócicas invasivas, mas também na vigilância epidemiológica das mesmas, dado permitirem identificar um número muito apreciável de serótipos, para os quais existem sondas, nomeadamente todos os incluídos na PCV13 [17].

- Urina

A introdução da pesquisa do antígeno urinário na prática clínica aumentou consideravelmente o número de diagnósticos etiológicos estabelecidos na PAC, em cerca de 13-30%, dependendo da população estudada [17, 42]. Não obstante é importante realçar o facto de que um resultado positivo do teste BinaxNOW[®], apesar dos seus bons valores de sensibilidade e especificidade diagnósticas de cerca de 74% e 97%, respetivamente, não permite um diagnóstico definitivo de pneumonia pneumocócica pois não é capaz de diferenciar entre colonização e infeção pneumocócica. Como tal, o teste não deve ser realizado em crianças, onde as taxas de colonização por *Streptococcus pneumoniae* são elevadas [42, 52].

Este teste possui alguma utilidade no diagnóstico etiológico de pneumonias pneumocócicas, ao realizar-se rapidamente e ao não ser negativamente afetado pela iniciação da antibioterapia previamente à obtenção da amostra, desde que tal início não exceda mais que 3 dias [46, 52]. No entanto, as *guidelines* atuais não recomendam a sua utilização rotineira à exceção dos casos de PAC grave, dado que um resultado positivo não alteraria a prescrição da antibioterapia [132].

Recentemente foi introduzido outro teste diagnóstico, o Sofia Pneumococcal FIA[®], que também pesquisa a presença do antígeno da parede celular pneumocócica na urina, distinguindo-se do BinaxNOW[®] ao ter como base a imunofluorescência e não a

imunocromatografia. A leitura do Sofia FIA® é automatizada, o que permite uma ligeira melhoria da sensibilidade deste em relação ao BinaxNOW®, no entanto esta diferença foi reportada como não estatisticamente significativa por vários estudos. Este teste apresenta, aproximadamente, uma sensibilidade e especificidade diagnósticas de 78% e 83%, respetivamente, e simultaneamente partilha as mesmas vantagens e desvantagens inerentes ao BinaxNOW® [42, 43, 52]. Como tal, são necessários mais estudos que demonstrem efetivamente uma relação de superioridade deste teste em relação ao teste BinaxNOW®, até agora não comprovada.

Meningite bacteriana:

- Definição

A meningite corresponde à inflamação das meninges e do espaço subaracnoide que pode também afetar o córtex cerebral, dada a sua proximidade anatômica [154, 155]. Esta doença apresenta, por norma, uma etiologia infecciosa (bacteriana, viral ou fúngica) mas pode também ter origem não infecciosa, sendo denominada, nesses casos, de meningite asséptica (medicamentos, traumatismos, entre outros). A meningite bacteriana é considerada a forma mais grave desta doença, representando uma emergência médica e, como tal, exigindo avaliação e tratamento imediatos [154].

- Etiologia e epidemiologia

Streptococcus pneumoniae, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus agalactiae* são as bactérias mais frequentemente identificadas na meningite, sendo que a sua prevalência varia consoante os diversos grupos etários e fatores de risco [77, 156]. Tal prevalência sofreu grandes alterações nas últimas décadas, em grande parte devido à introdução das vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* [77, 157]. Estas vacinas levaram à quase extinção da doença por *Haemophilus influenzae* tipo b e reduziram substancialmente a incidência da mesma por meningococo e, em menor grau, por pneumococo. A vacinação mostrou-se particularmente eficaz ao nível das crianças com idades inferiores a 2-5 anos, passando a idade adulta a ser o grupo etário mais afetado [77, 156, 158].

Atualmente, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* são os agentes bacterianos mais comuns na meningite neonatal, sendo *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* os principais agentes etiológicos nas restantes meningites bacterianas de idade pediátrica e adulta (*Listeria monocytogenes*, por outro lado, apresenta-se como causa comum de meningite bacteriana nos idosos e/ou imunodeprimidos) [159].

- Manifestações clínicas

A tríade clássica da meningite, composta por febre, rigidez da nuca e alteração do estado de consciência, apenas está presente em cerca de 40-50% dos doentes, dificultando assim o diagnóstico [77, 157]. Os sinais meníngeos de Kernig e de Brudzinski são muitas vezes procurados pelos clínicos aquando da suspeita de meningite, de forma a estabelecer um diagnóstico, apresentando uma elevada especificidade de cerca de 95% mas baixas sensibilidades a rondar os 50-60%, dado apenas refletirem irritação meníngea, que pode ter múltiplas causas [77, 157]. Na sua grande maioria, os sinais e sintomas clínicos da meningite não têm a capacidade de predizer a etiologia, no entanto, o *rash* cutâneo purpúrico/petequial é uma exceção, já que apresenta sensibilidade de 63-80% e especificidade entre os 83-92% para o diagnóstico de meningite meningocócica. Outros *rashes* cutâneos, ainda que mais raramente, estão também descritos na meningite pneumocócica [77, 159].

Após a introdução das PCV a incidência da meningite pneumocócica foi reduzida em cerca de 33% [1609]. No entanto, pneumococo permanece a principal etiologia bacteriana de meningite, a nível mundial, entre todas as faixas etárias, à exceção do período neonatal, representando cerca de 60-70% da totalidade dos casos de meningite bacteriana nos Estados Unidos da América [159-162].

Grande parte dos casos de meningite pneumocócica desenvolve-se por via hematogénea, após bacteriemia. Não obstante, a elevada incidência de doentes com infeção do trato respiratório superior que desenvolvem meningite sugere que alguns desses casos possam ocorrer por extensão direta de processos infecciosos pré-existentes (otite média, mastoidite, rinosinusite, etc.) [157, 160].

A meningite pneumocócica possui uma apresentação clínica variável, sendo esta dependente de vários fatores, entre eles a idade dos doentes, que costuma ditar uma sintomatologia mais subtil e atípica nos extremos etários [77, 159]. Os sinais e sintomas mais comuns que sugerem esta doença são febre, vômitos, fotofobia, cefaleias, sinais meníngeos (que podem estar ausentes devido a analgesia ou corticoterapia prévias), alterações do estado de consciência, crises convulsivas e/ou défices neurológicos focais [155, 159]. Com uma taxa de mortalidade a rondar os 30% e com 30-50% dos doentes a apresentar sequelas neurológicas como surdez, défices focais neurológicos, crises

convulsivas, e défices cognitivos a longo prazo, a meningite por *Streptococcus pneumoniae* possui a maior mortalidade e morbidade de entre os vários agentes bacterianos causadores de meningite, sendo de extrema importância o seu diagnóstico e tratamento precoces [54, 159, 160, 162].

- Diagnóstico etiológico
 - Métodos de cultura

De acordo com as *guidelines* da ESCMID, deve ser realizada uma punção lombar (PL) para a colheita de líquido cefalorraquidiano (LCR) em todos os doentes que apresentem clínica suspeita de meningite [77, 161]. A PL é um procedimento necessário, porque apenas a análise do LCR permite o diagnóstico da meningite e da sua etiologia, dado que as características clínicas são incapazes de a diferenciar de outros diagnósticos e de distinguir entre as diversas etiologias [155]. Este procedimento não é isento de riscos, sendo a herniação cerebral, a hemorragia subaracnoideia e a possível inoculação de bactérias no espaço subaracnoideu os principais. Como tal, constituem contra-indicações à realização da PL os distúrbios da coagulação não corrigidos, trombocitopénias $<50000/\text{mm}^3$, a instabilidade cardiorrespiratória, sinais que indiquem a presença de hipertensão intracraniana (HIC) e infeção cutânea no local de punção [77, 155].

