

GABRIELA BORGES CHERULLI COLICHIO

Comparação da imunização com a vacina conjugada polissacarídica e com antígenos proteicos no controle da co-colonização por *Streptococcus pneumoniae*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo
2020**

GABRIELA BORGES CHERULLI COLICHIO

Comparação da imunização com a vacina conjugada polissacarídica e com antígenos proteicos no controle da co-colonização por *Streptococcus pneumoniae*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a. Eliane Namie Miyaji

Versão Original.

**São Paulo
2020**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Borges Cherulli Colichio, Gabriela
Comparação da imunização com a vacina conjugada
polissacarídica e com antígenos proteicos no controle
da co-colonização por *Streptococcus pneumoniae* /
Gabriela Borges Cherulli Colichio; orientadora
Eliane Namie Miyaji. -- São Paulo, 2020.
101 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Vacina
polissacarídica. 3. PCV13. 4. Vacina proteica. 5.
PspA. I. Namie Miyaji, Eliane, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Gabriela Borges Cherulli Colichio

Título da Dissertação: Comparação da imunização com a vacina conjugada polissacarídica e com antígenos proteicos no controle da co-colonização por *Streptococcus pneumoniae*

Orientador: Dr^a. Eliane Namie Miyaji

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação da imunização com a vacina conjugada polissacarídica e com antígenos proteicos no controle da co-colonização por *Streptococcus pneumoniae*", protocolado sob o CEUA nº 5824140716, sob a responsabilidade de **Eliane Namie Miyaji** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 17/08/2016.

We certify that the proposal "Comparison of the immunization with a polysaccharide conjugate vaccine and protein antigens in the control of co-colonization with *Streptococcus pneumoniae*", utilizing 276 Isogenics mice (276 females), protocol number CEUA 5824140716, under the responsibility of **Eliane Namie Miyaji** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 08/17/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2016](#) a [08/2020](#) Área: [Biotecnologia](#)

Procedência: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [4 a 8 semanas](#)

N: [276](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [18 a 24 g](#)

Resumo: *Streptococcus pneumoniae* é um importante patógeno humano, causando doenças como otite média, sinusite, pneumonia, bacteremia e meningite. As vacinas conjugadas polissacarídicas (PCV) são baseadas na indução de anticorpos contra o polissacarídeo capsular e mostraram-se bastante eficientes na prevenção de infecções invasivas causadas por pneumococo. No entanto, seu uso levou a um aumento tanto de colonização como de doença causadas por sorotipos não contidos nas formulações vacinais. Além disso, um aumento no isolamento de pneumococos não-encapsulados (NESp) tem sido relatado. Uma alternativa para superar estes problemas seria o uso de antígenos proteicos, utilizados isoladamente ou co-administrados com as vacinas conjugadas. Neste projeto, propomos a comparação da eficácia da PCV e do antígeno proteico PspA (Pneumococcal surface protein A) em modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos. A colonização concomitante por mais de um isolado de pneumococo é bastante comum, especialmente em crianças. Será avaliada a eficácia das diferentes formulações vacinais no controle da co-colonização com dois isolados de sorotipos vacinais (6B e 23F) e também com um isolado de sorotipo vacinal (6B ou 23F) e outro isolado de sorotipo não-vacinal (15C ou 33F). Além disso, a eficácia da vacinação com o antígeno PsaA (Pneumococcal surface antigen A) no controle da colonização por NESp também será avaliada. Este projeto visa, portanto, à avaliação da eficácia de novas formulações vacinais frente a diferentes isolados de pneumococo, já que diversos estudos epidemiológicos realizados após a introdução das PCV mostram um quadro dinâmico, com alteração de prevalência de sorotipos em colonização e doença pneumocócica.

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Biotecnologia Molecular I

São Paulo, 17 de agosto de 2016



Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



butantan

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comparação da imunização com a vacina conjugada polissacarídica e com antígenos proteicos no controle da co-colonização por *Streptococcus pneumoniae*", protocolada sob o CEUA nº 5824140716, sob a responsabilidade de **Eliane Namie Miyaji** e equipe; **Gabriela Borges Cherulli Colichio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 17/08/2016.

We certify that the proposal "Comparison of the immunization with a polysaccharide conjugate vaccine and protein antigens in the control of co-colonization with *Streptococcus pneumoniae*", utilizing 276 Isogenics mice (276 females), protocol number CEUA 5824140716, under the responsibility of **Eliane Namie Miyaji** and team; **Gabriela Borges Cherulli Colichio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 08/17/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 08/2020

Área: Biotecnologia

Origem: Biotério Externo

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 4 a 8 semanas

N: 276

Linhagem: C57BL/6

Peso: 18 a 24 g

Aditivo: aprovado em 15/08/2018

Origem: Faculdade de Medicina da USP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 4 a 8 semanas

N: 264

Linhagem: C57BL/6

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Biotecnologia Molecular I

São Paulo, 20 de agosto de 2018

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Dedico este trabalho a todos aqueles
que de alguma forma contribuíram
com meu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Butantan e ao Laboratório de Bacteriologia 2 como um todo. Dizem que o lar não é sobre um lugar e sim sobre alguém que faz você se sentir em casa. Vocês fizeram uma parte muito importante no desenvolvimento do meu novo lar São Paulo, e fizeram que meu percurso no mestrado fosse mais leve. Portanto, agradeço a todos que passaram pelo laboratório enquanto eu estava aqui.

Gostaria de agradecer então, aos alunos Julia, Tasson, Fabiana, Giuliana, Giovanna, Adriano, Camila, Bruna, pela companhia e pelos ensinamentos.

Às técnicas de laboratório Vera Lúcia, com sua paciência incomparável, e Aline pelo auxílio nos equipamentos aos alunos.

Também agradeço à Sandra, pela proatividade. Agradeço aos pesquisadores Enéas e Josefa por fazer dos nossos almoços um momento de descontração e discussão de vários assuntos. À Maria Leonor pelos auxílios nos experimentos.

Gostaria de agradecer especialmente à minha orientadora Eliane, pelo exemplo e pela excelente pesquisadora que é. Por aceitar a conduzir meu trabalho, pelo incentivo e pela dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa. Isso foi essencial para o desenvolvimento desse projeto. Obrigada pela paciência, pelas dicas e por todo o ensinamento passado que me acrescentaram pessoal e profissionalmente.

Fora do Laboratório de Bacteriologia, não posso deixar de agradecer às amigadas que o Instituto Butantan me proporcionou e uma amizade em especial da graduação. Aos meus amigos Ana Carolina, Ryhara, Sérgio e Ygor, também responsáveis por fazer de São Paulo meu novo lar. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelas risadas e por compartilharem tantos momentos importantes da minha vida.

Também pela amizade, paciência e companhia, agradeço ao meu namorado Gabriel que me acompanhou em todo o meu mestrado.

Finalmente à minha família, aos meus pais Sérgio e Cristina, minha irmã Isabella e minha tia e prima, Beatriz e Amanda. Se estou aqui hoje, é por tudo que me proporcionaram.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Processo 130505/2018-8.

Agradeço ainda, ao apoio financeiro da Fundação Butantan, CAPES e FAPESP pelo auxílio à pesquisa. Processo nº 2016/09427-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Este pequeno espaço é dedicado a todas aquelas pessoas que de certa forma contribuíram direta ou indiretamente para esta etapa decisiva em minha vida.

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar.”

