ELIANE PESSOA DA SILVA

Desenvolvimento de teste rápido, usando "*dipsticks*", para diagnóstico de *Streptococcus pnemoniae*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Waldely de Oliveira Dias

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

SILVA, E. P**. Desenvolvimento de teste rápido, usando "*dipsticks*", para diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*.** 2014. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Doenças invasivas causadas por *S. pneumoniae* provocam cerca de 1,5 milhões de mortes anuais de crianças no mundo. Testes imunocromatográficos rápidos (*dipsticks*) são alternativos a métodos diagnósticos tradicionais, devido à fácil execução e baixo custo. Neste estudo foram desenvolvidos *dipsticks* para diagnóstico de *S. pneumoniae* utilizando: **anticorpos de captura - monoclonais anti-pneumolisina recombinante (Ply)** - AcMs D9-43 e E10-24, reativos contra 21 sorotipos prevalentes de *S. pneumoniae*; **anticorpos de detecção (conjugados com diferentes partículas coloidais coloridas - corante têxtil, microesferas e nanopartículas de ouro) -** Igs anti-Ply e anti-vacina pneumocócica celular (em desenvolvimento no Instituto Butantan) (anti-WCPV). *Dipsticks* com anti-Ply ou anti-WCPV conjugados com ouro ou microesferas coloidais detectaram a bactéria em todos os sorotipos prevalentes avaliados, entre 10^4 e 10^5 UFC/ml e pneumolisina nativa, em sobrenadantes de cultivo de *S. pneumoniae,* até uma concentração estimada ≤ 19,3 ng/ml e 9.7 ng/ml, respectivamente. Os resultados foram visualizados em aproximadamente 10 min.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae. Dipstick.* Partículas coloidais. Diagnóstico.

ABSTRACT

SILVA, E. P. **Development of rapid test using "dipsticks" for diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*.** 2014. 109 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Invasive diseases caused by *S. pneumoniae* are responsible for about 1.5 million child deaths per year worldwide. Rapid Immunochromatographic tests (dipsticks) are alternative to traditional diagnostic methods due to easy execution and low cost. In this study, dipsticks have been developed for diagnosis of *S. pneumoniae* using: **capture antibodies** - monoclonal anti- recombinant pneumolysin (Ply), MAbs D9-43 and E10-24, reactive against 21 prevalent serotypes of *S. pneumoniae*; **detection antibodies (conjugated with different colored colloidal particles - textile dye; microspheres and gold nanoparticles)** - anti-Ply and anti–whole cell pneumococcal vaccine (in developing in the Butantan Institute) (anti- WCPV). Dipsticks with anti-Ply or anti-WCPV conjugated with colloidal gold or microspheres detected the bacterium in all the evaluated prevalent serotypes, between 10^4 e 10^5 CFU/ml, and native pneumolysin in culture supernatants of *S. pneumoniae* to an estimated concentration ≤ 19.3 ng/ml and 9.7 ng/ml, respectively. The results could be visualized in around 10 min.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae. Dipstick.* Colloidal particles. Diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

O *Streptococcus pnemoniae*, também conhecido como pneumococo, é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram positiva, em formato de diplococo ou cadeias curtas lanceoladas, quando visualizada em microscopia. O pneumococo não possui esporos, vacúolos ou flagelos. Sua morfologia, quando analisada em colônias crescidas em agar sangue é geralmente lisa e brilhante, podendo apresentar variação fenotípica quanto à opacidade, em alguns sorotipos (JENNINGS et al., 1980). Essa variação está associada a múltiplos determinantes de superfície, que podem contribuir com a capacidade do microrganismo de interagir com o hospedeiro (KIM; WEISER, 1998).

A superfície do pneumococo consiste de três estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica.

A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica típica contendo proteínas e moléculas de ácido teicóico associadas a resíduos de fosfocolina (MURRAY et al., 2009). A parede celular possui uma espessa camada de peptideoglicano formada por cadeias de polissacarídeos que alternam N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico, interligadas por cadeias de oligopeptídeos que determinam ligações cruzadas por intermédio de pontes de pentaglicina e diversas proteínas e moléculas de ácido teicóico ancoradas em sua superfície (MURRAY et al., 2009; RAW; MARTINS, 2006). O ácido teicóico exposto estende-se através da camada de peptideoglicano sobrejacente, sendo um determinante específico do pneumococo, denominado polissacarídeo C, que precipita uma globulina sérica (Proteína C), na presença de cálcio (MURRAY et al., 2009); também possui resíduos de colina e é responsável pela intensa resposta inflamatória observada na infecção por pneumococo (DAWSON et al., 2004).

Os pneumococos ainda possuem uma cápsula formada por polímeros de 2-8 subunidades de oligossacarídeos, os quais determinam diferentes sorotipos (RAW; MARTINS, 2006).

O *Streptococcus pneumoniae* é um dos principais patógenos associados a doenças pneumocócicas invasivas, incluindo, sepse, meningite e mais frequentemente, a pneumonia,

além de doença primária de mucosa, como otite média (MOFFITT; MALLEY, 2011; WERNO; MURDOCH, 2008), estando entre as maiores causas de morbidade e mortalidade. Estima-se que o *S. pneumoniae* seja responsável por cerca de 1,5 milhão de mortes de crianças com menos de cinco anos de idade por ano no mundo (MUSHER, 1992; PEREZ-DORADO; GALAN-BARTUAL; HERMOSO, 2012; SCHUCHAT et al., 2001), com uma taxa de mortalidade de 5-22% na fase inicial da doença, sendo que grupos associados à etnia e distribuição geográfica estão incluídos como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças pneumocócicas (WHO, 2007).

A meningite é a apresentação mais severa da doença pneumocócica (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a). Mesmo em infecções por cepas totalmente suscetíveis à antibioticoterapia, ainda existe uma taxa de mortalidade de 10% em casos de pneumonia e 20-50% de meningite (BARICHELLO, 2012). Essa situação é pior quando a quimioterapia falha, devido a cepas resistentes. Com a ampla disponibilidade e uso excessivo de antibióticos, cepas multirresistentes a antibióticos de amplo espectro tornam-se cada vez mais predominantes. A antibioticoterapia em cepas resistentes acarreta elevação dos custos no tratamento de pacientes, devido ao aumento do tempo de permanência nas unidades hospitalares (QUACH et al., 2002).

O aumento de cepas resistentes deve-se em parte, à dificuldade de se distinguir a infecção respiratória bacteriana da viral, um problema particularmente importante em crianças. Um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde revelou que apenas 20% das infecções respiratórias necessitam de antibióticos, pelo que 80% dos doentes são tratados desnecessariamente, o que pode levar à emergência de cepas resistentes (WHO, 2000). O combate à resistência deve centrar-se particularmente na prevenção da doença através de campanhas de vacinação (MACHADO-SEQUEIRA, 2004) e na identificação rápida e adequada do microrganismo para a escolha do melhor tratamento (GOLDSTEIN; ACAR, 1996; LEE et al, 1991).

1.2 RELAÇÃO PARASITA- HOSPEDEIRO

Um importante determinante do sucesso ecológico do *S.pneumoniae* está na habilidade de se transferir de um hospedeiro para o outro em diferentes ambientes (DAGAN

et al., 1996). Dessa forma, muitos indivíduos podem ser colonizados por múltiplos sorotipos, que variam de acordo com a região geográfica, densidade populacional, condições socioeconômicas e faixa etária (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a).

A idade é um importante fator de risco para a taxa de colonização, sendo maior em crianças até dois anos de idade, decrescendo significativamente com o aumento da faixa etária e voltando a crescer novamente em idades mais avançadas (DAGAN et al., 1998; KADIOGLU et al., 2008). Em países em desenvolvimento, as taxas de colonização são muito elevadas. Em amostras seriadas tomadas a intervalos de 1-2 semanas, Gratten et al. (1994) mostraram que 60% das crianças em Papua, Nova Guiné, haviam adquirido *S. pneumoniae* (e *Haemophilus influenzae*) já durante o período neonatal e foram colonizadas por ambos os organismos nos primeiros três meses de vida. O prazo de colonização por pneumococo variou de 5 a 290 dias (média de 96 dias). Um terço das mães que não eram portadoras de pneumococos ou *H. influenzae*, tornaram-se subsequentemente colonizadas por essas bactérias adquiridas por seus bebês (GRATTEN et al., 1994).

Segundo Bogaert (2004a), toda doença pneumocócica começa com a colonização, isto é, a criação do estado de portador, e está associada às principais causas de infecções do trato respiratório e doenças invasivas. O estabelecimento da doença ocorre geralmente após a geração local de fatores inflamatórios, tais como interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF), desencadeados principalmente por infecções virais (KADIOGLU et al., 2008). As manifestações mais comuns associadas às doenças pneumocócicas incluem otite média aguda, pneumonia, meningite e bacteremia, que está associada à maior morbidade e mortalidade (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a; DAGAN et al., 1996).