Quanto ao risco de herniação cerebral na PL, este não se encontra bem definido, visto que a mesma pode ocorrer em casos de meningite bacteriana nos quais não foi realizada uma PL [155]. A herniação cerebral ocorre, em norma, nas 5 horas que se sucedem ao procedimento, sendo este risco mais elevado nos doentes que demonstrem sinais e sintomas de hipertensão intracraniana [155]. Neste contexto, a TAC crânio encefálica é comumente utilizada para avaliar o risco de herniação cerebral [77, 155]. Contudo, a realização de exames imagiológicos previamente à PL leva a um atraso substancial e inaceitável na iniciação da antibioterapia, culminando em um aumento da morbidade e mortalidade [77, 157, 162]. Desta forma, as atuais *guidelines* da ESCMID recomendam que a TAC-CE apenas seja realizada em doentes imunocomprometidos ou que apresentem défices neurológicos focais, convulsões *de novo* ou uma pontuação <10 na escala de Coma de Glasgow [77].

Ao constituir uma emergência médica, qualquer suspeita de meningite deve ser prontamente abordada. Quando possível, devem ser colhidas amostras de sangue e de LCR para análise microbiológica, previamente à administração da antibioterapia empírica [162]. O tratamento empírico de uma suspeita de meningite deve ser iniciado logo que possível, e nunca mais que 1h após a admissão hospitalar, devendo sempre serem colhidas amostras para análise microbiológica previamente à administração da antibioterapia [77, 162]. Em situações onde ocorrem atrasos na realização da PL, sejam eles por necessidade de realização prévia de uma TAC-CE ou por existência de contraindicações à sua realização, o tratamento não deve ser atrasado e, devem, então, ser colhidas hemoculturas previamente à administração da antibioterapia, de forma a aumentar a probabilidade de identificar a etiologia e dirigir o tratamento [77, 162].

O LCR é um líquido estéril no qual podem ser realizados vários testes microbiológicos para a identificação de pneumococo, nos quais um resultado positivo permite fazer o diagnóstico de meningite pneumocócica, visto que nesta amostra um positivo nunca pode ser confundido com colonização por *Streptococcus pneumoniae*. As técnicas de cultura, coloração Gram, PCR, aglutinação do latex e pesquisa do antígeno pneumocócico constituem as mais utilizadas e aplicadas no LCR para o diagnóstico de meningite pneumocócica [163].

Em primeira instância, o LCR deve ser avaliado quanto às suas características macroscópicas, bioquímicas e citológicas. Um LCR turvo e com pressão de saída aumentada ($> 20\text{cm H}_2\text{O}$), que apresente pleocitose polimorfonuclear (> 1000 células/ μL), hipoglicorráquia (valores de glicose no LCR $<50\%$ aos valores da glicémia) e hiperproteiorráquia (> 100 mg/dL) é indicativo de uma meningite bacteriana [159, 162]. No entanto, nenhum parâmetro isolado pode distinguir, com segurança, entre as diversas etiologias, sendo necessário interpretar estes resultados de acordo com a clínica e resultados dos restantes testes microbiológicos.

A cultura do LCR é considerada o método de referência do diagnóstico da meningite bacteriana, sendo positiva em 66-88% dos casos cujas amostras tenham sido colhidas previamente à administração de antibióticos [77]. Este teste microbiológico apresenta como vantagem adicional a capacidade de realizar o TSA e, assim, dirigir o tratamento

de forma a melhorar o prognóstico do doente [77, 164]. As culturas devem ser obrigatoriamente realizadas em aerobiose, ou preferencialmente em atmosfera com 5 a 10% de CO₂, no caso das meningites adquiridas na comunidade, estando a cultura em anaerobiose reservada para casos particulares, como as meningites pós-cirúrgicas ou complicações de *shunts* de LCR [160, 164].

A sensibilidade das culturas de LCR varia consoante o agente etiológico causador da doença, sendo esta de 96% para *Haemophilus influenzae*, 87% para *Streptococcus pneumoniae* e 82% para *Neisseria meningitidis* [77]. Outro fator que afeta frequentemente a sensibilidade das culturas é a administração de antibióticos previamente à colheita da amostra de LCR, sendo também importante o intervalo de tempo entre a iniciação da terapêutica e da colheita da amostra. Dois grandes estudos observacionais reportaram uma diminuição da sensibilidade das culturas de 66 para 62% e de 88 para 70%, respetivamente, tendo sido constatada uma diminuição mais acentuada da sensibilidade nos casos em que a administração de antibioterapia precedeu a PL em mais de 24h [77, 160], sendo que outros estudos afirmam que este decréscimo na sensibilidade se verifica já a partir das 2-4h após a iniciação da terapêutica [164].

Na maioria dos casos, as culturas produzem resultados positivos em cerca de 24-48h [162], no entanto, quando tal não se verifica, as culturas devem ser mantidas por 5-10 dias, antes de serem consideradas negativas, de forma a ser possível detetar organismos de crescimento mais lento no LCR [155].

A coloração Gram, por outro lado, oferece resultados praticamente imediatos [162]. Este teste deve ser sempre realizado, sendo particularmente útil nos casos em que a cultura do LCR é negativa, como acontece nos casos de administração de antibióticos previamente à realização da PL, onde um resultado positivo permite estabelecer um diagnóstico microbiológico presuntivo, no qual pode ser baseada a escolha da terapêutica [77, 162]. O tratamento prévio com antibióticos também afeta a sensibilidade do Gram, no entanto este não se faz sentir tanto como nas culturas, sendo que dois estudos diferentes reportaram uma diminuição da sensibilidade de apenas 1 e 4%, respetivamente [77].

Tal como sucede com as culturas, a sensibilidade da coloração Gram do LCR depende também do agente etiológico em questão. Tomando a cultura como referência, este teste apresenta valores de especificidade a rondar os 100% e de sensibilidade de 60-90% para *Streptococcus pneumoniae*, 70-90% para *Neisseria meningitidis*, 50% para *Haemophilus influenzae* e 25-35% para *Listeria monocytogenes* [77, 164, 165].

- Testes de aglutinação do látex

O teste de aglutinação do látex utiliza anticorpos específicos de antigénio que, na presença de um agente bacteriano no LCR, produzem uma reação visível a olho nu de aglutinação com os antigénios bacterianos detetados no LCR. Este método permite detetar os antigénios das bactérias mais frequentemente associadas à meningite, de forma expedita, produzindo resultados em aproximadamente 10-15 minutos [166].

A sensibilidade diagnóstica do teste de aglutinação do látex varia consoante o agente etiológico, rondando os 78-100% para *Haemophilus influenzae*, 59-100% para *Streptococcus pneumoniae* e 22-93% para *Neisseria meningitidis*. Em comparação com a cultura e coloração Gram do LCR, a sensibilidade deste teste é drasticamente afetada pela administração prévia de antibióticos [164], apresentando um decréscimo de cerca de 51% (de 60% para 9%), em relação aos restantes testes microbiológicos [77]. Como tal, e apesar de possuir elevada especificidade, o uso dos testes de aglutinação do látex não é atualmente recomendado no diagnóstico da meningite bacteriana, tendo sido substituído por outros métodos diagnósticos como a imunocromatografia (BinaxNOW®) e a PCR [54, 77].