Francisco de Assis França

RESUMO

COLICHIO, G. B. C. **Comparação da imunização com a vacina conjugada polissacarídica e com antígenos proteicos no controle da co-colonização por *Streptococcus pneumoniae*.** 2020. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria comensal da nasofaringe humana, mas também um importante patógeno humano, causando doenças como otite média e pneumonia. As vacinas conjugadas polissacarídicas (PCV) são baseadas na indução de anticorpos contra o polissacarídeo capsular (PS). Embora as PCVs tenham se mostrado bastante eficazes contra infecção invasiva, seu uso levou a um aumento tanto de colonização como de doenças causadas por sorotipos não contidos nas formulações vacinais. Neste projeto, foi comparada a eficácia da PCV e do antígeno proteico PspA (*Pneumococcal surface protein A*) em modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos. Foram estabelecidos dois modelos de co-colonização com um isolado de sorotipo vacinal (VT – 4 ou 23F) e outro isolado de sorotipo não-vacinal (NVT - 15B/C ou 33), construídos através da inserção de cassetes de resistência à eritromicina (Erm) ou à espectinomicina (Spec). A imunização de camundongos C57BL/6 foi realizada em cinco grupos: salina, adjuvante vacina celular pertussis (wP), vacina proteica (PspA1+PspA4+wP), vacina pneumocócica conjugada 13-valente (PCV13) e combinação de PspA1+PspA4+wP e PCV13. No desafio realizado com a mistura de TIGR4 (VT4-PspA3) + 4431/119 (NVT33-PspA1), o grupo imunizado com wP apresentou efeito inespecífico do adjuvante para os dois isolados. Os camundongos que receberam a vacina proteica apresentaram uma redução significativa para NVT33-PspA1 quando comparados ao adjuvante. A imunização com PCV13 levou a uma redução significativa de VT4-PspA3 e a um aumento da carga bacteriana de NVT33-PspA1, indicando vantagem competitiva da linhagem NVT. O grupo imunizado com PspA1+PspA4+wP e PCV13 apresentou carga bacteriana reduzida comparado ao grupo imunizado com PCV13. No desafio realizado com 368/06 (VT23F-PspA2) + 237/53 (NVT15B/C-PspA4), foi observado novamente efeito inespecífico de wP. Foi observada redução significativa para VT23F-PspA2 em animais imunizados com proteína, quando comparados ao adjuvante wP. O grupo imunizado com PCV13 não apresentou redução na carga bacteriana. A imunização com a combinação de PspA1+PspA4+wP e PCV13 também levou à redução da carga bacteriana das duas linhagens utilizadas em

comparação com PCV13. Os experimentos realizados foram importantes para avaliar a eficácia da PCV13 e da vacina proteica na proteção em modelos de co-colonização, indicando o uso combinado de PCV13 e de PspA como uma alternativa importante na proteção contra o pneumococo.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Vacina polissacarídica. PCV13. Vacina proteica. PspA.

ABSTRACT

COLICHIO, G. B. C. **Comparison of immunization with polysaccharide conjugate vaccine and protein antigens in the control of *Streptococcus pneumoniae* co-colonization.** 2020. 101 f. Masters dissertation (Master's program in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Streptococcus pneumoniae is a commensal bacterium of the human nasopharynx, but also an important human pathogen, causing diseases such as otitis media and pneumonia. Pneumococcal Conjugated Vaccines (PCV) are based on the induction of antibodies against capsular polysaccharide (PS). Though PCVs were shown to be very effective against invasive disease, they also led to increased colonization and disease caused by serotypes not included in vaccine formulations. In this project, we compared the efficacy of PCV and the protein antigen PspA (Pneumococcal surface protein A) in mouse nasopharynx co-colonization models. Two co-colonization models were established with one vaccine serotype isolate (VT – 4 or 23F) and one non-vaccine serotype isolate (NVT – 15B/C or 33) constructed by inserting erythromycin (Erm) or spectinomycin (Spec) resistance cassettes. Immunization of C57BL/6 mice was performed in five groups: saline, the adjuvant whole cell pertussis vaccine (wP), protein vaccine (PspA1+PspA4+wP), 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and combination of PspA1+PspA4+wP and PCV13. In the challenge performed with the mixture TIGR4 (VT4-PspA3) + 4431/119 (NVT33-PspA1), the group immunized with wP showed a non-specific effect, with reduction in the loads of both isolates. Mice receiving the protein vaccine showed a significant reduction of NVT33-PspA1 compared to adjuvant. PCV13 immunization led to a significant reduction in VT4-PspA3 and an increase in bacterial loads of NVT33-PspA1, indicating a competitive advantage of the NVT strain. The group immunized with PspA1+PspA4+wP and PCV13 showed reduced bacterial loads for both strains compared to the group immunized with PCV13. In the challenge performed with 368/06 (VT23F-PspA2) + 237/53 (NVT15B/C-PspA4), a non-specific effect of wP was again observed. Significant reduction of VT23F-PspA2 was observed in the protein-immunized group compared to wP adjuvant. The group immunized with PCV13 showed no reduction in bacterial loads. Immunization with the combination of PspA1+PspA4+wP and PCV13 also led to reduced bacterial

loads of both strains compared to PCV13. The experiments performed were important to evaluate the efficacy of PCV13 and protein vaccine in protection against co-colonization models, indicating the combined use of PCV13 and PspA as an important alternative in protection against pneumococcus.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Polysaccharide vaccine. PCV13. Protein vaccine. PspA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As 10 maiores causas de morte em países de baixa renda em 2016	18
Figura 2. Migração do <i>S. pneumoniae</i> que pode causar diversas doenças	20
Figura 3. Esquema dos fatores de virulência proteicos de <i>S. pneumoniae</i>	22
Figura 4. Representação esquemática dos domínios da proteína PspA	28
Figura 5. Filograma da classificação de PspA em famílias e clados	28
Figura 6. Identificação de IgA na mucosa após diferentes vias de vacinação.....	32
Figura 7. Representação do nocaute por recombinação homóloga	36
Figura 8. Esquema dos plasmídeos utilizados para construção do cassete	38
Figura 9. Representação das PCRs realizadas para confirmação da inserção do cassete.....	42
Figura 10. Representação das misturas testadas <i>in vitro</i>	43
Figura 11. Representação da estrutura dos PspAs recombinantes utilizados na vacina proteica	45
Figura 12. Esquema de imunização, sangria, lavado vaginal, desafio e lavado nasal realizados nos camundongos.....	49
Figura 13. Gel de eletroforese da amplificação por PCR de iga, erm e spec	53
Figura 14. Gel de agarose das minipreps de pGEM Iga.....	54
Figura 15. Gel de agarose das minipreps de pGEM Erm e pGEM Spec.....	54
Figura 16. Análise de restrição de 1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250, pGEM Erm e pGEM Spec.....	55
Figura 17. Análise de restrição dos plasmídeos pGEM Iga, pGEM Iga Erm e pGEM Iga Spec	56
Figura 18. Confirmação da inserção dos genes erm e spec dentro de iga por PCR	57
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose da PCR dos clones de pneumococo resultantes da transformação com DNA que codifica resistência à Erm	59
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose da PCR dos clones de pneumococo resultantes da transformação com DNA que codifica resistência à Spec	59
Figura 21. Curva de crescimento de dois clones da mesma linhagem com diferentes resistências a antibióticos	61
Figura 22. Determinação da concentração bacteriana em co-cultivo de dois clones da mesma linhagem com diferentes resistências a antibióticos	61
Figura 23. Curva de crescimento de dois clones de linhagens e resistências diferentes	63
Figura 24. Determinação da concentração bacteriana em co-cultivo de crescimento de dois clones de linhagens e resistências diferentes.....	63
Figura 25. Análise da expressão de PspA com soro anti-PspA1 e anti-PspA4	65
Figura 26. Análise da expressão de PspA com soro anti-PspA4 e anti-PspA3	65
Figura 27. Desafio de co-colonização de camundongos com mistura de pneumococos derivados da mesma linhagem e resistentes a diferentes antibióticos	66
Figura 28. Desafio de co-colonização de camundongos com mistura de pneumococos derivados de linhagens diferentes e resistentes a diferentes antibióticos	67
Figura 29. Purificação da proteína PspA1 por coluna de afinidade	68