A colonização experimental de adultos tem sido utilizada para investigar os fatores que afetam a suscetibilidade do indivíduo para aquisição de *S.pneumoniae,* revelando que a colonização induz à produção de imunoglobulina, tanto de mucosa quanto sistêmica (KADIOGLU et al., 2008; LIPSITCH et al, 2005). A resposta imune fraca de mucosa pode conduzir à colonização persistente e recorrente, e consequentemente, à infecção, enquanto que a resposta imune sistêmica pode eliminar o patógeno e prevenir a recolonização (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a; SIMELL et al., 2001). Tem sido observado em alguns estudos que anticorpos IgG e IgA dirigidos contra polissacarídeos capsulares e

proteínas associadas à superfície têm sido observados na saliva de crianças em resposta à colonização com *S pneumoniae* (SIMELL et al., 2001).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

1.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA

A cápsula polissacarídica (CPS) está presente em diversos patógenos extracelulares causadores de doenças invasivas, como meningites e bacteremias. É um dos principais fatores de virulência de diversos agentes etiológicos, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *Neisseria meningitidis* (SCOTT et al., 1996).

Os pneumococos são agrupados em 93 sorotipos identificados até o momento, com base na estrutura química e sorológica de diferentes polissacarídeos capsulares (RODGERS; KLUGMAN, 2011; SCOTT, et al., 1996). Sua patogenicidade está relacionada a mecanismos de inibição da opsonofagocitose, inibindo a ligação do componente C3b do complemento à superfície bacteriana, o que impede o reconhecimento de seus receptores por células fagocíticas (NELSON et al., 2007). A CPS também é crucial para a colonização do trato respiratório na fase inicial, pois impede a remoção mecânica do patógeno a partir do muco, podendo também restringir a autólise e reduzir o acesso de antibióticos (VARVIO et al., 2009). Entretanto, estudos *in vitro* sugerem que a cápsula também pode ser um obstáculo para a adesão das bactérias na superfície celular do hospedeiro, sendo as variantes “transparentes”, com quantidade reduzida de CPS, capazes de aderir melhor ao revestimento epitelial do trato respiratório do que as variantes “opacas” (BROWN, 1983; JONSSON et al., 1985; MITCHELL; MITCHELL, 2010; NELSON, 2007; VARVIO et al., 2009).

Apesar dos 93 sorotipos de polissacarídeos capsulares, a grande maioria das doenças pneumocócicas está associada a um número restrito de sorotipos. Os mais comuns associados a doenças pneumocócicas são: 3, 19, 14, 4, 6A, 6B, 7, 9N, 9V, 11, 12, 15A, 15F, 16, 18C, 19F, 22, 23a e 23b (BLASI et al., 2012), sendo os sorotipos 3, 6A, 6B, 9N e 19F associados a um maior risco de morte durante a pneumonia bacteriana (DOCKRELL; WHYTE; MITCHELL, 2012).

Em recente estudo epidemiológico conduzido por Andrade et al. (2012) no período de 2007 a 2009 em uma cidade do Brasil com crianças menores de cinco anos de idade, foi demonstrado que o sorotipo 14 respondeu por 45% dos isolados de *S.pneumoniae,* seguido por 6B, 18C, 23F, 3, 9V, 19A, e 19F. Em estudos anteriores, entre 1997 e 2001, os mesmos autores encontraram isolados invasivos prevalentes pertencentes aos sorotipos 14, 1, 5 e 6B (LAVAL et al., 2006), e um estudo de vigilância laboratorial em três cidades no Brasil, em 1993, identificou os sorotipos 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 19F, 19A e 23F como predominantes em isolados clínicos de doenças pneumocócicas invasivas (BRANDILEONE et al., 1997).

1.3.2 ANTÍGENOS PROTEICOS DE PNEUMOCOCOS

Nas últimas décadas foram descritos vários fatores proteicos de virulência de pneumococos (FIGURA 1), dentre eles Pneumolisina, Proteína A de superfície de pneumococo, Proteína C de Superfície, autolisina e neuroaminidases. Se essas proteínas são importantes na patogênese, é justo presumir que a resposta imune conferida contra tais antígenos esteja envolvida na proteção ou atenuação dos sintomas contra a doença e sua utilização como candidatas a antígenos vacinais ou diagnósticos clínicos seria bastante conveniente, desde que sejam comuns aos diferentes sorotipos e apresentem baixa diversidade antigênica.

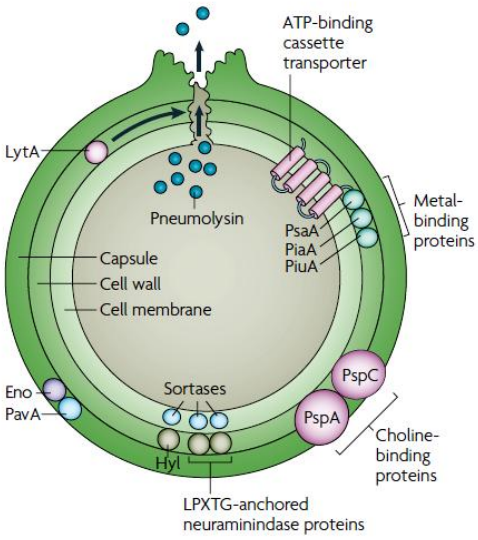

FIGURA 1: **Fatores de Virulência do *S. pneumoniae***. Adaptado de KADIOGLU, 2008.

1.3.2.1 PNEUMOLISINA

A pneumolisina é uma proteína citoplasmática de 53 KDa com 471 resíduos de aminoácidos, membro da família citolisina colesterol-dependente e está presente no citoplasma bacteriano. Acredita-se que para que ela possa ser liberada, é necessária a atuação de uma autolisina conhecida como Lyt A (FIGURA 1) (HIRST et al., 2004; LOPEZ et al., 1997). Suas oligomerases formam na membrana da célula alvo um grande poro transmembrânico em forma de anel, com 260 Å de diâmetro e aproximadamente 40 subunidades monoméricas (KADIOGLU et al., 2004, 2008), responsáveis pela atividade citolítica da toxina e atividade modulatória celular, inibindo o batimento ciliar do epitélio respiratório e do epêndima cerebral, a atividade bactericida dos neutrófilos, a indução da síntese de citocinas (TNF e IL -1β) e a ativação de células T CD4 (KADIOGLU et al., 2008).

Recentemente foi reconhecido que o TLR4 é capaz de interagir com a pneumolisina e promover a resposta imune através do estímulo da produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas (MCNEELA et al., 2010). Camundongos mutantes deficientes para TLR4 foram mais suscetíveis a doenças pneumocócicas e mortes causadas por cepa selvagem de pneumococo quando comparados com camundongos controle (MALLEY et al., 2003).

Kadioglu et al. (2008) sugerem em estudos *in vitro* que cepas do tipo selvagem de pneumococo na presença de pneumolisina obtiveram maior sucesso na colonização da nasofaringe quando comparadas com mutantes defectivos para essa proteína, que foram menos capazes de aderir às células epiteliais (HIRST et. al., 2004). Vários autores afirmam que essa proteína atua de forma diferente em diferentes sorotipos, mas é consensual sua atuação no processo de colonização da nasofaringe do hospedeiro (KADIOGLU et al., 2002). Na pneumonia pneumocócica, foi sugerido que a presença da pneumolisina aumente o fluxo de neutrófilos e produção de citocinas, ocasionando aumento do processo inflamatório e maiores danos ao tecido do hospedeiro (GUNN; NUNGESTER, 1933; HIRST et. al., 2004). Estudos utilizando modelos animais, conduzidos por Hirst et al. (2004), sugerem que a infecção por cepa selvagem de pneumococo no sistema nervoso central de ratos foi capaz de causar meningite em 26 horas, levando à hipertrofia e danos no epêndima e astrócitos. Por outro lado, cepas mutantes isogênicas deficientes de pneumolisina e autolisina causaram um quadro de infecção leve ou não induziram à doença.

Todos esses dados reafirmam a importância da pneumolisina como um dos principais fatores de virulência de *S. pneumoniae*, comum a todos os sorotipos (BERRY et al., 1989; HIRST et. al., 2004).

1.3.2.2 PROTEÍNA A DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO (PspA)

A proteína A de superfície de pneumococo (PspA) (FIGURA 1) é um fator de virulência exposto, presente em todos os isolados descritos de *S. pneumoniae.* Apresenta variabilidade em sua sequência, porém com mesma estrutura básica e massa molecular, que varia de 67 a 99 KDa (JEDRZEJAS et al., 2001).