- Pesquisa de antigénio urinário e no LCR

Como já referido, BinaxNOW® é um teste imunocromatográfico para a pesquisa de antigénio pneumocócico, validado para utilização na urina e no LCR [77]. Ao que concerne a meningite pneumocócica, vários estudos têm concentrado a sua atenção na aplicação deste teste no LCR, em vez de na urina. Tal tem por base a recomendação de não se pesquisar o antigénio urinário em crianças, devido às suas elevadas taxas de colonização pneumocócica, grupo etário este, no qual a meningite por pneumococo é frequente, sendo o seu diagnóstico correto de extrema importância. Não obstante, a

pesquisa do antígeno urinário pode vir a ser útil em adultos, em casos onde não sejam obtidas amostras de LCR, por contraindicação da PL, por exemplo.

No LCR este teste demonstra uma sensibilidade entre os 95-100% e uma especificidade de quase 100%, sendo que, ao contrário da urina, a colonização por *Streptococcus pneumoniae* não representa um fator de confusão na interpretação de um resultado positivo, dado o LCR ser estéril [77, 164]. Como tal, o BinaxNOW® pode ser aplicado no LCR de doentes de todas as idades, inclusive crianças, independentemente do seu estado de colonização por pneumococo. No entanto, este teste pode ainda produzir resultados falsos-positivos, como no caso de meningite por outra espécie estreptocócica, sendo sempre necessária cautela na análise dos resultados [77].

A pesquisa do antígeno pneumocócico, tanto na urina como no LCR, pode ser útil nos casos expostos previamente a antibióticos, dada a sensibilidade e especificidade deste teste não ser afetada, permitindo, possivelmente, diagnosticar um maior número de casos de meningite pneumocócica [77]. Um estudo demonstrou que a pesquisa do antígeno pneumocócico no LCR produzia resultados positivos em 24% dos casos cujas culturas eram negativas e nos quais tinham sido administrados antibióticos previamente à PL [164]. Este teste apresenta outras vantagens como a capacidade de produzir resultados em 15mins, ser barato e não requerer equipamentos especializados para a sua execução. De momento a sua realização, na meningite, não é recomendada pelas *guidelines* da ESCMID de 2016, visto tratar-se de um método de diagnóstico que apenas permite a identificação de pneumococo, não fornecendo informação sobre quaisquer outros possíveis agentes etiológicos, nem permitindo realizar o TSA [77].

- PCR

A PCR permite a amplificação de ADN bacteriano não viável até cerca de 1 semana após a primeira toma antibiótica, permitindo identificar o agente etiológico em vários casos cujos resultados das culturas são negativos, dado que na maioria dos casos, as culturas são negativas após o primeiro dia de antibioterapia [162, 164, 165]. Para além disso, a PCR aplicada ao LCR possui uma sensibilidade e especificidade diagnóstica muito elevada, rondando os 79-100% e 95-100% para *Streptococcus pneumoniae*, respetivamente [77]. Atualmente existem painéis diagnósticos de PCR *multiplex*

validados para uso no LCR, com a capacidade de identificar 14 agentes diferentes de entre os vírus, bactérias e fungos que mais frequentemente infetam o SNC, produzindo resultados em cerca de 1 h, permitindo orientar rapidamente a terapêutica [167]. Não obstante, estes painéis apresentam ainda um custo elevado, impedindo o seu uso generalizado e, ao não permitirem realizar o TSA, não substituem a cultura como método de referência no diagnóstico da meningite [167, 168].

No LCR, um resultado positivo de PCR, indicando a presença de pneumococo na amostra é sempre diagnóstico, ao contrário do que se verifica no sangue, onde se põe o problema de uma possível colonização, principalmente em crianças. Desta forma, este teste diagnóstico deve ser realizado sempre que possível, juntamente com a cultura e coloração Gram do LCR, tal como está previsto nas *guidelines* de 2016 da ESCMID [77]. Por outro lado, a PCR pode e deve também ser aplicada em amostras de sangue do doente adulto, sendo tal uma mais-valia, principalmente nos casos em que as culturas do LCR são negativas, apesar do risco de colonização pneumocócica, pois permite maximizar a probabilidade de um agente etiológico ser identificado [77]. À parte do seu papel diagnóstico, a PCR possui também um papel importante na vigilância epidemiológica de pneumococo, ao permitir identificar um número muito apreciável de serótipos de pneumococo, para os quais existem sondas, nomeadamente aqueles incluídos na PCV13 [17].

- Sangue / Hemoculturas

Em situações onde a cultura do LCR é negativa ou não foi realizada, as hemoculturas são muito úteis, ao permitirem identificar o agente etiológico e, acima de tudo, permitirem a realização do TSA de forma a selecionar a terapêutica correta [161]. As hemoculturas são positivas em 75% dos casos de meningites pneumocócicas, já que a disseminação desta bactéria para o SNC costuma ocorrer por via hematogénea. No entanto, a sua sensibilidade decresce em cerca de 20% se o doente tiver sido previamente tratado com antibióticos [160, 161]. Como tal, é recomendado que perante um doente com suspeita de meningite bacteriana, seja realizada uma PL e, simultaneamente, sejam colhidas hemoculturas antes de serem administrados antibióticos, mas sem nunca atrasar o

tratamento para que tal aconteça, tendo este de ser iniciado até 1h após a admissão do doente [77].

Conclusão:

A introdução das vacinas conjugadas antipneumocócicas à escala global resultou num decréscimo substancial, e inegável, da incidência de DIP. No entanto, as infeções pneumocócicas permanecem uma relevante causa de mortalidade e morbilidade, constituindo o seu diagnóstico etiológico, um passo importante na redução destas.

Apesar de todas as inovações no campo da microbiologia, entre elas as técnicas de biologia molecular, como a PCR e, mais recentemente, as técnicas de *next-generation sequencing*, a cultura mantém-se o método de referência para o diagnóstico da maioria das infeções por *Streptococcus pneumoniae*. Isto deve-se principalmente ao facto de a cultura proporcionar, ao contrário das outras técnicas utilizadas atualmente, a realização do TSA, permitindo dirigir a antibioterapia, sendo esta a razão pela qual as culturas devem ser sempre realizadas neste contexto. Contudo, esta técnica não é perfeita, demorando vários dias a produzir resultados, obrigando ao tratamento empírico e diagnóstico presuntivo inicial. Um resultado positivo, na maior parte das vezes, permite um diagnóstico seguro, mas um resultado negativo não permite excluir a presença de infeção, dada a baixa sensibilidade das culturas, principalmente se os doentes tiverem sido medicados com antibióticos previamente à colheita das amostras biológicas. Dada a baixa acuidade diagnóstica das culturas para as infeções pneumocócicas, outras técnicas de diagnóstico microbiológico devem ser adicionalmente empregues.

As técnicas baseadas na PCR não requerem isolamento prévio do microrganismo em cultura, podem ser aplicadas diretamente nas amostras biológicas, produzindo resultados mais rápidos, em cerca de duas horas, o que representa uma enorme vantagem em relação às culturas. O conhecimento mais precoce do agente etiológico responsável pela infeção facilita a seleção da antibioterapia inicial, tendo por base as suscetibilidades aos antibióticos reportadas ao nível local, sendo esta posteriormente alterada, ou não, consoante os resultados da TSA obtidos através dos métodos de cultura. A PCR apresenta valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica elevados para *Streptococcus pneumoniae*, aumentando consideravelmente a acuidade diagnóstica das infeções pneumocócicas quando conjugada com as culturas. A

sensibilidade desta técnica mantém-se praticamente inalterada mesmo em doentes que já tenham iniciado antibioterapia previamente à colheita da amostra, dado que a mesma não exige a viabilidade dos microrganismos para produzir um resultado positivo. Como tal, a PCR constitui uma técnica valiosa nos casos em que a cultura produziu resultados negativos. No entanto, um resultado positivo de PCR para pneumococo, em uma amostra não estéril, não permite distinguir entre infeção e colonização assintomática, pelo que os seus resultados devem ser interpretados com alguma cautela e de acordo com os dados clínicos, principalmente em crianças, onde as taxas de colonização pneumocócica são elevadas.