Figura 30. Purificação da proteína PspA4 por coluna de afinidade.....	68
Figura 31. Análise por SDS-PAGE das proteínas PspA1 e PspA4 purificadas e tratadas para retirada de LPS e Triton X-114.....	69
Figura 32. Indução de anticorpos IgG anti-PspA1 e anti-PspA4	70
Figura 33. Indução de anticorpos IgG anti-PS4 e anti-PS23F.....	71
Figura 34. Indução de anticorpos IgG e IgA anti-PspA1 de lavado vaginal.....	72
Figura 35. Ligação de anticorpos IgG à superfície de pneumococos.....	73
Figura 36. Ensaio de aglutinação com as linhagens e soro dos camundongos	74
Figura 37. Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados e desafiados com a mistura VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2	76
Figura 38. Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados e desafiados com a mistura VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2.....	77
Figura 39. Quantificação das citocinas/quimiocinas CXCL1, CXCL2 e IL-6 nas amostras de lavado nasal dos camundongos imunizados e desafiados.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vacinas comerciais contra <i>S. pneumoniae</i>	25
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na clonagem	40
Tabela 3. Isolados de <i>S. pneumoniae</i>	40
Tabela 4. Misturas avaliadas para modelo de co-colonização.....	44
Tabela 5. Porcentagem de aglutinação das linhagens de <i>S. pneumoniae</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bp – Pares de base
BSA – Albumina do soro bovino
CBP – Proteína ligada à colina
CCL – Quimiocina ligante de motivo CC
CDR - Região definidora do clado
CMIS – Sistema imunológico comum de mucosas
CXCL – Quimiocina ligante de motivo CXC
DP – Doença pneumocócica
ELISA – Ensaio imunoenzimático
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
IFN- γ – Interferon gama
IFN- γ – Interferon γ
Ig – Imunoglobulina
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
IPD – Doença pneumocócica invasiva
LN – Lavado Nasal
LPS – Lipopolissacarídeo
MAIT – Células T invariáveis associadas à mucosa
MALT – Tecido linfoide associado à mucosa
NVT – Isolado de sorotipo não-vacinal
OPD – Ortofenilenodiamina
PBS – Tampão fosfato-salina
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PCV – Vacina conjugada pneumocócica
PCV10 – Vacina conjugada pneumocócica 10-valente
PCV13 – Vacina conjugada pneumocócica 13-valente
PCV15 – Vacina conjugada pneumocócica 15-valente
PCV7 – Vacina conjugada pneumocócica 7-valente
Ply – Pneumolisina
PS – Polissacarídeo Capsular
Ps PN ELISA – Ensaio imunoenzimático para quantificação de anticorpos anti-PS
PsaA – Antígeno A da superfície de pneumococo
PspA – Proteína A da superfície de pneumococo
PspC – Proteína C da superfície de pneumococo
PsrP – Proteína pneumocócica rica em repetições de serina
SPF – Livre de patógenos específicos
SUS – Sistema Único de Saúde
THY – Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC – Unidades Formadoras de Colônia
VT – Isolado de sorotipo vacinal
wP – Vacina celular pertussis (Whole cell pertussis vaccine)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
1.2. Epidemiologia.....	17
1.3. Colonização por pneumococo.....	19
1.4. Cápsula polissacarídica e fatores de virulência proteicos.....	21
1.5. Antibióticos e vacinas.....	22
1.6. Implementação das PCVs e substituição de sorotipos.....	25
1.7. Proteína A de superfície de pneumococo.....	27
1.8. Principais mecanismos de eliminação do pneumococo.....	29
1.9. Sistema imunológico de mucosa.....	31
1.10. Eficácia de imunização com PspA em modelo de co-colonização por pneumococo.....	33
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Lista de meios de cultura e soluções.....	34
3.2. Construção dos cassetes de resistência por PCR.....	36
3.2.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	38
a) Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity.....	38
b) Taq DNA polymerase recombinant.....	38
3.2.2. Digestão com enzimas de restrição.....	39
a) Digestão com <i>Bam</i> HI e <i>Xho</i> I.....	39
b) Digestão com <i>Eco</i> RI.....	39
3.2.3. Eletroforese e purificação de fragmentos.....	39
3.2.4. Clonagem e transformação de <i>Escherichia coli</i> com os cassetes de resistência.....	39
3.3. Isolados de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	40
3.4. Transformação dos isolados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> com o cassete de resistência.....	41
3.5. PCR para confirmação da transformação.....	41
3.6. Estabelecimento dos modelos <i>in vitro</i> em co-cultura.....	42
3.7. <i>Western blot</i>	44
3.8. Avaliação dos modelos de co-colonização em camundongos.....	44
3.9. Expressão e purificação das proteínas PspA1 e 4 recombinantes.....	45
3.10. Imunização e desafio de co-colonização dos camundongos.....	47

3.10.1. Imunização.....	47
3.10.2. Soro	48
3.10.3. Lavado Vaginal	48
3.10.4. Desafio.....	48
3.11. Avaliação da indução de anticorpos contra PspA por ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	49
3.12. Avaliação da indução de anticorpos contra polissacarídeo por ELISA.....	50
3.13. Ensaio de ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície da bactéria por citometria de fluxo	51
3.14. Avaliação da aglutinação de bactérias e anticorpos do soro	51
3.15. Quantificação de citocinas e quimiocinas por LUMINEX	52
4. RESULTADOS	53
4.1. Construção dos cassetes de resistência a Erm e Spec.....	53
4.2. Transformação das linhagens de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	57
4.3. Modelos <i>in vitro</i> em co-cultura.....	60
4.4. <i>Western blot</i> com anticorpos anti-PspA.....	64
4.5. Desafio com modelos de co-colonização em camundongos	65
4.6. Expressão e purificação das proteínas PspA1 e PspA4.....	67
4.7. Indução de anticorpos IgG anti-PspA1 e anti-PspA4 no soro.....	69
4.8. Indução de anticorpos IgG anti-PS no soro	70
4.9. Análise de anticorpos IgG e IgA anti-PspA1 e anti-PspA4 em lavado vaginal 71	
4.10. Análise de ligação de anticorpos IgG à superfície da bactéria por citometria de fluxo	72
4.11. Avaliação da aglutinação de bactérias e anticorpos do soro	73
4.12. Avaliação da proteção induzida pela imunização com proteína e PCV13 contra co-colonização por pneumococos VT e NVT	75
4.13. Quantificação de citocinas e quimiocinas no lavado nasal	77
5. DISCUSSÃO.....	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Descrito pela primeira vez em 1881 por Pasteur e Sternberg em observações independentes, o *Streptococcus pneumoniae* foi reconhecido na mesma década como uma das principais causas de infecções que incluíam pneumonia, meningite e otite média (Sá-Leão; Tomasz, 2019). *S. pneumoniae* é uma bactéria anaeróbica facultativa e Gram-positiva que pertence à família *Streptococcaceae*. Apresenta cápsula com morfologia de cocos de 0,5 a 1,25 µm de diâmetro, com arranjos em pares formando diplococos ou em cadeias curtas (Broome; Facklam, 1981). Atualmente, a identificação de *S. pneumoniae* é realizada através da alfa-hemólise obtida no ágar-sangue, reação negativa com catalase, suscetibilidade à optoquina e solubilidade da bactéria em sais biliares (Sá-Leão; Tomasz, 2019).

É uma bactéria extracelular comensal da microbiota da nasofaringe humana que pode colonizar recém-nascidos nos primeiros meses de vida (Bogaert *et al.*, 2004). Quando migra para fora da nasofaringe, causa doenças que podem resultar em infecção e inflamação de um local normalmente não considerado estéril, referidas como doenças pneumocócicas não invasivas. Caso haja proliferação em locais normalmente considerados estéreis, a doença passa a ser invasiva (Austrian, 1986; Croucher *et al.*, 2018). Desse modo, causa diversas doenças com alta mortalidade e morbidade, como pneumonia, bacteremia e meningite, além de outras infecções bastante frequentes do trato respiratório superior, como otite média e sinusite (Austrian, 1986; Musher, 2003).