A PspA é constituída por 5 domínios: peptídeo sinal; domínio alfa-hélice; domínio rico em prolina; domínio ligado a colina e cauda curta C-terminal (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000).

O domínio alfa-hélice compreende 40% da região N-terminal da molécula e sua porção positiva parece interagir com a carga negativa do polissacarídeo capsular, enquanto sua porção negativa é repelida pelo polissacarídeo. Assim, o domínio alfa-hélice ganha uma forma estendida na superfície do pneumococo e expõe uma porção PspA na superfície da bactéria (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000).

Em seguida à região α-hélice aparece o domínio rico em prolina, seguido por um domínio com 10 repetições de uma sequência de 20 aminoácidos (*domínios ligados à colina*). Essas sequências repetidas são responsáveis pelo ancoramento da proteína na superfície bacteriana (YOTHER; WHITE, 1994).

Devido à variabilidade da região N-terminal (exposta para o exterior da capsula bacteriana), foi proposta uma classificação que divide as moléculas de PspA em três famílias, que podem ser identificadas com antissoros específicos. Dentro dessas três famílias estão agrupados seis diferentes clados. A família 1 é composta pelos clados 1 e 2; a família 2 pelos clados 3, 4 e 5 e a família 3 pelo clado 6 (raramente isolado) (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000). Mais de 90% das PspAs isoladas clinicamente são encontradas entre as famílias 1 e 2 das cepas de *S.pneumoniae* (BRANDILEONE et al., 2004).

A PspA desempenha diferentes ações de proteção do pneumococo durante a invasão: previne a ação da apolactoferrina na depleção de ferro e interfere na fixação do

componente C3 do complemento, bloqueando a opsonização e a quimiotaxia dos fagócitos (TU A-HT et al., 1999). Em camundongos, foi capaz de induzir imunidade protetora contra bacteremia, sepsis, pneumonia e estado de portador nasal, após desafio com pneumococos de diferentes sorotipos capsulares (BRILES, 2000a, 2000b; TAI, 2006). A PspA foi avaliada como candidata vacinal em ensaio clínico de Fase I, tendo apresentado resultados promissores (BRILES et al., 2000b).

1.3.2.3 PROTEÍNA C DE SUPERFÍCIE (PspC)

A proteína C de superfície de pneumococos (PspC) (FIGURA 1) é uma proteína polimórfica, presente em 75% dos isolados de *S. pneumoniae*. Apresenta domínios estruturais similares à PspA, incluindo a domínio alfa-hélice, seguido pelo domínio rico em prolinas e domínio ligado à colina (BROOKS-WALTER et al., 1999; KADIOGLU et al., 2008).

A PspC possui uma capacidade de ligar-se ao fator H, um regulador negativo da via alternativa de ativação do complemento, prevenindo a formação de C3b e evitando a opsonização pneumocócica (BROOKS-WALTER et al., 1999; KADIOGLU et al., 2008). Trabalhos recentes reportaram a ligação dessa molécula ao receptor polimérico de imunoglobulina, promovendo a migração do pneumococo através do epitélio da nasofaringe. Um mutante defectivo de PspC liga-se bem menos ao epitélio celular e ao ácido siálico *in vitro* e induz reduzida colonização nasofaringeal, comparativamente ao tipo selvagem (KADIOGLU et al., 2008).

1.3.2.4 ANTÍGENO A DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO (PsaA)

A colonização assintomática por *S. pneumoniae* no trato respiratório superior está relacionada com a ligação deste patógeno a carboidratos da superfície celular (N-acetil-glicosamina) do hospedeiro. A aderência a esses açúcares é mediada pela ligação de proteínas de superfície do tipo adesinas, tais como o antígeno A de superfície de pneumococo (PsaA) (FIGURA 1). Essas proteínas também contribuem para a hidrofobicidade e característica eletrostática do pneumococo, auxiliando na sua aderência ao epitélio celular do hospedeiro através de interações físico-químicas não específicas (BOGAERT; GROOT;

HERMANS, 2004). Esse tipo de colonização nasofaríngea é o principal reservatório para a transmissão entre os indivíduos (KADIOGLU et al., 2008).

A PsaA é uma lipoproteína altamente conservada, de 37-kDa, envolvida no transporte de manganês e zinco dentro da bactéria. Apesar de sua localização na membrana plasmática, parece estar envolvida na adesão à N-acetil-glicosamina nas células endoteliais do hospedeiro graças a mudanças de fase da bactéria, que reduz a espessura da cápsula, permitindo sua maior exposição durante a colonização (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004). A imunização intranasal com PsaA recombinante foi capaz de reduzir a colonização por pneumococos virulentos, além de proteger contra otite média (BRILES et al., 2000c).

1.3.2.5 AUTOLISINA (LytA)

LytA (FIGURA 1) é uma autolisina de peptidoglicano (N-acetil-muramoil-1-alanina amidase) que degrada a parede celular, promovendo autólise bacteriana (HIRST et al., 2004). Cepas mutantes deficientes em autolisina apresentaram virulência reduzida em modelo animal de pneumonia e bacteremia (BERRY; PATON, 1989; 2000; 2000). A contribuição da LytA na virulência é mediada, em parte, pela sua função na liberação de pneumolisina, peptidoglicano e ácidos teicóicos das células bacterianas lisadas (KADIOGLU et al., 2008).

1.3.2.6 NEUROAMINIDASES

As neuroaminidases, também conhecidas como sialidases, clivam resíduos de ácido siálico de glicoproteinas, glicolipídios e oligossacarídeos de superfície celular, conferindo uma vantagem competitiva ao pneumococo (KADIOGLU et al., 2008), pois diminuem a viscosidade do muco, expondo receptores de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) das células epiteliais, que podem interagir com as proteínas de superfície do pneumococo. A atividade de neuroaminidases de vírus tais como influenza e parainfluenza, pode contribuir para o aumento da adesão de pneumococos observada durante as infecções virais (MCCULLERS; TUOMANEN, 2001).

1.4 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

Desde 1977 alguns dos sorotipos prevalentes em doenças pneumocócicas têm sido utilizados no desenvolvimento de vacinas com polissacarídeos capsulares (VPC) (ARDANUY et al. 2012). A partir da implantação dessas vacinas (TABELA 1) têm ocorrido mudanças significativas na incidência, distribuição de sorotipos e resistência à penicilina ao longo dos anos para doenças invasivas pneumocócicas.

TABELA 1: Vacinas pneumocócicas **Fonte:** GRABENSTEIN & KLUGMAN, 2012.

Manufacturers (trade names)	Valence: serotypes included	Date introduced, initial region
Pneumococcal polysaccharide vaccines		
Merck Sharp & Dohme (MSD) (Pneumovax™)	14-valent: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 12F, 18C, 19F, 23F, 25F	November 1977, USA
Lederle Laboratories (Pnu-Imune™)		August 1979, USA
Institut Mérieux (Imovax Pneumo 14™)		February 1981, France
SmithKline Beecham (Moniarix™)	17-valent: 1, 2, 3, 4, 6A, 7F, 8, 9N, 11A, 12F, 14, 15F, 17F, 18C, 19F, 23F, 25	1980s, Europe
Merck Sharp & Dohme (MSD) (Pneumovax™ 23)	23-valent: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F	July 1983, USA
Lederle Laboratories (Pnu-Imune™ 23)		July 1983, USA
Institut Mérieux (Pneumo 23™)		1987, Europe
Chengdu Institute of Biological Products		2005, China
Pneumococcal conjugate vaccines		
Wyeth Laboratories (Prevnar™ or Prevenar™)	7-valent: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	February 2000 for infants, USA and Europe
GlaxoSmithKline (Synflorix™)	10-valent: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	March 2009 for infants: Europe
Wyeth Laboratories (Prevnar™ 13 or Prevenar™ 13)	13-valent: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	February 2010 for infants, late 2011 for adults, Europe, Australia, USA

Atualmente, a VPC 23-valente, Pneumovax 23, produzida pelo laboratório Merck Research, EUA, está sendo distribuída em substituição à vacina 14- valente lançada em 1977. Essa vacina contém 23 antígenos polissacarídicos capsulares purificados (sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F), correspondendo a 85-90% das doenças pneumocócicas (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004). Vários estudos têm demonstrado seu efeito protetor em adultos e crianças acima de dois anos, incluindo também grupos de risco, como idosos e portadores de doença obstrutiva pulmonar crônica. Porém, para crianças menores de dois anos, onde as taxas de colonização são elevadas e em indivíduos imunocomprometidos, a vacinação com a VPC 23-valente tem demonstrado eficiência protetora bastante reduzida (O'BRIEN, et al., 1996). Essas vacinas induzem uma resposta imune T- independente, ou seja, são capazes de ativar células B na ausência de células T auxiliares. Dessa forma, explica-se porque em crianças

menores de dois anos a vacinação com VPC torna-se ineficaz, tendo em vista que durante essa fase do desenvolvimento, a zona marginal do baço ainda se apresenta imatura e sem a presença de alguns receptores importantes no desencadeamento da resposta imune (GRANOFF et al., 1998; HENDLEY et al., 1987; PLETZ et al., 2008).