A pesquisa do antigénio pneumocócico revelou-se uma mais-valia no diagnóstico das infeções pneumocócicas, pela produção de resultados rápidos, em cerca de 15 minutos, e pela apresentação de valores de sensibilidade e especificidade elevados, que não são negativamente afetados pela administração de antibioterapia previamente à colheita da amostra, desde que essa não tenha sido iniciada há mais de 72 horas. Atualmente este teste encontra-se validado apenas para utilização em amostras de urina e de LCR, encontrando-se em estudo o seu uso em outras amostras biológicas, como é o caso do líquido pleural. A sua especificidade, baixo custo e rapidez de resultados, refletem o verdadeiro interesse deste teste que reside no seu elevado valor preditivo negativo, onde um resultado negativo para a presença de *Streptococcus pneumoniae* deve levar à pesquisa de etiologias alternativas da infeção em causa, propiciando assim uma melhor orientação do estudo diagnóstico e a seleção da antibioterapia empírica. Não obstante, um resultado positivo na pesquisa do antigénio urinário não permite fazer a distinção entre infeção ou colonização assintomática por pneumococo, porquanto não é recomendada a sua utilização em crianças. Por outro lado, dado o LCR ser um líquido estéril, um resultado positivo da pesquisa do antigénio pneumocócico neste produto não deverá ser interpretado como colonização. Ainda assim, este teste pode permanecer positivo alguns meses após a infeção, sendo necessário identificar infeções pneumocócicas prévias nos doentes, pode igualmente originar uma reação cruzada com outras bactérias do género *Streptococcus* e, pode ainda resultar em falsos-positivos devido a efeitos das vacinas antipneumocócicas [25]. Desta forma, um resultado positivo da pesquisa do antigénio pneumocócico não permite um diagnóstico definitivo de

infecção pneumocócica, mas apenas presuntivo, sendo necessário complementá-lo com as restantes técnicas de diagnóstico microbiológico previamente referidas e integrá-lo no contexto clínico de cada doente.

As técnicas de NGS e de PCR constituem algumas das mais promissoras perspectivas futuras do diagnóstico etiológico das infeções por *Streptococcus pneumoniae*. A RT-PCR, perante um resultado positivo para pneumococo, poderá vir a permitir fazer a distinção entre colonização e infecção, quando/se forem delimitados valores *cut-off* para as várias amostras biológicas passíveis de serem analisadas [147]. Por outro lado, os custos das técnicas de NGS podem vir a diminuir, com a evolução tecnológica, de forma a integrarem a rotina laboratorial na identificação microbiológica. E por último, com a melhor compreensão da relação entre resistências fenotípicas e genotípicas, tanto a PCR como a NGS podem tornar-se muito úteis na previsão das suscetibilidades e resistências a antimicrobianos.

Conclui-se assim que não existe nenhum método ideal para o diagnóstico microbiológico das infeções pneumocócicas, sendo que este continua a ter por base a cultura. Porém, a introdução das técnicas de biologia molecular, particularmente da PCR, veio revolucionar por completo este diagnóstico, resultando em diagnósticos mais rápidos e aumentando drasticamente a acuidade diagnóstica destas infeções. Resta apenas reforçar a ideia de que, na ausência de um método diagnóstico perfeito, todos e quaisquer resultados do estudo microbiológico devem ser sempre integrados no contexto clínico do doente.

Referências bibliográficas:

1. Bandettini, R., Melioli, G. (2012). *Laboratory diagnosis of Streptococcus pneumoniae infections: past and future*. Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 53, 85-88.
2. van Hoek, A., Sheppard, C., Andrews, N., et al (2014). *Pneumococcal carriage in children and adults two years after introduction of the thirteen valent pneumococcal conjugate vaccine in England*. Vaccine, 32, 4349–4355.
3. Oligbu, G., Fry, N., Ladhani, S. (2019). The Pneumococcus and Its Critical Role in Public Health. In: Iovino F. (eds.) *Streptococcus pneumoniae. Methods in Molecular Biology*, 17, 205-213.
4. Donkor, E. (2013). *Understanding the pneumococcus: transmission and evolution*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 3, 1-5.
5. Lucas, M., et al (2016). *Neurological sequelae of bacterial meningitis*. Journal of Infection, 73, 18-27.
6. Chamkhaleh, M., Esteghamati, A., Sayyahfar, S., et al. (2020). *Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae among healthy carriers and clinical patients: a systematic review from Iran*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03963-z>
7. World Health Organization (2018). *Pneumococcus*. Vaccine-Preventable Diseases Surveillance Standards. WHO, 1-14.
8. Song, J., Nahm, M., Moseley, M. (2013). *Clinical Implications of Pneumococcal Serotypes: Invasive Disease Potential, Clinical Presentations, and Antibiotic Resistance*. Infectious Diseases, Microbiology & Parasitology, 28, 4-15.
9. Daniels, C., Rogers, D., Shelton, C. (2016). *A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens*. Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics, 21, 27-35.
10. Kraicer-Melamed, H., O'Donnell, S., Quach, C. (2016). *The effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine 23 (PPV23) in the general population of 50 years of age and older: A systematic review and meta-analysis*. Vaccine, 34, 1540-1550.
11. Papadatou, I., Spoulou, V. (2016). *Pneumococcal Vaccination in High-Risk Individuals: Are We Doing It Right?*. Clinical and Vaccine Immunology, 23, 388-395.
12. Briles, D., Paton, J., Mukerji, R., et al (2019). *Pneumococcal Vaccines*. Microbiology Spectrum, 7, 1-20.
13. Aguiar, S., Serrano, I., Pinto, F., et al (2008). *Changes in Streptococcus pneumoniae serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine*. Clinical Microbiology and Infection, 14, 835-843.
14. Horácio, A., Silva-Costa, C., Lopes, J., et al (2016). *Serotype 3 Remains the Leading Cause of Invasive Pneumococcal Disease in Adults in Portugal (2012–2014) Despite Continued Reductions in Other 13-Valent Conjugate Vaccine Serotypes*. Frontiers in Microbiology, 7, 1-11.
15. Silva-Costa, C., Brito, M., Aguiar, S., et al (2019). *Dominance of vaccine serotypes in pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal (2012–2015)*. Scientific Reports, 9, 1-9.
16. Horácio, A., Silva-Costa, C., Diamantino-Miranda, J., et al (2016). *Population Structure of Streptococcus pneumoniae Causing Invasive Disease in Adults in Portugal before PCV13*