1.2. Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde reportou as 10 causas de morte mais importantes em 2016, e as infecções respiratórias das vias inferiores causaram 3 milhões de mortes, sendo a quarta doença que mais causa mortes no mundo. Levando em consideração os grupos econômicos, foi possível observar que a causa de morte que mais afeta os países de baixa renda são as infecções respiratórias das vias inferiores, seguida de doenças diarreicas e cardíacas isquêmicas (Figura 1) (Organização Mundial Da Saúde, 2018).

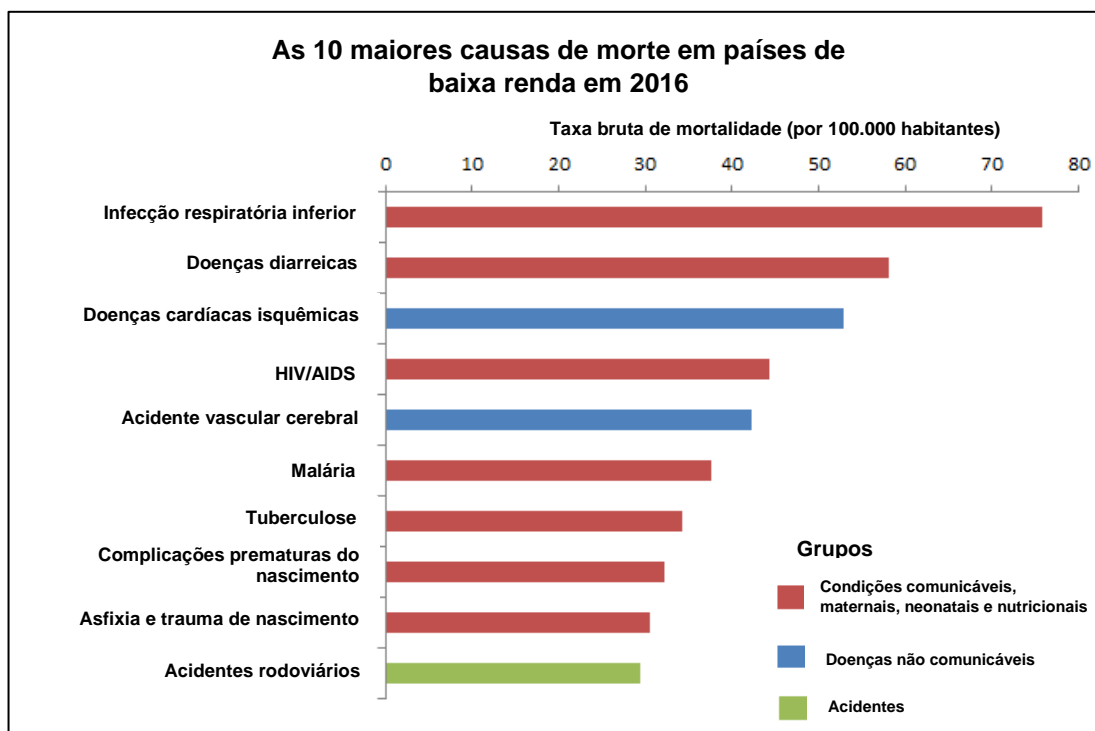


Figura 1. As 10 maiores causas de morte em países de baixa renda em 2016. Taxa bruta de mortalidade por 100.000 habitantes em países de baixa renda no ano de 2016 categorizados pelos grupos: condições comunicáveis, maternas, neonatais e nutricionais, doenças não comunicáveis e acidentes. Figura adaptada de Organização Mundial Da Saúde (2018).

O pneumococo causa alta morbidade e mortalidade principalmente entre crianças e idosos. Estimou-se que em 2000, houve 14,5 milhões de episódios de doenças pneumocócicas graves no mundo, causando 826.000 mortes em crianças de 1 a 59 meses, das quais 91.000 eram crianças HIV positivas e 735.000 eram crianças HIV negativas. Assim, as infecções causadas por pneumococo seriam responsáveis por 11% de todas as mortes nessa faixa etária (O'Brien *et al.*, 2009; Troeger *et al.*, 2017). Já em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou 476.000 mortes de crianças HIV negativas menores do que cinco anos causadas por infecções pneumocócicas. Isso representou 5% de todas as causas de mortalidade em crianças nesse grupo etário e uma redução de cerca de 35% nas mortes de crianças HIV negativas por pneumococo quando comparado ao ano 2000 (Organização Mundial Da Saúde, 2012). As taxas de doenças e a mortalidade são mais altas nos países em desenvolvimento, com a maioria das mortes ocorrendo na África e na Ásia (O'Brien *et al.*, 2009; Roca *et al.*, 2006). Dados mais recentes indicaram a ocorrência de 3,7 milhões de casos de doença pneumocócica severa e

294.000 mortes de crianças de 1 a 59 meses em 2015 em todo o mundo (Wahl *et al.*, 2018).

No período de 2004 a 2006, houve 34.217 internações por doenças pneumocócicas (DP) no banco de dados do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil. Essas internações representaram 0,1% de todas as hospitalizações do setor público no Brasil. Desses casos, 47,1% eram crianças menores que 5 anos de idade, sendo que o sintoma mais comum era pneumonia (64,8% de todos os casos de DP). Para meningite bacteriana, 41,4% das hospitalizações tiveram o patógeno identificado, e entre esses patógenos, o pneumococo foi identificado em 31,3% dos casos. Além disso, o *S. pneumoniae* também foi identificado em 2,6% de todas as hospitalizações no SUS por sepse (Novaes *et al.*, 2011).

As comparações das taxas de hospitalizações anuais por pneumonia são complexas devido a diferentes práticas de diagnóstico clínico e nomenclatura médica. As taxas de internação por DP provavelmente ainda estão subestimadas, pois para algumas doenças a hemocultura não é realizada com frequência. Apesar disso, é possível observar que as taxas anuais de hospitalizações por idade no Brasil eram semelhantes aos outros estudos em países desenvolvidos antes da implementação do programa de imunização pneumocócica em crianças (Novaes *et al.*, 2011).

1.3. Colonização por pneumococo

As doenças microbianas geralmente envolvem múltiplos estágios, como a entrada do microrganismo, estabelecimento, invasão e saída, e normalmente iniciam-se com a colonização da superfície dos hospedeiros (Kono *et al.*, 2016). Os humanos são alvos de doenças causadas por *S. pneumoniae* e o principal reservatório dessa bactéria, que coloniza a superfície da mucosa da nasofaringe humana de forma comensal. Além dos humanos, alguns estudos encontraram pneumococo em cavalos e outros mamíferos, incluindo chimpanzés selvagens (Sá-Leão; Tomasz, 2019). Nos mamíferos, a nasofaringe conecta o nariz, ouvidos, bocas e vias respiratórias inferiores, sendo um ambiente dinâmico com constante fluxo de ar, sangue e muco, que abriga milhões de microrganismos (Shak *et al.*, 2013).

Uma vez que a nasofaringe foi colonizada, a indução da doença resulta da combinação da defesa prejudicada do hospedeiro e da virulência microbiana, podendo beneficiar o microrganismo para proliferação e/ou transmissão (O'Brien *et al.*, 2009). Assim, o pneumococo pode migrar pelos tubos auditivos (trompa de Eustáquio) e causar otite média, para as cavidades sinusais e causar sinusite, descer para o trato respiratório inferior e causar pneumonia, como indicado na Figura 2, ou invadir a corrente sanguínea através do epitélio respiratório e causar bacteremia ou meningite (Bluestone, 1996; Mook-Kanamori *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2009).