A nova geração de vacinas pneumocócicas inclui as vacinas conjugadas (Tabela 1), onde os polissacarídeos são ligados a proteínas. Essas formulações induzem a uma resposta imune T-dependente e geração de células de memória. Vários estudos têm demonstrado alta eficiência da vacina conjugada 7-valente (PCV7) na prevenção de doenças pneumocócicas invasivas referentes aos sete sorotipos incluídos na vacina. Contudo, uma proteção eficaz ainda depende da área geográfica onde os sorotipos presentes na vacina tenham potencial de cobertura. Dessa forma, apesar da PCV7 induzir cobertura por volta de 85% nos EUA, na Europa está em torno de 60-70% e na Ásia é de aproximadamente 55% (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004; DAGAN, 2003; TAI, 2006).

A vacina pneumocócica 10-valente (PCV10) Synflorix, produzida pela GlaxoSmithKline (GSK) e licenciada em 2009, contém os sorotipos 1, 5 e 7F além dos sete que compõem a PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Oito dos 10 sorotipos da PCV10 são conjugados com a proteína D de *H. influenzae*, uma lipoproteína de superfície celular altamente conservada (DAGAN; POOLMAN, 2010). Dados da OMS sugeriram que a mudança da PCV7 para PCV10 aumentaria a cobertura vacinal de 86% para 88% nos EUA e de 74% para 84% na Europa. No continente africano a cobertura iria de 67% para 81%, na Ásia de 43% para 66% e no Brasil de 60% para 80% (WHO, 2007). No entanto nos EUA, a PCV10 não foi implantada devido à rápida emergência do sorotipo 19A, sendo substituída pela PCV13 (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

Em 2010 foi licenciada a vacina conjugada 13-valente (PCV13), Prevenar 13 (Wyeth), contendo todos os sorotipos encontrados na PCV7 (sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F) com adição de outros seis (1, 3, 5, 6A, 7F e 19A). A PCV13 foi desenvolvida para resolver a necessidade de proteção contra sorotipos de pneumococo ausentes na PVC7, que emergiram como causas comuns de infecção em crianças. Uma análise de vigilância epidemiológica de 2008 constatou que 43% dos casos de infecções pneumocócicas em crianças nos EUA foram causados pelo sorotipo 19A, seguidos dos sorotipos 7F e 3 como segunda e terceira causas mais comuns (KAPLAN et al., 2010; SUCHER et al., 2011).

Devido à limitação na cobertura promovida pelos sorotipos presentes nas vacinas conjugadas, tem sido relatado o aumento na incidência de sorotipos ausentes na vacina, provavelmente devido à pressão imunológica seletiva (KAPLAN et al., 2004; O'BRIEN; SANTOSHAM, 2004; TAI, 2006). Além disso, a produção dessas vacinas é bastante onerosa, pois envolve vários processos de fermentação, purificação e conjugação dos diversos sorotipos constituintes da vacina, o que torna o processo inviável para países em desenvolvimento (TAI, 2006).

Alternativas para a prevenção da infecção pneumocócica têm sido o desenvolvimento de vacinas dirigidas contra antígenos proteicos comuns a todos os sorotipos de pneumococos, presumindo-se uma resposta imune envolvida na proteção ou atenuação dos sintomas contra a doença. Uma importante limitação, entretanto, seria a diversidade entre os vários sorotipos de pneumococos. A proteína ideal deveria ser comum aos 93 diferentes sorotipos e apresentar diversidade antigênica limitada. Algumas proteínas candidatas formam a base para a terceira geração de vacinas pneumocócicas: Proteína C de superfície de pneumococo (PspC), Pneumolisina, Neuraminidase A (NamA), Antígeno A de superfície de pneumococo (PsaA) e a Proteína A de superfície de pneumococo (PspA). Dentre essas proteínas, a PspA apresenta os resultados mais promissores, tendo inclusive sido utilizada com sucesso em ensaio clínico de Fase I (BRILES et al., 2000b). Essas vacinas poderiam levar a uma proteção efetiva, além de induzirem uma resposta dependente de células-T e memória imunológica.

Dessa forma, vários estudos têm sido conduzidos visando ao desenvolvimento de novas vacinas pneumocócicas, capazes de promover cobertura eficaz a todas as faixas etárias e grupos de risco. Nesse sentido, vem sendo desenvolvida, no Instituto Butantan uma Vacina Pneumocócica Celular (WCPV), um projeto em colaboração com o Children's Hospital - Harvard School of Public Health, Harvard University, USA and PATH (Program for Appropriate Technology in Health), USA. Produzida a partir de cepa não capsulada de *S. pneumoniae*, inativada por tratamento com etanol, a imunidade conferida pela vacina é dirigida a vários antígenos de superfície, e não sorotipo-específica (GONÇALVES et al., 2013). Essa vacina está sendo avaliada em ensaio de campo em humanos nos USA, pelo Food and Drug Administration (FDA).

1.5 DIAGNÓSTICO DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Apesar do *S. pneumoniae* ser um agente etiológico confirmado em dois terços dos casos (FINE, et al., 1996) também é a principal causa de pneumonia de etiologia desconhecida (RUIZ-GONZÁLEZ et al., 1999), indubitavelmente por limitações nos testes diagnósticos convencionais.

As técnicas utilizadas no isolamento e identificação de pneumococos no sangue e líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite não são recentes. Apesar de apresentarem comprovada utilidade, fácil desenvolvimento e reprodutibilidade nos resultados, requerem uma gama variada de adequações laboratoriais.

Estudos sugerem que nas ultimas três décadas tem havido uma diminuição na recuperação de *S.pneumoniae* em amostras clínicas de pacientes internados com pneumonia adquirida na comunidade, ocasionando um retrocesso no diagnóstico e recuperação deste patógeno. Dados do Johns Hopkins Hospital (Baltimore, MD - USA) exemplificam essa tendência de queda nos registros de diagnóstico: em 1970 a recuperação do patógeno em amostras de pacientes era de 60% nos casos de pneumonia pneumocócica, enquanto que em 1991 só chegava a 18% (BARTLETT, 2004; MUNDY et al., 1995).

A perda da qualidade na obtenção e identificação dos isolados clínicos pode estar relacionada a pressões econômicas para redução de custos e terceirização dos laboratórios, acarretando atrasos e manipulação incorreta das amostras e prejudicando o diagnóstico final do patógeno (BARTLETT, 2004). Em países em desenvolvimento e comunidades isoladas, esse problema torna-se ainda mais grave, pela falta de laboratórios equipados e profissionais da saúde devidamente treinados. Esses problemas contribuem em parte para o surgimento de cepas multirresistentes a antibióticos, pois segundo dados de Wannmacher 2004, muitos fatores contribuem para prescrição inadequada de antibióticos aos pacientes:

- prescrição de antibióticos para infecções virais;
- prescrição de antibióticos inadequados para o tratamento do patógeno;
- pacientes não respeitam horários ou dosagem, ou interrompem o tratamento antes do estabelecido pelo médico;
- pacientes se automedicam ou compartilham o antibiótico com familiares e amigos.

Dessa forma, a baixa qualidade na obtenção de amostras e o uso prévio de antibióticos dificultam o diagnóstico do patógeno, reduzindo significativamente a probabilidade de seu isolamento em amostras clínicas (WERNO; MURDOCH, 2008).

Apesar da importância clínica do isolamento de *S. pneumoniae*, não há um "padrão ouro" ou método de referência para a sua identificação (BLASCHKE, 2011). Os valores de sensibilidade e especificidade variam muito em relação aos diferentes métodos. Para a identificação final de um isolado clínico da bactéria é necessário um conjunto de testes, abrangendo a morfologia das colônias e coloração de Gram, hemólise, solubilidade em desoxicolato, susceptibilidade à optoquina e teste de coaglutinação (BROWNE; MIEGEL; STOTTMEIER, 1984; DAVIS et al., 1992; GARDAM; MILLER, 1998).