- Availability for Adults: 2008-2011.* PLoS ONE, 11. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153602>
17. Silva-Costa, C., Brito, M., Pinho, M., et al (2018). *Pediatric Complicated Pneumonia Caused by Streptococcus pneumoniae Serotype 3 in 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccinees, Portugal, 2010–2015.* Emerging Infectious Diseases, 24, 1307-1314.
 18. Horácio, A., Silva-Costa, C., Lopes, E., et al (2018). *Conjugate vaccine serotypes persist as major causes of non-invasive pneumococcal pneumonia in Portugal despite declines in serotypes 3 and 19A (2012-2015).* PLoS ONE 13. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206912>
 19. Wahl, B., O'Brien, K., Greenbaumet, A., al (2018). *Burden of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15.* Lancet Global Health, 6, 744-757.
 20. Feldman, C., Anderson, R. (2020). *Recent advances in the epidemiology and prevention of Streptococcus pneumoniae infections.* F1000Research, 9, 338-347.
 21. Bartlett, J. (2004). *Decline in microbial studies for patients with pulmonar infections.* Clinical Infectious Diseases, 39, 170–172.
 22. Werno, A., Murdoch, D. (2008). *Laboratory Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease.* Clinical Infectious Diseases, 46, 926-932.
 23. Sutcliffe, C., Grant, L., Cloessner, E., et al (2019). *Impact of Laboratory Methods, Colonization Density and Age on Detection of Streptococcus pneumoniae in the Nasopharynx.* Oxford University Press, 1-10.
 24. Remington, L., Sligl, W. (2014). *Community-acquired pneumonia.* Current Opinion in Pulmonary Medicine, 20, 215-224.
 25. Blaschke, A. (2011). *Interpreting Assays for the Detection of Streptococcus pneumoniae.* Clinical Infectious Diseases, 52, S331–S337.
 26. Ogawa, H., Kitsios, G., Iwataet , M., et al (2020). *Sputum Gram Stain for Bacterial Pathogen Diagnosis in Community-acquired Pneumonia: A Systematic Review and Bayesian Meta-analysis of Diagnostic Accuracy and Yield.* Clinical Infectious Diseases, 71, 499-513.
 27. World Health Organization (2011). *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitides, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae.* Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70765>
 28. Yahiaoui, R., den Heijer, C., Wolfset, P., al (2016). *Evaluation of phenotypic and molecular methods for identification of Streptococcus pneumoniae.* Future Microbiology, 11, 43-50.
 29. Sadowy, E., Hryniewicz, W. (2020). *Identification of Streptococcus pneumoniae and other Mitis streptococci: importance of molecular methods.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 39, 2247-2256.
 30. Aguiar, S., Frias, M., Santos, L., et al (2006). *Emergence of Optochin Resistance Among Streptococcus pneumoniae in Portugal.* Microbial Drug Resistance, 12, 239-245.
 31. Doern, C., Burnham, C. (2010). *It's Not Easy Being Green: the Viridans Group Streptococci, with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations.* Journal of Clinical Microbiology, 48, 3829-3835.
 32. Varádi, L., Luo, J., Hibbs, D., et al (2017). *Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future.* Royal Society of Chemistry, 46, 4818-4832.
 33. Sanz, J., Ríos, E., Rodríguez-Avial, I., et al (2018). *Identification of Streptococcus pneumoniae lytA, plyA and psaA genes in pleural fluid by multiplex real-time PCR.* Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 36, 428-430.

34. Jang, K., Kim, Y. (2018). *Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications*. Journal of Microbiology, 56, 209-216.
35. Yahiaoui, R., Goessens, W., Stobberinghet, E., et al (2020). *Differentiation between Streptococcus pneumoniae and other viridans group streptococci by Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*. Clinical Microbiology and Infection, 26, 1088.e1-1088.e5.
36. Palavecino, E., Williamson, J., Ohl, C. (2020). *Collaborative Antimicrobial Stewardship Working with Microbiology*. Infectious Disease Clinics of North America, 34, 51-65.
37. Hou, T., Chiang-Ni, C., Teng, S. (2019). *Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology*. Journal of Food and Drug Analysis, 27, 404-414.
38. Altun, O., Botero-Kleiven, S., Carlsson, S., et al (2015). *Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media*. Journal of Medical Microbiology, 64, 1346–1352.
39. Chen, J., She, K., Wong, O., et al (2015). *Use of MALDI Biotyper plus ClinProTools mass spectra analysis for correct identification of Streptococcus pneumoniae and Streptococcus mitis/oralis*. Journal of Clinical Pathology, 68, 652-656.
40. Marin, M., Cercenado, E., Sánchez-Carrillo, C., et al (2017). *Accurate Differentiation of Streptococcus pneumoniae from other Species within the Streptococcus mitis Group by Peak Analysis Using MALDI-TOF MS*. Frontiers in Microbiology, 8, 2-7.
41. Farfour, E., Degand, N., Muggeo, A., et al (2020). *Accurate identification of S. pneumoniae using MALDI-TOF mass spectrometry, still a challenge for clinical laboratories? – Letter to the Editor*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 39, 209-211.
42. Viasus, D., Calatayud, L., McBrown, M., et al (2019). *Urinary antigen testing in community-acquired pneumonia In adults: an update*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 17, 107-115.
43. Euser, S., Badoux, P., Kracht-Kosten, L., et al (2018). *Evaluation of the Sofia Streptococcus pneumoniae FIA test for the detection of S. pneumoniae antigen in urine*. Journal of Medical Microbiology, 67, 1743–1746.
44. Laijen, W., Snijders, D., Boersma, W. (2017). *Pneumococcal urinary antigen test: diagnostic yield and impact on antibiotic treatment*. The Clinical Respiratory Journal, 11, 999-1005.
45. Marimón, J., Morales, M., Cilla, G., et al (2015). *Detection of bacteria and viruses in the pleural effusion of children and adults with community-acquired pneumonia*. Future Microbiology, 10, 909-915.
46. Man, M., Shum, H., Yuet, J., et al (2020). *Burden of pneumococcal disease: 8-year retrospective analysis from a single centre in Hong Kong*. Hong Kong Medical Journal, 26, 372-381.
47. Marimón, J., Navarro-Marí, J. (2017). *Métodos de diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 35, 108-115.
48. Mukae, H., Yatera, K., Noguchi, S., et al (2015). *Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting Streptococcus pneumoniae antigens in the sputum of pneumonia patients with positive S. pneumoniae urinary antigens*. Journal of Infection and Chemotherapy, 21, 176-181.
49. Boulos, A., Fairley, D., McKenna, J., et al (2017). *Evaluation of a rapid antigen test for detection of Streptococcus pneumoniae in cerebrospinal fluid*. Journal of Clinical Pathology, 70, 448-450.
50. Baggett, H., Rhodes, J., Dejsirilert, S., et al (2012). *Pneumococcal antigen testing of blood culture broth to enhance the detection of Streptococcus pneumoniae bacteremia*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 31, 753-756.