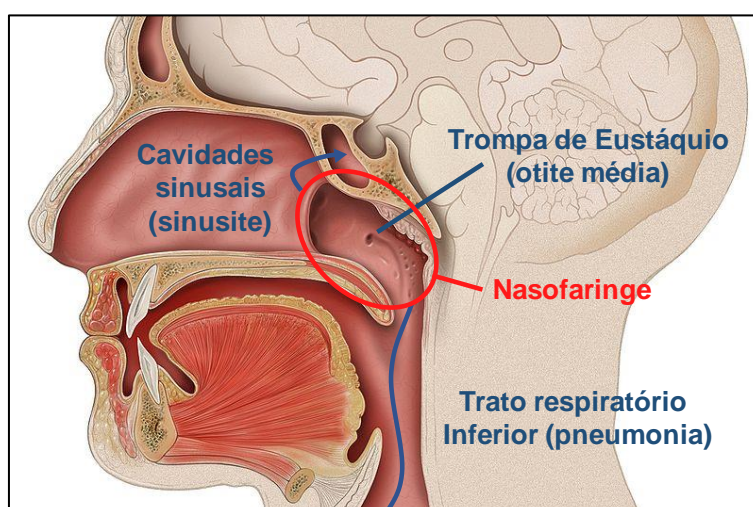


Figura 2. Migração do *S. pneumoniae* que pode causar diversas doenças. O pneumococo pode se espalhar a partir da colonização da nasofaringe e causar sinusite, otite média e pneumonia. As setas azuis indicam os caminhos onde a bactéria pode migrar e o círculo vermelho indica a nasofaringe, local onde ocorre a colonização. Figura adaptada de Shak *et al.* (2013).

A transmissão ocorre de pessoas colonizadas para pessoas não colonizadas por contato próximo, como entre irmãos ou em creches, resultando em exposição direta ou indireta com as secreções respiratórias (Mosser *et al.*, 2014; Pessoa *et al.*, 2013). Uma vez adquirido, o pneumococo pode manter-se na nasofaringe por semanas ou meses antes de sua eventual remoção completa pelo hospedeiro (Kadioglu *et al.*, 2008). Os isolados humanos que foram anteriormente utilizados em estudos de colonização também colonizaram camundongos, mostrando a relevância desses modelos animais para outros estudos (Nelson *et al.*, 2007).

A colonização por pneumococo pode ocorrer a qualquer momento durante a vida de uma pessoa, mas é mais comum durante a infância, podendo iniciar no primeiro dia de vida (Tigoi *et al.*, 2012). A condição para o desenvolvimento de uma doença pneumocócica é a colonização da nasofaringe. A frequência de colonização da nasofaringe por pneumococo é comum e varia de acordo com a localização geográfica e condições socioeconômicas, com taxas prevalentes de 40-90% em crianças menores do que cinco anos de idade, e de 1- 10% em adultos (Adetifa *et al.*, 2012; Bogaert *et al.*, 2004). A colonização simultânea por múltiplas cepas de pneumococo, denominada co-colonização, também é comum. Das crianças colonizadas, aproximadamente metade são colonizadas simultaneamente com duas ou mais cepas de *S. pneumoniae* (Turner *et al.*, 2011; Wyllie *et al.*, 2014).

1.4. Cápsula polissacarídica e fatores de virulência proteicos

O pneumococo apresenta várias estratégias que o protegem do sistema imune e estão envolvidas no processo da doença, produzindo vários fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, proteínas de superfície, enzimas e toxinas (Mitchell; Mitchell, 2010). O polissacarídeo capsular (PS) é considerado o principal determinante da virulência pneumocócica, essencial para a colonização da nasofaringe e resistência à deposição do complemento, dificultando o reconhecimento pelos receptores do complemento nos fagócitos (Brown *et al.*, 1983). Além disso, a expressão da cápsula reduz o aprisionamento do pneumococo no muco produzido pelo hospedeiro, permitindo o acesso à superfície epitelial pela bactéria (Kadioglu *et al.*, 2008).

O sorotipo é definido como uma linhagem de pneumococo produzindo um PS com uma única estrutura química e propriedade sorológica, enquanto que o sorogrupo inclui sorotipos que compartilham as mesmas propriedades sorológicas (Geno *et al.*, 2015). Os primeiros estudos com soro de pacientes já indicavam heterogeneidade do pneumococo, levando à identificação de sorotipos capsulares diferentes e demonstrando proteção sorotipo-específica de anticorpos contra a cápsula polissacarídica (Geno *et al.*, 2015; Griffith, 1966; Heidelberger; Avery, 1923).

O pneumococo apresenta 98 sorotipos descritos que possuem diferentes composições e estruturas (Austrian, 1986; Geno *et al.*, 2015; Loughran *et al.*, 2019).

A determinação do PS requer a identificação de aspectos estruturais das unidades que se repetem, incluindo a identificação e a ordem dos resíduos de sacarídeos e suas ligações (Calix *et al.*, 2012). Além do polissacarídeo capsular, existem diversos fatores de virulência proteicos, como a toxina pneumolisina (Ply), lipoproteínas, como o antígeno A da superfície de pneumococo (PsaA), e proteínas ligadas à colina (CBPs) como proteína A da superfície de pneumococo (PspA) e proteína C da superfície de pneumococo (PspC), como esquematizado na Figura 3 (Del Mar García-Suárez *et al.*, 2006; Mitchell; Mitchell, 2010).

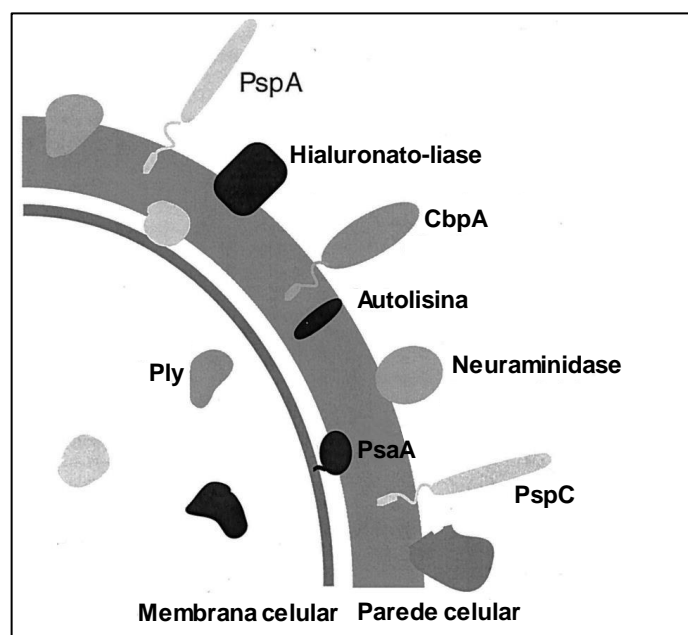


Figura 3. Esquema dos fatores de virulência proteicos de *S. pneumoniae*. A figura mostra importantes fatores de virulência proteicos do pneumococo, como pneumolisina (Ply), proteína A da superfície de pneumococo (PspA), proteína C da superfície de pneumococo (PspC) e antígeno A da superfície de pneumococo (PsaA). Adaptada de Jedrzejewski (2001).