1.5.1 MICROSCOPIA E CULTURA

A identificação laboratorial de isolados de *S.pneumoniae* depende do reconhecimento das características morfológicas típicas por microscopia e testes fenotípicos. No entanto, aparências típicas podem ser alteradas por antibioticoterapia e a descoloração do corante pode dar a falsa impressão de diplococos gram-negativos (WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.2 REAÇÃO DE QUELLUNG

Embora pouco utilizada atualmente, a reação de Quellung é o método mais específico para detecção de pneumococo a partir de amostras puras de cultura de escarro. Após a reação do pneumococo com soro anticapsular, a cápsula bacteriana fica rodeada por um halo. Embora essa reação seja considerada altamente específica para pneumococo, reações cruzadas podem ocasionar resultados falso-positivos e cepas não capsuladas podem produzir resultados falso-negativos (AUSTRIAN, 1976). Também há a necessidade de se obter microrganismos viáveis em amostras de sangue e a obtenção dos resultados é demorada (ARAI et al., 2001).

1.5.3 SUSCETIBILIDADE À OPTOQUINA E SOLUBILIDADE EM BILE

A diferenciação laboratorial entre o *S.pneumoniae* e o *S. viridans* é normalmente realizada por duas reações: suscetibilidade à optoquina e solubilidade em bile. Isolados de pneumococo são tipicamente suscetíveis à optoquina e solúveis em bile, enquanto que *S. viridans* são tipicamente resistentes à optoquina e insolúveis em bile. O teste de solubilidade em bile é baseado na autólise do *S.pneumoniae* na presença do agente tensoativo desoxicolato de sódio (KELLOGG et al., 2001). Embora o teste seja considerado sensível e específico para a identificação, há constatação de que até 10% dos isolados de *S. pneumoniae* podem ser resistentes à optoquina (DENYS et al., 1992; KELLOGG et al., 2001).

1.5.4 HEMOCULTURAS

O isolamento de *S.pneumoniae* a partir de cultura de sangue fornece um diagnóstico definitivo da doença pneumocócica. No entanto, a bacteremia documentada a partir de hemoculturas ocorre em apenas um quarto dos casos e a antibioticoterapia prévia reduz significativamente esse número (MUSHER, 1992). Além disso, o *S. pneumoniae* pode liberar autolisina durante a fase estacionária de crescimento, resultando em morte celular e impossibilitando o correto diagnóstico (PETTI; WOODS; RELLER, 2005).

1.5.5 EXAME DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Para o diagnóstico de meningite pneumocócica, a combinação de cultura bacteriana e coloração de Gram de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) possuem uma sensibilidade de 84% e especificidade de 98%, mas a administração prévia de antibióticos pode reduzir significativamente a detecção do patógeno (GEISELER et al., 1980).

1.5.6 EXAME DE ESCARRO

No diagnóstico de pneumonia pneumocócica, o exame de escarro é feito por coloração de Gram, para identificação dos diplococos Gram positivos e contagem de células polimorfonucleares (PMN). A presença de 10 PMN para cada célula escamosa epitelial é sugestivo de pneumonia pneumocócica, porém o método é limitado para ser realizado em crianças, por não produzirem escarro. Em adultos é um método diagnóstico bastante eficaz,

capaz de detectar a pneumonia bacteriana desde que as amostras sejam coletadas e processadas corretamente e que sejam obtidas antes da administração de antibióticos ou até 24 horas após o início do tratamento (MUSHER et al., 2004; WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.7 EXAME DE ASPIRADO PULMONAR

O aspirado pulmonar é um método capaz de melhorar a eficácia no diagnóstico de pneumonia pneumocócica, principalmente em pacientes com lesões periféricas e crianças, porém não é amplamente adotado devido à sua natureza invasiva e à necessidade de ser realizado por profissionais da saúde bastante experientes (DORCA, 1995; WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.8 AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX

Ensaios de aglutinação em látex para detecção de *S. pneumoniae* em amostras de LCR apresentam sensibilidade elevada, e embora possam levar a alta porcentagem de resultados falso-positivos, especialmente em amostras de urina, ainda são importantes para o diagnóstico de pneumonia pneumocócica e meningite em comunidades com instalações laboratoriais limitadas (NUNES et al, 2004; PERKINS, et al, 1995; WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.9 DETECÇÃO MOLECULAR

Os métodos moleculares, tais como PCR (polymerase chain reaction), tem se estabelecido como importante ferramenta de diagnóstico de *S. pneumoniae*, pois possuem algumas vantagens em relação à maioria dos métodos convencionais, dentre as quais: podem detectar a presença do microrganismo a partir de quantidades mínimas de ácidos nucléicos; não necessitam de amostras viáveis; são técnicas menos afetadas pela terapia antimicrobiana; fornecem resultados dentro de curto espaço de tempo. Contudo, sua sensibilidade pode variar de 29% a 100%, devido à manipulação inadequada, quantidade insuficiente de amostra ou escolha inapropriada do gene, resultando em reação cruzada com outros patógenos (LAHTI et al., 2006; RUDOLPH et al., 1993; WERNO; MURDOCH, 2008).

A utilização dessas técnicas também exige laboratório bem equipado e presença de profissionais capacitados, o que ainda não é uma realidade para muitos países em desenvolvimento ou em comunidades isoladas.

1.5.10 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS RÁPIDOS

Os testes imunocromatográficos rápidos são também conhecidos como imunoensaios de "*dipstick*", "*strip tests*" e imunoensaios por fluxo lateral.

Essa técnica foi descrita pela primeira vez em 1960 e sua primeira aplicação comercial foi para testes de gravidez, em 1988. Atualmente são utilizados em análise qualitativa, quando o resultado baseia-se em negativo/positivo ou inválido, ou quantitativa, baseada em determinação numérica ou de unidades (MILLIPORE, 2008) para detecção de vários agentes, incluindo pequenas moléculas inorgânicas, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos em fluídos biológicos. São importantes para o diagnóstico de gravidez, infecção ou contaminação com patógenos específicos, incluindo a presença de compostos tóxicos em alimentos ou no meio ambiente, além de facilitar a detecção de drogas ilícitas (GEERTRUIDA et al., 2009). São relativamente baratos para produção, têm uma vida útil longa, não necessitam de refrigeração durante a armazenagem, não requerem nenhum equipamento de laboratório sofisticado ou pessoas altamente capacitadas e os resultados são obtidos geralmente em 10-20 minutos. (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; MILLIPORE, 2008; O'FARRELL, 2009).

Devido a essas propriedades tem aumentado no decorrer das décadas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de ensaios de fluxo lateral que atendam aos requisitos de vários segmentos de mercado (FIGURA 2).

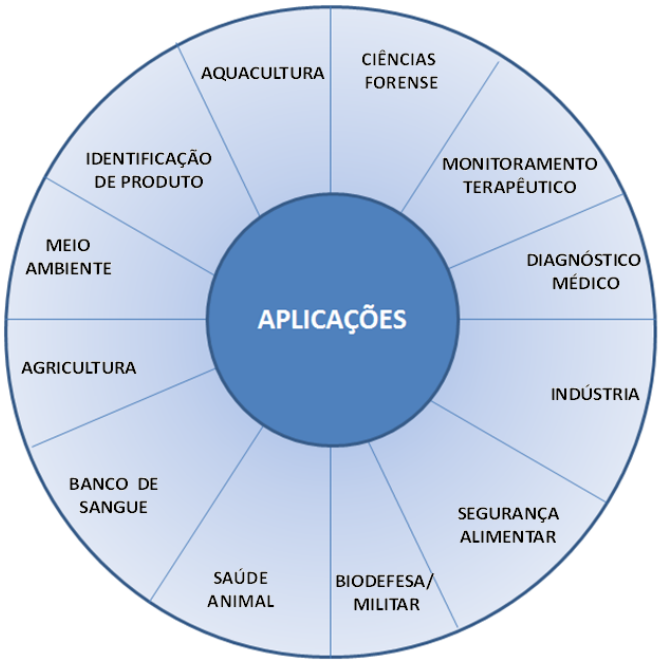

FIGURA 2: Lista dos segmentos de mercado em que os imunoensaios *Dipsticks* já estão em produção ou em desenvolvimento. Adaptado de: WONG e TSE (2009)

O método pode ser direto (sanduíche) ou competitivo (indireto). Os ensaios diretos são normalmente usados quando o teste é para detecção de analitos maiores com múltiplos sítios antigênicos, tais como gonadotrofina coriônica humana (HCG), vírus da dengue ou HIV. Já os ensaios competitivos são tipicamente utilizados quando o objetivo é a detecção de pequenas moléculas com determinantes antigênicos únicos, que não podem ligar-se simultaneamente a dois anticorpos (O'FARRELL, 2009).