51. Flores, J., Moro, M., Berrón, S., et al (2010). *Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural effusion for the rapid diagnosis of infection by Streptococcus pneumoniae*. European Journal of Pediatrics, 169, 581-584.
52. Burgos, J., Garcia-Pérez, J., di Lauro, S., et al (2018). *Usefulness of Sofia Pneumococcal FIA® test in comparison with BinaxNOW® Pneumococcal test in urine samples for the diagnosis of pneumococcal pneumonia*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 37, 1289-1295.
53. Krenke, K., Sadowy, E., Podsiadły, E., et al (2016). *Etiology of parapneumonic effusion and pleural empyema in children. The role of conventional and molecular microbiological tests*. Respiratory Medicine, 116, 28-33.
54. LaPenna, P., Roos, K. (2019). *Bacterial Infections of the Central Nervous System*. Seminars in Neurology, 39, 334-342.
55. Saukkoriipi, A., Palmu, A., Pascal, T., et al (2018). *lytA Quantitative PCR on Sputum and Nasopharyngeal Swab Samples for Detection of Pneumococcal Pneumonia among the Elderly*. Journal of Clinical Microbiology, 56. Disponível em <https://doi.org/10.1128/JCM.01231-17>
56. Zheng, W., Tan, T., Paterson, I., et al (2016). *StreptoBase: An Oral Streptococcus mitis Group Genomic Resource and Analysis Platform*. PLoS ONE, 11, 1-19.
57. van Prehn, J., van Veen, S., Schelfaut, J., et al (2016). *MALDI-TOF Mass Spectrometry for Differentiation between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pseudopneumoniae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 85, 9-11.
58. Varghese, R., Jayaraman, R., Veeraraghavan, B. (2017). *Current challenges in the accurate identification of Streptococcus pneumoniae and its serogroups/serotypes in the vaccine era*. Journal of Microbiological Methods, 141, 48-54.
59. Tavares, D., Handem, S., Carvalho, R., et al (2019). *Identification of Streptococcus pneumoniae by a real-time PCR assay targeting SP2020*. Scientific Reports, 9, 3285. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39791-1>
60. Simões, A., Tavares, D., Rolo, D., et al (2016). *lytA-based identification methods can misidentify Streptococcus pneumoniae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, 85, 141-148.
61. Luznik, D., Kosnik, M., Tomic, V. (2015). *Comparison of Seeplex PneumoBacter ACE Detection assay and in-house multiplex PCR for the identification of Streptococcus pneumoniae*. New Microbiologica, 38, 51-58.
62. Croxen, M., Lee, T., Azana, R., et al (2018). *Use of genomics to design a diagnostic assay to discriminate between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pseudopneumoniae*. Microbial Genomics, 4. Disponível em <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000175>
63. Rodrigues, C., Groves, H. (2018). *Community-Acquired Pneumonia in Children: the Challenges of Microbiological Diagnosis*. Journal of Clinical Microbiology, 56. Disponível em <https://doi.org/10.1128/JCM.01318-17>
64. Pizzutti, K., Perez, V., Barbiero, C., et al (2019). *Identifying pneumococci in parapneumonic pleural effusion: Is there a role for culture-independent methods?*. Pediatric Pulmonology, 55, 484-489.
65. Rayner, R., Savill, J., Hafner, L., et al (2015). *Genotyping Streptococcus pneumoniae*. Future Microbiology, 10, 653-664.
66. Sadowy, E., Bojarska, A., Kuch, A., et al (2020). *Relationships among streptococci from the mitis group, misidentified as Streptococcus pneumoniae*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 39, 1865-1878.

67. Pérez-Losada, M., Arenas, M., Castro-Nallar, E. (2018). *Microbial Sequence Typing in the Genomic Era*. Infection, Genetics and Evolution, 63, 346-359.
68. Jolley, K., Maiden, M. (2014). *Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era*. Future Microbiology, 9, 623-630.
69. Maiden, M., van Rensburg, M., Bray, J., et al (2013). *MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial Genomics*. Nature Reviews Microbiology, 11, 728-736.
70. Jauneikaite, E., Tocheva, A., Jefferies, J., et al (2015). *Current methods for capsular typing of Streptococcus pneumoniae*. Journal of Microbiological Methods, 113, 41-49.
71. Ercibengoa, M., Alonso, M., Vicente, D., et al (2019). *Utility of MALDI-TOF MS as a new tool for Streptococcus pneumoniae serotyping*. PLoS ONE, 14. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212022>
72. Benkova, M., Soukup, O., Marek, J. (2020). *Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice*. Journal of Applied Microbiology, 129, 806-822.
73. Melo-Cristino, J., Santos, L., Silva-Costa, C., et al (2010). *The Viriato Study - Update on Antimicrobial Resistance of Microbial Pathogens Responsible for Community-Acquired Respiratory Tract Infections in Portugal*. Pediatric Drugs, 12, 11-17.
74. DGS (2011). *Antibioterapia na Pneumonia Adquirida na Comunidade em Adultos Imunocompetentes*. Norma nº 45/2011 de 26 de dezembro.
75. Cherazard, R., Epstein, M., Doan, T., et al (2017). *Antimicrobial Resistant Streptococcus pneumoniae: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications*. American Journal of Therapeutics, 24, e361-e369.
76. Wunderink, R., Yin, Y. (2016). *Antibiotic Resistance in Community-Acquired Pneumonia Pathogens*. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 37, 829-838.
77. van de Beek, D., Cabellos, C., Dzunpova, O., et al (2016). *ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis*. Clinical Microbiology and Infection, 22, S37-S62.
78. Melo-Cristino, J., Ramirez, M., Serrano, N., et al (2003). *Macrolide Resistance in Streptococcus pneumoniae Isolated from Patients with Community-Acquired Lower Respiratory Tract Infections in Portugal: Results of a 3-Year (1999–2001) Multicenter Surveillance Study*. Microbial Drug Resistance, 9, 73-80.
79. Schroeder, M., Stephens, D. (2016). *Macrolide Resistance in Streptococcus pneumoniae*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 6. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00098>
80. Rosselló, G., Pérez, M. (2014). *Antibiograma rápido en Microbiología Clínica*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 34, 61-68.
81. Ellington, M., Ekelund, O., Aarestrup, F., et al (2017). *The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee*. Clinical Microbiology and Infection, 23, 2-22.
82. Morcom, S., Phillips, N., Pastuszek, A., et al (2016). *Sinusitis*. Australian Family Physician, 45, 374-377.
83. Ebell, M., McKay, B., Dale, A., et al (2019). *Accuracy of Signs and Symptoms for the Diagnosis of Acute Rhinosinusitis and Acute Bacterial Rhinosinusitis*. Annals of Family Medicine, 17, 164-172.
84. Patel, Z., Hwang, P. (2018). *Acute Bacterial Rhinosinusitis*. In Durand, M., Deschler, D. (eds.) *Infections of the Ears, Nose, Throat, and Sinuses*. Springer International Publishing, 133-143.

85. Suwannawong, D., Seresirikachorn, K., Aejumjaturapat, S., et al (2020). *Predicting bacteria causing acute bacterial rhinosinusitis by clinical features*. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, 86, 281-286.
86. Rosenfeld, R. (2016). *Acute Sinusitis in Adults*. New England Journal of Medicine, 375, 962-970.
87. Sivasubramaniam, R., Douglas, R. (2018). *The microbiome and chronic rhinosinusitis*. World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery, 4, 216-221.
88. Lemienre, M., van Driel, M., Merenstein, D., et al (2018). *Antibiotics for acute rhinosinusitis in adults (Review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 9, 1-80.
89. Gluck, O., Marom, T., Shemesh, S., et al (2018). *Adult acute rhinosinusitis guidelines worldwide: similarities and disparities*. International Forum of Allergy & Rhinology, 8, 939-947.
90. Vukoje, N., Garito, J. (2018). *Puncture of the Maxillary Sinus: When, How and Why?*. Global Journal of Otolaryngology, 17, 24-27.
91. Benninger, M., Payne, S., Ferguson, B., et al (2006). *Endoscopically Directed Middle Meatal Cultures Versus Maxillary Sinus Taps in Acute Bacterial Maxillary Rhinosinusitis: A Meta-Analysis*. Otolaryngology–Head and Neck Surgery, 134, 3-9.
92. Thunberg, U., Engström, K., Olaison, S., et al (2013). *Anterior rhinoscopy and middle meatal culture in acute rhinosinusitis*. Journal of Laryngology & Otology, 127, 1088-1092.
93. Smith, S., Ference, E., Evans, C., et al (2015). *The prevalence of bacterial infection in acute rhinosinusitis: A systematic review and meta-analysis*. Laryngoscope, 125, 57–69.
94. Karunasagar, A., Jalastagi, R., Naik, A., et al (2018). *Detection of Bacteria by 16S rRNA PCR and Sequencing in Culture-Negative Chronic Rhinosinusitis*. Laryngoscope, 128, 2223-2225.
95. Song, C., Chorath, J., Pak, Y., et al (2019). *Use of Dipstick Assay and Rapid PCR-DNA Analysis of Nasal Secretions for Diagnosis of Bacterial Sinusitis in Children With Chronic Cough*. Allergy & Rhinology, 10. Disponível em <https://doi.org/10.1177/2152656718821281>
96. Boers, S., Jansen, R., Hays, J. (2019). *Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38, 1059-1070.
97. Vergison, A., Dagan, R., Arguedas, A., et al (2010). *Otitis media and its consequences: beyond the earache*. The Lancet Infectious Diseases, 10, 195-203.
98. Qureshi, A., Lee, Y., Belfield, K., et al (2014). *Update on otitis media – prevention and treatment*. Infection and Drug Resistance, 7, 15-24.
99. Gaddey, H., Wright, M., Nelson, T. (2019). *Otitis Media: Rapid Evidence Review*. American Family Physician, 100, 350-356.
100. Lieberthal, A., Carroll, A., Chonmaitree, T., et al (2013). *The diagnosis and management of acute otitis media*. Pediatrics, 131, e964-e999.
101. Bergenfelz, C., Hakansson, A. (2017). *Streptococcus pneumoniae Otitis Media Pathogenesis and How It Informs Our Understanding of Vaccine Strategies*. Current Otorhinolaryngology Reports, 5, 115–124.
102. Cilveti, R., Olmo, M., Pérez-Jove, J., et al (2017). *Epidemiology of Otitis Media with Spontaneous Perforation of the Tympanic Membrane in Young Children and Association with Bacterial Nasopharyngeal Carriage, Recurrences and Pneumococcal Vaccination in Catalonia, Spain - The Prospective HERMES Study*. PLoS ONE, 12. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170316>