1.5. Antibióticos e vacinas

Antes da era dos antibióticos, a pneumonia causada por pneumococo era tão comum e fatal que foi denominada por William Osler como um velho amigo do homem e o capitão dos homens da morte. Quando a penicilina foi descoberta, o pneumococo estava entre os primeiros patógenos testados para eficácia terapêutica desse antibiótico (Sá-Leão; Tomasz, 2019). Atualmente, o tratamento da pneumonia por *S. pneumoniae* inclui antibióticos β -lactâmicos, macrolídeos e tetraciclina (Leonard; Lalk, 2018). A introdução de antibióticos não diminuiu a incidência de

infecções por pneumococo, mas contribuiu significativamente no controle da doença. Porém, o uso dos antibióticos também contribuiu para o aparecimento de cepas resistentes (Link-Gelles *et al.*, 2013)

Já a introdução das vacinas apresentou um maior impacto no controle de doenças invasivas causadas por pneumococo. As vacinas disponíveis no mercado (Tabela 1) baseiam-se na indução de anticorpos anti-PS, com alta eficiência contra doença pneumocócica invasiva. No entanto, existem limitações quanto ao seu uso. A primeira geração de vacinas é composta por PS dos 23 sorotipos prevalentes em doença invasiva (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F- Pneumovax- Merck), sendo indicada somente para idosos, visto que é pouco imunogênica em crianças. A resposta imune é independente de células T e, conseqüentemente, não induz memória imunológica (Robbins *et al.*, 1983; Sá-Leão; Tomasz, 2019; Song *et al.*, 2013).

As vacinas de segunda geração são compostas de PS conjugados a proteínas carregadoras. A primeira vacina de segunda geração, 7-valente (PCV7), foi licenciada em 2000 e continha os sete sorotipos que eram mais prevalentes em doença invasiva na época nos Estados Unidos e Europa (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F- Prevenar-Wyeth) conjugados com uma toxina diftérica mutada, a CRM197. Vacinas conjugadas têm indicação de uso em crianças e a PCV7 mostrou-se eficiente na proteção contra infecções invasivas nesse grupo. Na época em que foi licenciada, a PCV7 apresentava cobertura de 85% nos Estados Unidos e 60-70% na Europa (Pelton *et al.*, 2003), mas de apenas 58% no Brasil (Brandileone *et al.*, 2003). Em 2007, a OMS publicou uma carta de posicionamento recomendando que todos os países incluíssem a PCV como parte do programa de imunização das crianças (Centro De Controle De Doenças, 2018). Foi estimado pela OMS que nos países em desenvolvimento, onde ainda não havia disponibilidade da PCV, 1,6 milhão de pessoas por ano morriam de doenças pneumocócicas, incluindo 0,7-1,0 milhão de crianças com menos de 5 anos (Sá-Leão; Tomasz, 2019).

Devido à conjugação com um componente proteico, vacinas conjugadas induzem uma resposta dependente de células T e memória, além de diminuir a colonização da nasofaringe por pneumococo. O uso da PCV7 causou uma grande redução em doença invasiva e mortalidade por doenças pneumocócicas nos países

em que foi introduzida (Fitzwater *et al.*, 2012). No entanto, como a proteção induzida por essa vacina é sorotipo específica, foi observada substituição de sorotipos mais prevalentes em doença invasiva em vários estudos realizados após seu licenciamento (Frazao *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005), efeito causado pela pressão seletiva promovida pela vacina (Weinberger *et al.*, 2011). O sorotipo não-vacinal (NVT) 19A tornou-se a causa predominante de doença pneumocócica invasiva em crianças nos Estados Unidos após a introdução da PCV7 (Hicks *et al.*, 2007). Outro exemplo da alteração de sorotipos ocorreu com o sorotipo 6C, com dados sugerindo aumento do sorotipo 6C na colonização após a introdução da PCV7 nos Estados Unidos (Nahm *et al.*, 2009) e no Reino Unido (Tocheva *et al.*, 2010). Aumento em doença pneumocócica invasiva causada pelo sorotipo 6C também foi descrito nos Estados Unidos (Richter *et al.*, 2013).

Outras duas novas vacinas de segunda geração foram licenciadas. Uma das formulações é a vacina 10-valente (PCV10 - Synflorix- GlaxoSmithKline Biologicals) que contém 10 sorotipos (PCV10- 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5 e 7F) conjugados à proteína D de *Haemophilus influenzae*, toxóide tetânico ou toxóide diftérico (Prymula *et al.*, 2006; Prymula; Schuerman, 2009). A outra contém 13 sorotipos conjugados à CRM197 (PCV13 - Prevenar 13- Pfizer) e foi licenciada em substituição à PCV7, apresentando seis sorotipos adicionais (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F) (Bryant *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2007).

O processo de purificação e conjugação de até treze sorotipos de PS é complexo, gerando um alto custo de produção dessas vacinas. A PCV13 tem um custo de cerca de US\$ 135 por dose nos EUA, sendo que a imunização completa é composta de três doses.

Tabela 1. Vacinas comerciais contra *S. pneumoniae*.

Vacina (nome comercial)	PPS23 (Pneumo 23)	PCV7 (Prevenar)	PCV10 (Synflorix)	PCV13 (Prevenar 13)
Ano de licenciamento	1983	2000	2008	2009
Proteína carreadora	Não conjugada	Toxina diftérica mutada (CRM197)	Proteína D de <i>H. influenzae</i> , toxóide tetânico ou diftérico	Toxina diftérica mutada (CRM197)
Sorotipos	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F	PCV7 + 1, 5 e 7F	PCV10 + 3, 6A e 19A
Polissacarídeos (conteúdo, µg)	25µg por sorotipo	6B, 4 µg; outros, 2 µg	4, 18C, 19F, 3 µg; outros, 1 µg	6B, 4,4 µg; outros, 2,2µg
Adjuvante	Sem adjuvante	Fosfato de alumínio	Fosfato de alumínio	Fosfato de alumínio

1.6. Implementação das PCVs e substituição de sorotipos

A inclusão das PCVs nos programas de imunização em vários países tem modificado a epidemiologia de sorotipos de pneumococo (Feikin *et al.*, 2013). Estudos da prevalência dos sorotipos na colonização antes e depois da introdução da PCV apresentaram informações importantes em relação aos efeitos da vacinação na colonização por sorotipos presentes na vacina (Käyhty *et al.*, 2006; Weinberger *et al.*, 2013). Em março de 2010, a PCV10 foi introduzida no Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde no Brasil para crianças com o esquema de 3 doses iniciais nas idades de 2, 4 e 6 meses, e uma dose de reforço para crianças de 12 a 18 meses (3+1) (Domingues *et al.*, 2014). Posteriormente, em 2016, o esquema vacinal foi reduzido a duas doses iniciais nas idades 2 e 4 meses e a terceira dose de reforço na idade 12-18 meses (2+1) (Ministério Da Saúde, 2018).

O impacto da implementação da PCV10 em doença pneumocócica invasiva (IPD) no Brasil também foi avaliada e o número de casos de IPD causados por sorotipos PCV10 caiu 41,3% entre 2008-2009 e 2011-2013, enquanto os casos decorrentes dos outros três sorotipos contidos na PCV13 aumentaram em 62,8%, principalmente entre crianças com menos de cinco anos. Entre crianças de 2 a 23 meses houve uma redução de 44,2% em IPD. No entanto, foi encontrado um aumento em IPD em adultos entre 18 e 39 anos, 40 a 64 anos e com mais de 65 anos (Andrade *et al.*, 2016).

Um estudo realizado em crianças de 12 a 24 meses de idade saudáveis e vacinadas com PCV10 em São Paulo mostrou que aproximadamente 60% das crianças são colonizadas por pneumococo. Comparadas a crianças não vacinadas no ano de 2010, houve diminuição na colonização por VT (sorotipo vacinal) de 90,9% e 95,5% em 2013 e 2017, respectivamente, e a colonização por isolados NVT aumentou 128% e 185%, mostrando substituição de sorotipos de pneumococo colonizando essas crianças. Além disso, também foi observada alta diversidade de sorotipos em 2017 comparada ao ano de 2013, mostrando que a substituição de sorotipos ainda estaria ocorrendo depois de 3 anos de uso de PCV10 (Brandileone *et al.*, 2019). Nos sorotipos incluídos na PCV13, foram observados redução de 85,7% no sorotipo 6A e aumento de 233,3% no sorotipo 19A em 2017 comparado ao ano de 2010 no Brasil. Poucas crianças colonizadas com o sorotipo 3 foram encontradas em 2010 e 2013. Em 2017, não foi encontrada nenhuma criança com sorotipo 3. Devido à alta prevalência em doenças pneumocócicas invasivas, o sorotipo 6C também foi avaliado depois da introdução da PCV10 e foi observado um aumento de 883,3%. A alta prevalência de colonização por sorotipos presentes na PCV10 antes da vacinação (47,8%) diminuiu para 1,4% na pesquisa realizada em 2017, sendo representada pelos sorotipos 6B, 9V, 14, 18C e 23F (Brandileone *et al.*, 2019).