Foi descrito um método direto para detecção de Polissacarídeo C de *S. pneumoniae* na urina, o Binax NOW (Binax, Inc., Portland, ME). É um teste rápido, utilizado comercialmente, não invasivo e o resultado pode ser obtido em 15 minutos (DOMÍNGUEZ, 2001; GUTIERREZ, 2003; WERNO; MURDOCK, 2008). Este teste tem mostrado boa utilidade para o diagnóstico de pneumonia pneumocócica, e de acordo com relatos da literatura, sua sensibilidade varia de 77% - 88% e a especificidade está em torno de 67%-100% na detecção de infecções pneumocócicas em adultos (GUTIERREZ et al., 2003). No entanto, o Binax NOW, possui limitações quanto ao seu uso em crianças, pois nesta população a detecção de antígenos pneumocócicos na urina é bastante provável devido à condição de portador do pneumococo, diminuindo a especificidade devido à proporção de testes falso-positivos. O

teste pode também reagir de forma cruzada com outros grupos de estreptococos (BLASCHKE, 2011; KLUGMAN; MADHI; ALBRICH, 2008).

7 CONCLUSÕES

Os testes *dipsticks* desenvolvidos neste estudo são uma promissora ferramenta para o diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*, pois em análises qualitativas foi possível detectar os principais sorotipos mais prevalentes em doenças invasivas pneumocócicas e em análises quantitativas apresentaram um limite de detecção compatível com a ordem de grandeza na detecção de infecções bacterianas em condições clínicas.

O desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido, sensível, de baixo custo, que possa ser acessível a uma grande parcela da população, em uma área estratégica, certamente é um passo importante, que pode contribuir positivamente como possível ferramenta diagnóstica do agente etiológico causador de doenças pneumocócicas, um patógeno de extrema relevância em saúde pública.

REFERÊNCIAS*

ADEGBOLA, R. A.; OBARO, S. K.; BINEY, E.; GREENWOOD, B. M. Evaluation of Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children in a community with a high carriage rate of pneumococcus. **Pediatr. Infect Dis. J.**, v. 20, p. 718-789, 2001.

ALONSO-TARRÉES, C. et al. False-positive pneumococcal antigen test in meningitis diagnosis. **Lancet**, v. 358, n. 9289, p. 1273-1274, 2001.

ANDERSON, G.; SCOTT, M. Determination of product shelf life and activation energy for five drugs of abuse. **Clin. Chem.**, v. 37, p. 398–402, 1991.

AUSTRIAN R. The Quellung reaction, a neglected microbiologic technique. **Mt. Sinai. J. Med.**, v. 43, p. 699–709, 1976.

ANDREOTTI, P. E.; LUDWIG, G. V.; PERUSKI, A. H.; TUITE, J. J.; MORSE, S. S.; PERUSKI Jr, L. F. Immunoassay of infectious agents. **BioTechniques**, v. 35, p. 850-859, 2003.

ARAI, S. et al. Use of antiserum-coated latex particles for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. **Microbiol. Immunol**., v. 45, n. 2, p. 159 –162, 2001.

ARDANUY, C. et al. Epidemiology of Invasive pneumococcal disease in older people in Spain (2007–2009): Implications for Future Vaccination Strategies. **PLoS One,** v. 7, n. 8, 2012.

AUSTRIAN, R. The Quellung reaction, a neglected microbiologic technique. **Mt Sinai J Med.,** v. 43, p. 699–709, 1976.

BANDLA, M.; THOMPSON, R.; SHAN, G. Lateral Flow Devices. **Immunoassays in Agricultural Biotechnology.** John Wiley & Sons, 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470909935.ch5/summary> Acesso em: 20 set. 2012.

BARICHELLO, T. et al. Fisiopatologia da meningite ocasionada pelo *Streptococcus pneumoniae* e os novas possibilidades terapêuticas adjuvantes **Arq. Neuro-Psiquiatr**., v. 70, n. 5, 2012.

BARTLETT, J. G. Decline in microbial studies for patients with pulmonary infections**. Clin Infect Dis.,** v. 39, p. 170–172, 2004.

BHAKDI, L. S.; TRANUM-JENSEN, J.; SZIEGOLEIT, A. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. **Infect Immun.,** v. 47, n 1, p. 52-60, 1985.

BERKLEY, J. A. et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. **N. Engl. J. Med**., v. 352, n. 1, p. 39–47, 2005.

BERRY, A.; PATON, J. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. **Infect. Immun.,** v. 68, p. 133–140, 2000.

---

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERRY, A. M. et al. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.,** v. 57, p. 2324–2330, 1989.

BLASCHKE, A. J. Interpreting Assays for the Detection of *Streptococcus pneumonia*. **Clin. Infect. Dis**., v. 52, p. S331-S337, 2011.

BLASI, F. et al. Understanding the burden of pneumococcal disease in adults**. Clin. Microbiol. Infect**., v. 18, p. 1–8, 2012. Suppl. 5.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect. Dis.,** v. 4, p. 144–154, 2004a.

BRANDILEONE M. C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Brazilian children with invasive infections. Pneumococcal Study Group in Brazil for the SIREVA Project. Regional Systems for Vaccines in Latin America. **Microb. Drug Resist.,** v. 3, n. 2, p. 141–146, 1997.

BRANDILEONE M. C. et al. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. **Microb. Drug Resist**., v. 4, n. 2, p. 209-217, 1998.

BRANDILEONE M. C. et al. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine,** v. 28, p. 3890-3896, 2004.

BRAUN, J. S. et al. Pneumolysin, a Protein Toxin of *Streptococcus pneumoniae*, Induces Nitric Oxide Production from Macrophages. **Infect. Immun**., v. 67, n. 8, p. 3750–3756, 1999.

BRILES, D. E. et al. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**., v. 68, n. 2, p. 796-800, 2000a.

BRILES, D. E. Immunization of humans with rPspA elicits antibodies, which passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1694-1701, 2000b.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S.; BROOKS-WALTER, A. et al. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine,** v. 18, p. 1707–1711, 2000c.

BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD S. K. The pspC Gene of *Streptococcus pneumonia* Encodes a Polymorphic Protein, PspC, Which Elicits Cross-Reactive Antibodies to PspA and Provides Immunity to Pneumococcal Bacteremia**. Infect. Immun.,** v. 67, n. 12, p. 6533-6542, 1999.

BROWN, E.; HOSEA, S.; FRANK, M. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. **Rev. Infect. Dis**., v. 4, p. S797–S805, 1983.

BROWNE, K.; MIEGEL, J.; STOTTMEIER, K. D. Detection of pneumococci in blood cultures by latex agglutination. **J. Clin. Microbiol**., v. 19, p. 649–650, 1984.

BURMAN, L. A. et al. Diagnosis of pneumonia by cultures, bacterial and viral antigen detection tests, and serology with special references to antibodies against pneumococcal antigens. **J. Infect. Dis.,** v. 163, p. 1087-1093, 1991.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Updated recommendations for prevention of nvasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). **MMWR,** v.59, n. 34, p. 1102–1106, 2010.

CHASTRE, J. et al. Quantification of BAL Cells Containing Intracellular Bacteria Rapidly Identifies Ventilated Patients with Nosocomial Pneumonia. **CHEST J.**, v. 95, n. 3, p. 190S-192S, 1989.

DAGAN, R. Antibiotic resistance and the potential impact of pneumococcal conjugate vaccines. **Commun. Dis. Intell**. **Q. Rep**., v. 27, p. 134-142, 2003.

DAGAN, R. et al. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. **Pediatr. Infect. Dis. J**., v. 17, p. 880-885, 1998.

DAGAN, R. et al. Nasopharyngeal colonization in Southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. **J. Infect. Dis**., v. 174, p. 1352-1352, 1996.

DAGAN, R.; POOLMAN, C. A. Siegrist Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. **Vaccine,** v. 28, p. 5513–5523, 2010.

DAVIDSON, H. H. et al. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test in Children with Nasopharyngeal Pneumococcal Carriaged, **Clin Infect Dis**., v. 34, n. 7, p. 1025-1028, 2002.

DAVIS, T. E.; FULLER, D. D.; AESCHLEMAN, E. C. Rapid, direct identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* from blood cultures using commercial immunologic kits and modified conventional tests. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**., v. 15, p. 295–300, 1992.

DAWSON C. What is a pneumococcus? In: IVOMANEM E. M. T.; MARRISON, D. A.; SPRATT, B. G. (Ed.). **The Pneumococcus.** Washington, DC: ASM Press, 2004. p. 30-48.

DENYS, G. A.; CAREY, R. B. Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA probe. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2725–2727, 1992.

DOMINGUEZ, J. et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine. **Chest**, v. 9, p. 119-243, 2001.

DORCA, J. et al. Efficacy, safety, and therapeutic relevance of transthoracic aspiration with ultrathin needle in nonventilated nosocomial pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, p. 1491–1496, 1995.