103. Ngo, C., Massa, H., Thornton, R., et al (2016). *Predominant Bacteria Detected from the Middle Ear Fluid of Children Experiencing Otitis Media: A Systematic Review*. PLoS ONE, 11. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150949>
104. Jervis-Bardy, J. Carney, A., Duguid, R., et al (2017). *Microbiology of otitis media in Indigenous Australian children: review*. The Journal of Laryngology & Otology, 131, S2-S11.
105. Paço, J. (2010). *Otitis na Prática Clínica, Guia de Diagnóstico e Tratamento*. Queluz: Círculo Médico - Comunicação e Design.
106. Marchisio, P., Galli, L., Bortone, B., et al (2019). *Updated Guidelines for the Management of Acute Otitis Media in Children by the Italian Society of Pediatrics, Treatment*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 38, S10-S21.
107. Marchisio, P., Bortone, B., Ciarcia, M., et al (2019). *Updated Guidelines for the Management of Acute Otitis Media in Children by the Italian Society of Pediatrics, Prevention*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 38, S22-S36.
108. Principi, N., Marchisio, P., Rosazza, C., et al (2017). *Acute otitis media with spontaneous tympanic membrane perforation*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 36, 11-18.
109. DGS (2020). *Vacinação contra a gripe. Época 2020/2021*. Norma 016/2020 de 25 de setembro.
110. Dagan, R., Pelton, S., Bakaletz, L., et al (2016). *Prevention of early episodes of otitis media by pneumococcal vaccines might reduce progression to complex disease*. The Lancet Infectious Diseases, 16, 480-492.
111. Fortanier, A., Venekamp, R., Boonacker, C., et al (2020). *Pneumococcal conjugate vaccines for preventing acute otitis media in children (Review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 5. Disponível em <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001480.pub5>
112. Mittal, R., Parrish, J., Soni, M., et al (2018). *Microbial otitis media: recent advancements in treatment, current challenges and opportunities*. Journal of Medical Microbiology, 67, 1417-1425.
113. Levy, C., Varon, E., Ouldali, N., et al (2019). *Bacterial causes of otitis media with spontaneous perforation of the tympanic membrane in the era of 13 valent pneumococcal conjugate vaccine*. PLoS ONE, 14. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211712>
114. Grevers, G., Wiedemann, S., Bohn, C., et al (2012). *Identification and characterization of the bacterial etiology of clinically problematic acute otitis media after tympanocentesis or spontaneous otorrhea in German children*. BMC Infectious Diseases, 12. Disponível em <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-312>
115. Zielnik-Jurkiewicz, B., Bielicka, A. (2015). *Antibiotic resistance of Streptococcus pneumoniae in children with acute otitis media treatment failure*. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 79, 2129-2133.
116. Slovik, Y., Raiz, S., Leiberman, A., et al (2008). *Rates of Tympanic Membrane Closure in Double-Tympanocentesis Studies*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 27, 490-493.
117. Samuel Flymana, S., Hermansson, A., Gisselsson-Solén, M. (2020). *Nasopharyngeal cultures in children; when, what and why?*. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 130. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2019.109832>
118. Kaur, R., Czup, K., Casey, J., et al (2014). *Correlation of nasopharyngeal cultures prior to and at onset of acute otitis media with middle ear fluid cultures*. BMC Infectious Diseases, 14. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0640-y>

119. Shoar, S., Musher, D. (2020). *Etiology of community-acquired pneumonia in adults: a systematic review*. *Pneumonia*, 12, 1-10.
120. Vesna, C., Hadzic, A. (2016). *The Most Common Detected Bacteria in Sputum of Patients with Community Acquired Pneumonia (CAP) Treated In Hospital*. *Journal of the Academy of Medical Sciences of Bosnia and Herzegovina*, 70, 354-358.
121. Said, M., Johnson, H., Nonyane, B., et al (2013). *Estimating the Burden of Pneumococcal Pneumonia among Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Techniques*. *PLoS ONE*, 8. Disponível em [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0060273](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060273)
122. Wagenvoort, G., Sanders, E., de Melker, H., et al (2017). *Long-term mortality after IPD and bacteremic versus non-bacteremic pneumococcal pneumonia*. *Vaccine*, 35, 1749-1757.
123. van Mens, S., van Deursen, A., de Greeff, S., et al (2015). *Bacteraemic and non-bacteraemic/urinary antigen-positive pneumococcal community-acquired pneumonia compared*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, 115–122.
124. Capelastegui, A., Zalacain, R., Bilbao, A., et al (2014). *Pneumococcal pneumonia: differences according to blood culture results*. *BMC Pulmonary Medicine*, 14. Disponível em <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-128>.
125. Laupland, K. (2013). *Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies*. *Clinical Microbiology and Infection*, 19, 492–500.
126. Bartlett, J. (2011). *Diagnostic Tests for Agents of Community - Acquired Pneumonia*. *Clinical Infectious Diseases*, 52, S296-S304.
127. Clark, J. (2014). *Determining the microbiological cause of a chest infection*. *Archives of Disease in Childhood*, 100. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2013-305742>
128. Feikin, D., Hammitt, L., Murdoch, D., et al (2017). *The Enduring Challenge of Determining Pneumonia Etiology in Children: Considerations for Future Research Priorities*. *Clinical Infectious Diseases*, 64, S188–S196.
129. Hammitt, L., Murdoch, D., Scott, J., et al (2012). *Specimen Collection for the Diagnosis of Pediatric Pneumonia*. *Clinical Infectious Diseases*, 54, S132-S139.
130. Ebruke, B., Knoll, M., Haddix, M., et al (2020). *The Aetiology of pneumonia from analysis of Lung aspirate and Pleural fluid samples: Findings from the PERCH study*. *Clinical Infectious Diseases*, ciaa1032. Disponível em [https://doi.org/ 10.1093/cid/ciaa1032](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1032)
131. Forstner, C., Patchev, V., Rohde, G., et al (2019). *Rate and predictors of bacteremia in afebrile community-acquired pneumonia*. *Chest*, 157, 529-539.
132. Metlay, J., Waterer, G., Long, A., et al (2019). *Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200, e45-e67.
133. Neuman, M., Hall, M., Lipsett, S., et al (2017). *Utility of Blood Culture Among Children Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia*. *Pediatrics*, 140. Disponível em <https://doi.org/10.1542/peds.2017-1013>
134. Zhang, D., Yang, D., Makam, A. (2019). *Utility of Blood Cultures in Pneumonia*. *The American Journal of Medicine*, 132, 1233–1238.
135. Opota, O., Croxatto, A., Prod'hom, G., et al (2015). *Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art*. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 313–322.
136. Driscoll, A., Knoll, M., Hammitt, L., et al (2017). *The Effect of Antibiotic Exposure and Specimen Volume on the Detection of Bacterial Pathogens in Children With Pneumonia*. *Clinical Infectious Diseases*, 64, S368-S377.