As intervenções contra doença causada por pneumococo, como a introdução de antibióticos ou vacina, impactaram a população de pneumococo, selecionando os pneumococos resistentes a antibióticos e com cápsulas menos comuns (Sá-Leão; Tomasz, 2019). Embora a PCV seja eficiente contra IPD causadas por isolados VT em crianças, fica claro que sua utilização leva a uma rápida substituição de sorotipos tanto na colonização da nasofaringe como em doença invasiva. A introdução das vacinas conjugadas levou, portanto, a um quadro epidemiológico dinâmico, com aumento de isolados NVT. Deste modo, o desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes contra *S. pneumoniae* continua sendo prioridade. Uma estratégia importante envolve a utilização de antígenos proteicos, separados ou combinados, comuns a todos os sorotipos de pneumococo. Uma vacina proteica apresentaria baixo custo de produção, eliminaria a dependência do sorotipo e induziria uma resposta de memória T-dependente mais imunogênica em crianças.

Os antígenos de pneumococo mais estudados até o momento e, aparentemente, os candidatos vacinais mais promissores são Ply, PspA, PspC e PsaA.

1.7. Proteína A de superfície de pneumococo

A PspA apresenta um importante papel na evasão do sistema imune, bloqueando a ativação do complemento pela via alternativa, o que interfere na deposição de C3 na superfície do pneumococo (Ren *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 1999). No trabalho de Tu *et al.* (1999) foi possível observar que a cepa que não expressava PspA foi eliminada mais rapidamente do sangue comparada à mesma cepa selvagem. Além disso, o C3 circulante foi mais consumido no sangue do hospedeiro com a cepa nocaute para PspA, que apresentou maior ligação ao C3 do que a cepa que expressava PspA.

Outra função da PspA é relacionada a sua habilidade de se ligar à apolactoferrina. A lactoferrina está presente em quantidades significativas no leite, saliva, lágrimas e oferece proteção contra a colonização nasal e infecção bacteriana. Enquanto a lactoferrina carrega dois íons metálicos, a apolactoferrina não carrega nenhum íon metálico e pode ser bacteriostática e bactericida para muitas bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Streptococcus mutans* (Arnold *et al.*, 1980; Chapple *et al.*, 1998). No caso do pneumococo, a apolactoferrina provavelmente desestabiliza a membrana de maneira semelhante a peptídeos catiônicos antibacterianos. A ligação da PspA à apolactoferrina parece bloquear sua atividade através de ligação a sítios específicos (Shaper *et al.*, 2004).

PspA é encontrada em todos os isolados de pneumococo, possui tamanho entre 67 a 99 kDa, e apresenta variabilidade estrutural e antigênica em diferentes cepas. Foi demonstrado que PspA recombinante administrada com adjuvantes pode induzir uma resposta de anticorpos protetora em modelos animais de desafio de colonização, pneumonia e desafio letal (Briles *et al.*, 2000; Briles *et al.*, 2003; Ogunniyi *et al.*, 2000). Essa proteína apresenta um domínio na região C-terminal de ligação à colina; ao lado desse domínio há uma região rica em prolinas e na região N-terminal há um domínio em α -hélice que fica exposto na parede bacteriana, como representado na Figura 4 (Yother; Briles, 1992). Baseando-se na diversidade de sequência de aminoácidos da região variável localizada antes da região rica em

prolinas, denominada região definidora do clado (clade defining region - CDR), Hollingshead e colaboradores (Hollingshead *et al.*, 2000) propuseram uma classificação para os isolados de pneumococo que os agrupa em 3 famílias: a família 1, subdividida nos clados 1 e 2; a família 2, subdividida nos clados 3, 4 e 5; e a família 3, de ocorrência bastante restrita, com o clado 6 (Figura 5).

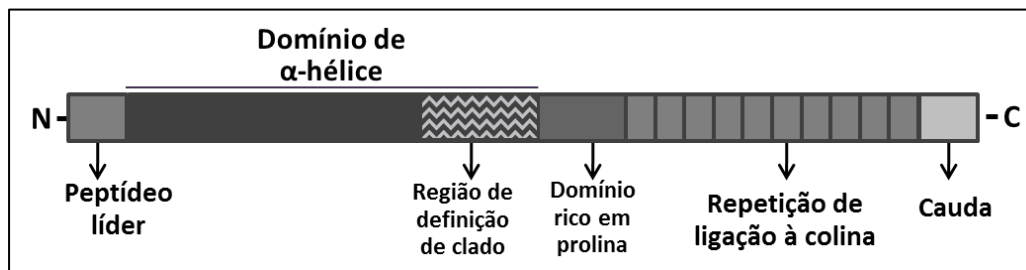


Figura 4. Representação esquemática dos domínios da proteína PspA. A proteína PspA é dividida em 5 regiões: peptídeo sinal de exportação na região N-terminal, domínio de α -hélice que se encontra exposta na parede bacteriana, seguida de um domínio rico em prolina e região de repetição de ligação à colina que ancora a proteína à superfície celular. No domínio de α -hélice, há uma região definidora de clado (CDR) utilizada para classificar os isolados em clados. Adaptada de Moreno *et al.* (2010).

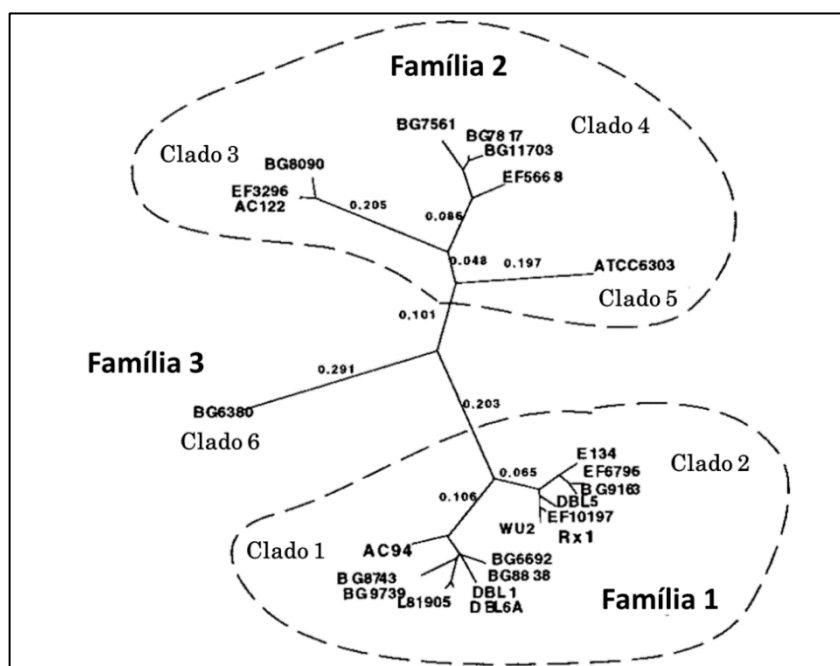


Figura 5. Filograma da classificação de PspA em famílias e clados. Relação entre as sequências de aminoácidos da CDR de PspA. A árvore é dividida em 3 famílias e 6 clados baseados na proximidade das ramificações, sendo dividida nos clados 1 e 2 (família 1), clados 3, 4 e 5 (família 2) e clado 6 (família 3). Os números indicam a distância ao longo dos comprimentos da ramificação. Adaptada de Hollingshead *et al.* (2000).