DOCKRELL, D. H.; WHYTE, M. B.; MITCHELL, T. J. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. **Chest**, v. 142, n. 2, p 482-491, 2012.

DOWELL, S. F. et al. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32 p. 824-825, 2001.

ESPOSITO, S. et al. A etiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 645–651, 2004.

FELDMAN, W. E. Concentrations of bacteria in cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. **J. Pediatr**., v. 88, n. 4, p. 549-552, 1976.

FINE, M. J. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. **JAMA**, v. 275, p. 134-141, 1996.

GARCÍA-SUÁREZ, M. M. et al. Performance of a pneumolysin enzyme-Linked immunosorbent assay for diagnosis of pneumococcal infections. **J. Clin. Microbiol**., v. 45, n. 11, p. 3549-3554, 2007.

GARDAM, M. A.; MILLER, M. A. Optochin revisited: defining the optimal type of blood agar for presumptive identification of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol**., v. 36, p. 833–834, 1998.

GEERTRUIDA, A. et al. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 569–582. 2009.

GEISELER, P. J. et al. Community acquired purulent meningitis: a review of 1,316 cases during the antibiotic era, 1954–1976. **Rev. Infect. Dis**., v. 2, p. 725–745, 1980.

GEOGHEGAN, W. The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold. J. Histochem. **Cytochemistry**, v. 36, p. 401, 1988.

GISSELSSON-SOLÉN, M. et al. The Binax NOW test as a tool for diagnosis of severe acute otitis media and associated complications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3003–3007, 2007.

GOLDSTEIN, F. W.; ACAR, J. F. Antimicrobial resistance among lower respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae*: results of a 1992–1993 western Europe and USA collaborative surveillance study. The Alexander project collaborative group. **J Antimicrob Chemother,** v. 38, p. 71-84, 1996.

GONÇALVES, V. M. et al. Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability. **Vaccine,** v. 19, p. 1113‑1120, 2014.

GUNN, F. D.; NUNGESTER, W. J. Pathogenesis and histopathology of experimental pneumonia in rats. **Arch. Pathol**., v. 21, p. 813–830, 1936.

GRABENSTEIN, J. D; KLUGMAN, K. P. A century of pneumococcal vaccination research in humans - Merck Vaccines, West Point, USA. **Clin. Microbiol. Infect.,** v. 18, p. 1–10, 2012.

GRANOFF, D. M. et al. Induction of immunologic refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. **J. Infect. Dis**., v. 178, p. 870–874, 1998.

GRATTEN, M. Comparison of goat and horse blood as culture medium supplements for isolation and identification of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* from upper respiratory tract secretions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2871-2872, 1994.

GRIBNAU, T. C. J.; VAN SOMMEREN, A.; VAN DINTHER, F. DIA-disperse dye immunoassay. In: CHAIKEN, M.; WILCHEK; PARIKH, I. (Ed.). **Affinity chromatography and biological recognition**. Orlando: Academic Press, 1983. p. 375–380.

GRIBNAU, T. C. J.; LEUVERING, J. H. W.; HELL. V. H. Particle-labelled immunoassays: a review. **J. Chromatogr.**, v. 376. p. 175-189, 1986.

GUTIERREZ, F. et al. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community acquired pneumonia in Spain. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36 p. 286–292, 2003.

HAMER, D. H. et. al. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. **Clin. Infect Dis.**, v. 34, p. 1025–1028, 2002.

HENDERSON, K.; STEWART, J. Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay. **J. Immunol. Methods**, v. 270, n. 1, p. 77–84, 2002.

HENDLEY, O. et al. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccines in 18-month-old infants. **Pediatrics**, v. 80, p. 351–354, 1987.

HOLMBERG, H.; KROOK, A.; SJOGREN, A. Determination of antibodies to pneumococcal C polysaccharide in patients with community-Acquired pneumonia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, n. 5, p. 808-881, 1985.

HIRST, R. A et al. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 138, p. 195–201, 2004.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of pspA: Mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumonia*. **Infect. Immun**., v. 68, n. 10, p. 5889-5900, 2000.

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. **J. Biol. Chem**., v. 276, p. 33121–33128, 2001.

JENNINGS, H. J; LUGOWSKI, C; YOUNG, N. M. Structure of the complex polysaccharide C substance from *Streptococcus pneumoniae* type 1. **Biochemistry**, v. 19, p. 4712-4719. 1980.

JIANG, T.; LIANG, Z.; REN W. W. et al. A simple and rapid colloidal gold-based immunochromatografic strip test for detection of FMDV serotype A. **Virologica Sinica.** v. 26, n. 1, p. 30-39, 2011.

JONES, K. D. Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes. Part 2: common problems. **IVD Technol**., 1999. Disponível em: <http://www.ivdtechnology.com/article/troubleshooting-protein-binding-nitrocellulose-membranes> Acesso em: dez 2013

JONSSON, S. et al. Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. **J Infect Dis.**, v. 152, p. 4–13, 1985.

KADIOGLU, A. et al. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. **Infect. Immun**., v. 70, p. 2886–2890, 2002.

KADIOGLU, A.; COWARD, W.; COLSTON, M.; HEWITT, C.; ANDREW, P. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. **Infect. Immun**., v. 72, p. 2689–2697, 2004.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 6, n. 4, p. 288-301, 2008.

KANCLERSKI, K.; GRANSTROM, M.; MOLLBY, R. Immunological relation between serum antibodies against pneumolysin and against streptolysin O. **Acta Pathol**. **Microbiol. Immunol. Scand. Sect**., v. 95, n. 4, p. 241–244, 1987.

KAPLAN S. L., et al. Decrease of invasive pneumococcal infections among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatrics**, v. 113, p. 443-449, 2004.

KAPLAN, S. L et al. Serotype 19A is the most common serotype causing invasive pneumococcal infections in children. **Pediatrics**, v. 125, p. 429-436, 2010.

KAWAGUCHI, H. K.; SAKAMOTO, Y.; OHTSUKA, T.; OHTAKE, H.; SEKIGUCHI, H. I. Fundamental study on latex reagents for agglutination tests. **Biomaterials**, v. 10, p. 225-229, 1989.

KELLOGG, J. A. et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. **J. Clin. Microbiol.,** v. 39, p. 3373–3375, 2001.

KERTESZ, D. A. et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the pan pmerican health organization surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 1355–1361, 1998.

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of Intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 2, p. 368-377, 1998.

KLUGMAN, K. P.; MADHI, S.A.; ALBRICH, W. C. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, p. S202–S206, 2008. Suppl. 3.

LA SCOLEA JR, L. J.; DRYJA, D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. **J. Clin. Microbiol**., v. 19, n. 2, p. 187–190, 1984.

LAHTI, E. et al. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 25, p. 783–789, 2006.

LAVAL, C. B. et al. Sorotipos de transporte e isolados invasivos de *Streptococcus pneumoniae* em crianças brasileiras na era das vacinas pneumocócicas. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, n. 1, p. 50-55, 2006.

LEE, C. J.; BANKS, S. D.; LEE, J. P. Virulence, Immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. **Crit. Rev. Microbiol**., v. 18, n. 2, p. 89-114, 1991.

LIPSITCH, M. et al. Are anticapsular antibodies the primary mechanism of protection against invasive pneumococcal disease. **PLoS Med**., v. 2, p. 15, 2005.

LOPEZ, R. et al. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins. **Microb. Drug Resist.**, v. 3, p. 199–211, 1997.

LU, Y. J. et al. GMP-grade pneumococcal whole-cell vaccine injected subcutaneously protects mice from nasopharyngeal colonization and fatal aspiration-sepsis. **Vaccine**, v. 28, n. 47, p. 7468-7475, 2010.

MACHADO-SEQUEIRA, C. M. Resistência aos antibióticos: o uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. **Rev. OFIL**, v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.

MALLEY, R. et al. Recognition of pneumolysin by toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. **Proc Natl Acad Sci**., v. 100, n. 4, p. 1966-1971, 2003.

MANDELL, L. A. et al. Infectious diseases society of america/american thoracic society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 2, p. 27–72, 2007.

MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ, V. Development and evaluation of a new lateral flow immunoassay for serodiagnosis of human fasciolosis. **PLoS Neql. Trop. Dis**., v. 5, n. 11, p. 61376, 2011.

McCULLERS, J. A; TUOMANEN, E. I. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Front Biosci.,** v. 6, p. D877–D889, 2001.

McNEELA, E. A. et al. Pneumolysin activates the NLRP3 infl ammasome and promotes proinfl amatory cytokines independently of TLR4. **PLoS Pathog**., v. 6, n. 11, e1001191, 2010.