137. Blake, A., Njanpop-Lafourcade, B., Telles, J., et al (2017). *Evaluation of chest radiography, lytA real-time PCR, and other routine tests for diagnosis of community-acquired pneumonia and estimation of possible attributable fraction of pneumococcus in northern Togo*. *Epidemiology and Infection*, 145, 583–594.
138. Tam, P., Bernstein, E., Ma, X., et al (2015). *Blood Culture in Evaluation of Pediatric Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Hospital Pediatrics*, 5, 324-336.
139. Murphy, J., O' Rourke, S., Corcoran, M., et al (2018). *Evaluation of the Clinical Utility of a Real-time PCR assay for the Diagnosis of Streptococcus pneumoniae Bacteremia in Children: a Retrospective Diagnostic Accuracy Study*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 37, 153-156.
140. Huang, W., Lee, M., Lin, L., et al (2020). *Diagnostic performance of the Sputum Gram Stain in predicting sputum culture results for critically ill pediatric patients with pneumonia*. *Pediatrics and Neonatology*, 61, 420-425.
141. Harris, A., Bramley, A., Jain, S., et al (2017). *Influence of Antibiotics on the Detection of Bacteria by Culture-Based and Culture-Independent Diagnostic Tests in Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia*. *Open Forum Infectious Diseases*, 4. Disponível em <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx014>
142. Murdoch, D., O'Brien, K., Driscoll, A., et al (2012). *Laboratory Methods for Determining Pneumonia Etiology in Children*. *Clinical Infectious Diseases*, 54, S146-S152.
143. Murdoch, D., Morpeth, S., Hammitt, L., et al (2017). *Microscopic Analysis and Quality Assessment of Induced Sputum From Children With Pneumonia in the PERCH Study*. *Clinical Infectious Diseases*, 64, S271–S279.
144. Saukkoriipi, A., Palmu, A., Jokinen, J. (2019). *Culture of all sputum samples irrespective of quality adds value to the diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in the elderly*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 1249–1254.
145. Del Rio-Pertuz, G., Gutiérrez, J., Triana, A., et al (2019). *Usefulness of sputum gram stain for etiologic diagnosis in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Infectious Diseases*, 19. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4048-6>
146. Albrich, W., Madhi, S., Adrian, P., et al (2014). *Genomic Load from Sputum Samples and Nasopharyngeal Swabs for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia in HIV-Infected Adults*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 4224 – 4229.
147. Strålin, K., Herrmann, B., Abdeldaim, G., et al (2014). *Comparison of Sputum and Nasopharyngeal Aspirate Samples and of the PCR Gene Targets lytA and Spn9802 for Quantitative PCR for Rapid Detection of Pneumococcal Pneumonia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 83– 89.
148. DeLuca, A., Hammitt, L., Kim, J., et al (2017). *Safety of Induced Sputum Collection in Children Hospitalized With Severe or Very Severe Pneumonia*. *Clinical Infectious Diseases*, 64, S301-S308.
149. Tsai, C., Wong, K., Lee, W., et al (2017). *Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in children with nonresponding community-acquired pneumonia*. *Pediatrics and Neonatology*, 58, 430-436.
150. Vernet, G., Saha, S., Satzke, C., et al (2011). *Laboratory-based diagnosis of pneumococcal pneumonia: state of the art and unmet needs*. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1-13. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03496.x>
151. Porcel, J., Azzopardi, M., Koegelenberg, C., et al (2015). *The diagnosis of pleural effusions*. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 9, 801-815.
152. Wedzicha, J. (ed.), (2010). *BTS Pleural Disease Guideline 2010*. *Journal of the British Thoracic Society*, 65. Disponível em <http://www.brit-thoracic.org.uk>

153. Herrero, D., Soler-Palacin, P., Cibrian, J., et al (2020). *Detection of Streptococcus pneumoniae antigen in pleural fluid: usefulness of an immunofluorescence-based lateral flow assay for the diagnosis of pneumococcal pneumonia*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 98. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115162>
154. van de Beek, D., Brouwer, M., Hasbun, R., et al (2016). *Community-acquired bacterial meningitis*. Nature Reviews Disease Primers, 2. Disponível em <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.74>
155. Davis, L. (2018). *Acute Bacterial Meningitis*. Continuum (Neuroinfectious Disease), 24, 1264-1283.
156. Wagner, K., Springer, B., Pires, V., et al (2018). *Pathogen Identification by Multiplex LightMix Real-Time PCR, Assay in Patients with Meningitis and Culture-Negative, Cerebrospinal Fluid Specimens*. Journal of Clinical Microbiology, 56. Disponível em <https://doi.org/10.1128/JCM.01492-17>
157. McGill, F., Heyderman, R., Panagiotou, S., et al (2016). *Acute bacterial meningitis in adults*. Lancet, 388, 3036-3047.
158. Brouwer, M., van de Beek, D. (2018). *Epidemiology of community-acquired bacterial meningitis*. Current Opinion in Infectious Diseases, 31, 78-84.
159. Figueiredo, A., Brouwer, M., van de Beek, D. (2018). *Acute Community-Acquired Bacterial Meningitis*. Neurologic Clinics, 36, 809-820.
160. Brouwer, M., Tunkel, A., van de Beek, D. (2010). *Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis*. Clinical Microbiology Reviews, 23, 467–492.
161. Bahr, N. & Boulware, D. (2014). *Methods of rapid diagnosis for the etiology of meningitis in adults*. Biomarkers in Medicine, 8, 1085–1103.
162. Young, N., Thomas, M. (2018). *Meningitis in adults: diagnosis and management*. Internal Medicine Journal, 48, 1294–1307.
163. van Ettehoven, C., van de Beek, D., Brouwer, M. (2017). *Update on community-acquired bacterial meningitis: guidance and challenges*. Clinical Microbiology and Infection, 23, 601-606.
164. Brinka, M., Welinder-Olsson, C. & Hagberga, L. (2015). *Time window for positive cerebrospinal fluid broad-range bacterial PCR and Streptococcus pneumoniae immunochromatographic test in acute bacterial meningitis*. Infectious Diseases, 47, 869-877.
165. Wu, H., Cordeiro, S., Harcourt, B., et al (2013). *Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis and Haemophilus influenza meningitis diagnosis*. BMC Infectious Diseases, 13. Disponível em <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-26>
166. Amidu, N., Antuamwine, B., Addai-Mensah, O., et al (2019). *Diagnosis of bacterial meningitis in Ghana: Polymerase chain reaction versus latex agglutination methods*. PLoS ONE, 14. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210812>
167. Tansarli, G., Chapin, K., (2020). *Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis*. Clinical Microbiology and Infection, 36, 281-290.
168. Houlihan, C., Bharucha, T., & Breuer, J. (2019). *Advances in molecular diagnostic testing for central nervous system infections*. Current Opinion in Infectious Diseases, 32, 244-250.