MILLIPORE CORPORATION. **Rapid lateral flow test strips: considerations for product development.** 2008. Disponível em: <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/tb500en00> Acesso em: 20 set. 2010.

MERCK Millipore Corporation. Disponível em: https://www.millipore.com/diagnostics_cap/flx4/estapor_lateral_flow&tab1=1&tab2=3#tab2=3:tab1=1> Acesso em: 10 dez. 2013.

MITCHELL, M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, p. 411–418, 2010.

MOFFITT K. L.; MALLEY R. Next generation pneumococcal vaccines. **Curr. Opin. Immunol**., v. 23, p. 407–413, 2011.

MUNDY, L. M. et al. Community-acquired pneumonia: impact of immune status**. Am J Respir Crit Care Med**., v. 152, p. 1309-1315, 1995.

MURDOCH, D. R.; LAING, R. T. R.; COOK, J. M. The NOWS-pneumoniae urinary antigen test positivity rate 6 weeks after pneumonia onset and among patients with COPD. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 153–154, 2003.

MURDOCH, D. R.; RELLER, L. B. Immunochromatographic test for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* in the nasopharynx. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2271, 2003.

MURDOCH, D. R. et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. **J. Clin. Microbiol**., v. 41, p. 63–66, 2003.

MURPHY J.; BUSTIN S. A. Reliability of real-time reverse-transcriptase PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? **Exp. Rev. Mol. Diagn.**, v. 9, p. 187–197, 2009.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

MUSHER, D. M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. **Clin. Infect. Dis**., v. 14, p. 801–804, 1992.

MUSHER, D. M.; MONTOYA, R.; WANAHITA, A. Diagnostic value of microscopic examination of gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia**. Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 165–169, 2004.

MCGEE, L. et al**.** Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network**. J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2565–2571, 2001.

NATARAJU, B. et al. Colloidal textile dye-based dipstick immunoassay for the detection of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm, bombyx mori L. **Nal. Invertebrate Pathol.**, v. 63, p. 135-139, 1993.

NELSON, A. L. et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucusmediated clearance. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 83–90, 2007.

NGOM, B.; GUO, Y.; WANG, X.; BI, D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. **Anal. Bioanal. Chem**., v. 397, n. 3, p. 1131-1135, 2010.

NUNES, A. A. et al. Antigen detection for the diagnosis of pneumonia**. Pediatr. Pulmonol.,** v. 38, p. 135–139, 2004.

NORDE, W. Adsorption of proteins from solution at the solid–liquid interface. **Adv. Colloid. Interface Sci**., v. 4, p. 267–340, 1986.

O'BRIEN, K. L et al. Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. **Pediatr. Infect. Dis J.,** v. 15, n. 5, p. 425–430, 1996.

O'BRIEN, K. L.; SANTOSHAM, M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. **Am. J. Epidemiol**., v. 159, p. 634-644, 2004.

O'FARRELL, B**. Evolution in lateral flow based immunoassay systems.** Humana Press, 2009. p. 1-33. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-240-3_1> Acesso em: 10 jan. 2010.

OLIVER, C. **Immunocytochemical methods and protocols**: methods en molecular biology. 3rd ed. New York: Humana Press, 2010. 401 p.

OLIVER-HOYO, M.; GERBER, R. W. From the research bench to the teaching laboratory: Gold nanoparticle layering. **J. Chem. Educ.**, v.84, n. 7, p. 1174-1176, 2007.

PEREZ-DORADO, I.; GALAN-BARTUAL, S.; HERMOSO, J. A. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. **Mol. Oral Microbiol**., v. 27, n. 4, p. 221–245, 2012.

PERKINS, M. D.; MIRRETT, S.; RELLER, L. B. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. **J. Clin. Microbiol**., v. 33, p. 1486–1491, 1995.

PETTI, C. A.; WOODS, C. W.; RELLER, L. B. *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2510–2512, 2005.

PLETZ, M. W. et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int. J. Antimicrob. Ag**., v. 32, n. 3, p. 199-206, 2008.

PUERINI, R. A. **Detection and quantification of *Streptococcus pneumonie* serotypes in the nasopharynx of healthy children in Peru**. Master of Public Health, Epidemiology, Wesleyan University, 2006.

QUACH, C. et al. Clinical aspects and cost of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children: resistant vs. susceptible strains. **Int J Antimicrob Ag**., v. 20, p. 113-118, 2002.

RAJALAKSHMI, B. et al. Pneumolysin in urine: a rapid antigen detection method to diagnose pneumococcal pneumonia in children. **Ind. J. Med. Microbiol**., v. 20, p. 183–186, 2002.

RAW, I.; MARTINS, E. A. L. **Medicina molecular**. 2. ed. São Paulo. Editora Roca LTDA, 2006.

ROCHA, L. B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de Escherichia coli produtora da toxina de Shiga (STEC) e Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)**. 2012. 178 f. Tese (Doutorado) - Instituto Butantan. Programa Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

RODGERS, G. L.; KLUGMAN, K. P. The future of pneumococcal disease prevention. **Vaccine**, v. 29, p. C43–C48, 2011.

RODRIGUES, J. C. et al. Diagnóstico etiológico das pneumonias - uma visão crítica. **J. Pediatr**., v. 78, p. S129-S140, 2002. Suppl. 2.

RUBINS, J. B.; JANOFF, E. N. Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal - virulence factor. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 131, n. 1, p. 21-27, 1998.

RUDOLPH, K. M. et al. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. **J. Clin. Microbiol**., v. 31, p. 2661–2666, 1993.

RUIZ-GONZÁLEZ, A. et al. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. **Am. J. Med.,** v. 106, p. 385-390, 1999.

SCOTT, J. A. et al. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 973-981. 1996.

SIMELL, B. et al. Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal surface adhesin a, pneumolysin, and pneumococcal surface protein a in children. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 887–896, 2001.

SORENSEN, U. B.; HENRICHSEN, J. Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C-polysaccharide and F antigen. **J. Clin. Microbiol**., v. 25, n. 10, p. 1854-1859, 1987.

SPREER, A. et al. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 47, n. 8, p. 2649-2654, 2003.

SUCHER, A. J.; CHAHINE, E. B.; NELSON, M.; BRANDON, J. S. Prevnar 13, the New 13-Valent pneumococcal conjugate vaccine. **Ann. Pharmacother.**, v. 45, n. 12, p. 1516-1524, 2011.

SCHUCHAT, A. et al. Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network**.** **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, 2001.

SNOWDEN, K.; HOMMEL, M. Antigen detection immuno-14. assay using dipstick and colloidal dyes. **J. Immunol. Methods**, v. 140, p. 57-65, 1991

TAI, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit. Rev. Microbiol.,** v. 32, p. 139–153, 2006.

TU, A-HT. et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) inhibits complement activation by *Strepococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 67, p. 4517-4524, 1999.

VARVIO, S. L. et al. Evolution of the capsular regulatory genes in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 200, n. 7, p. 1144-1151, 2009.

WALL, E. C. et al. Persistence of pneumolysin in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis is associated with mortality. **Clin. Infect. Dis**., v. 54, n. 5, p. 701–705, 2012.

WANG, S-J. et al. Development of a disperse dye immunochromatographic test for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 125, n. 3-4, p. 284-290, 2008.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Uso racional de medicamentos: temas selecionados. v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WERNO, A. M.; MURDOCH, D. R. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 6, p. 926-932, 2008.

WHEELER, J. et al. Detection of pneumolysin in sputum. **J. Med. Microbiol**., v. 48, p. 863-866, 1999.

WIRIYACHAIPORN, S. et al. Evaluation of a rapid lateral flow immunoassay for *Staphylococcus aureus* detection in respiratory samples. **Diagn. Microbiol. Infect Dis.**, v.75, n.1, p. 28-36, 2012.

WONG, R.C.; TSE, H.Y. **Lateral flow immunoassay**. New York: Humana Press. 2009. 236 p. doi: 10.1007/978-1-59745-240-3_1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000 – Overcoming antimicrobial resistance**. Publication Code: WHO/CDS/2000.2. Disponível on-line: <http://www.who.int/infectious-diseasereport/2000> - Acesso em: 10 jan. 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - WHO position paper. **Wkly Epidemiol. Rec**., v. 82, p. 93–104, 2007.

YAN, Z. et al. Rapid quantitative detection of Yersinia pestis by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor. **Sensor Actuat**., v. 119, n. 2, p. 656-663, 2006.

YOTHER, J.; WHITE, J. M. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein pspA. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 10, p. 2976-2985, 1994.

YU, V. L. et al. Evaluation of the Binax urinary, gram stain and sputum culture for *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia [abstract 262]. In: Program and abstracts of the 38th **Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America.** New Orleans, 2000.