Estudos mostraram que PspA das famílias 1 e 2 estão presentes em pelo menos 90% dos isolados em vários países (Beall *et al.*, 2000; Brandileone *et al.*,

2004; Heeg *et al.*, 2007). Como a reatividade cruzada entre as famílias é baixa, foi proposto que uma vacina baseada em PspA deveria conter ao menos um PspA pertencente à família 1 e outro à família 2 para apresentar uma maior cobertura. Ao analisar fragmentos de PspA de clados 1 a 5, nosso grupo observou que PspA de clado 4 (PspA4) e de clado 5 (PspA5) foram capazes de induzir anticorpos que reconhecem a maioria dos isolados de pneumococo em experimentos de *western blot* (Darrieux *et al.*, 2008). Os anticorpos gerados contra PspA4 e PspA5 foram ainda capazes de mediar deposição de complemento *in vitro* em bactérias expressando PspAs dos clados 1 a 5, além de induzir proteção de camundongos contra desafio letal com bactérias expressando PspA de família 1 ou família 2 (Moreno *et al.*, 2010). Imunização com PspA5 sob a forma de vacina de DNA ainda foi capaz de induzir proteção cruzada contra a colonização da nasofaringe de camundongos (Ferreira *et al.*, 2010).

Estudos que avaliaram o genoma completo de 240 isolados de pneumococo provenientes de uma linhagem resistente a múltiplos antibióticos (Croucher *et al.*, 2011) e de 616 isolados obtidos da nasofaringe de humanos saudáveis após a introdução da PCV7 mostraram que, além da região que contém os genes de síntese da cápsula, os *loci* que sofreram maior pressão seletiva com alta taxa de recombinação foram *pspA*, *pspC* e *psrP* (*Pneumococcal serine-rich repeat protein*). Assim, foi proposto que esses antígenos são realmente importantes e envolvidos na evasão do sistema imune, mas que sua utilização como vacina poderia levar a um fenômeno semelhante àquele observado com a substituição de sorotipos através do uso da vacina conjugada (Croucher *et al.*, 2013).

1.8. Principais mecanismos de eliminação do pneumococo

Pneumococos apresentam variação de fase, com morfologia opaca e transparente (Weiser *et al.*, 1994). Na fase opaca, a cápsula polissacarídica é mais espessa e ocorre aumento da virulência na infecção sistêmica, já que a cápsula protege a bactéria da deposição de complemento em sua superfície e, conseqüentemente, da fagocitose. Na fase transparente, a cápsula é mais fina e permite a melhor adesão à nasofaringe pela exposição de fatores de adesão na superfície da bactéria (Kim; Weiser, 1998; Weiser *et al.*, 1994).

Foram propostos diferentes mecanismos de proteção contra o pneumococo, incluindo mecanismos dependentes de células T e dependentes de anticorpos. Na infecção primária, acredita-se que anticorpos apresentem um papel limitado na eliminação da colonização por pneumococo (Mccool; Weiser, 2004). Foi demonstrado ainda que a exposição nasal a pneumococos é capaz de proteger contra novo desafio por mecanismo independente de anticorpos e dependente de células T-CD4⁺ (Malley *et al.*, 2005). A secreção de IL-17A por células CD4⁺ Th17 levaria ao recrutamento de monócitos/macrófagos na infecção primária e de neutrófilos em animais previamente colonizados, levando à eliminação da colonização (Zhang *et al.*, 2009). No entanto, modelos de desafio experimental de colonização em humanos não encontraram associação entre resposta Th17 ou células T CD4⁺ de memória e o controle da colonização. Indivíduos com maiores concentrações de CXCL10 antes do desafio apresentaram maior carga bacteriana na nasofaringe (Jochems *et al.*, 2018). Além disso, foi observada depleção de células B na mucosa nasal após o estabelecimento da colonização devido à recirculação de células B ativadas. Células T CD8⁺ invariáveis associadas à mucosa (MAIT) também foram associadas à proteção contra a colonização por pneumococo (Jochems *et al.*, 2019).

Quanto aos anticorpos, diferentes mecanismos para a eliminação de patógenos já foram descritos: i. anticorpos podem agir como opsoninas, aumentando o reconhecimento por fagócitos ou levando à deposição de complemento seguida de lise, ii. anticorpos podem marcar células infectadas para destruição por citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células, iii. anticorpos podem neutralizar um patógeno através de ligação à superfície e inibição de crescimento, iv. anticorpos podem cobrir a superfície de um patógeno e impedir a adesão a células e tecidos do hospedeiro, v. anticorpos, devido à capacidade de ligação multivalente, podem aglutinar seu alvo, formando agregados que são reconhecidos de forma mais efetiva e eliminados mecanicamente (Brouwer *et al.*, 2008).

Em relação ao papel de anticorpos na proteção contra a colonização da nasofaringe, foi proposto que a aglutinação de pneumococos por anticorpos IgG anti-PS teria um papel crucial na eliminação da colonização de indivíduos imunizados com as PCVs (Roche *et al.*, 2015). Esse mecanismo seria independente

de Fc, complemento e fagocitose, levando à aglutinação das bactérias e eliminação da nasofaringe por batimento mucociliar. Aglutinação mediada por anticorpos anti-PspA foi recentemente descrita (Habets *et al.*, 2017). Já em relação ao papel dos anticorpos na proteção contra a infecção invasiva, foi descrito que a opsonização da bactéria seguida de deposição de complemento e fagocitose por macrófagos e neutrófilos seria o meio principal de eliminação do pneumococo (Dalia *et al.*, 2010; Lysenko *et al.*, 2007; Matthias *et al.*, 2008).

1.9. Sistema imunológico de mucosa

Os tratos respiratório, digestivo e urogenital são cobertos por membranas de mucosas que são dotadas de mecanismos de limpeza química e mecânica que repelem e degradam as substâncias estranhas. Assim, o sistema imunológico de mucosa inato e adaptativo é altamente especializado para proteger essas superfícies e o interior do corpo contra possíveis injúrias causadas pelo meio ambiente. Em um humano saudável, por exemplo, esse sistema imunológico local contribui com cerca de 80% de todos os linfócitos imunocompetentes. O sistema imunológico de mucosa apresenta três funções: proteger as membranas mucosas contra colonização e invasão por microrganismos potencialmente perigosos, impedir a captação de antígenos não-degradados, incluindo proteínas estranhas provenientes de material ingerido, transportado pelo ar e de microrganismos comensais, e impedir que o desenvolvimento de uma resposta imune potencialmente prejudicial no local atinja locais internos à mucosa (Holmgren; Czerkinsky, 2005).

O sistema imune da mucosa mantém a homeostase imunológica ao longo da extensão da área da superfície e o início da resposta imune específica para antígeno ocorre pelas células T, células B e células apresentadoras de antígeno, localizadas no tecido linfoide associado à mucosa (MALT). O MALT compreende vários tecidos de mucosa como a nasal, vulvovaginal, gastrointestinal, entre outras (Fukuyama *et al.*, 2011; Holmgren; Czerkinsky, 2005). Essa característica de compartimentos individuais do sistema imunológico da mucosa reflete em diferenças, como na produção de imunoglobulinas (Ig), expressão de receptores epiteliais responsáveis pelo transporte de Ig produzida localmente ou proveniente do

plasma, regulação do transporte de Ig por hormônios, citocinas e outras substâncias que participam da distribuição de Ig em secreções externas (Mestecky *et al.*, 2005).

Após a ativação das células T e B de uma mucosa específica, elas migram do sistema linfático e sangue para outros sítios, completando sua diferenciação (Holmgren; Czerkinsky, 2005; Mak *et al.*, 2014). As quimiocinas, integrinas e citocinas são diferencialmente expressas nos tecidos de mucosa, portanto ocorre compartimentalização das mucosas ligando locais indutores e sítios efetores específicos, como o intestino com glândulas mamárias e a mucosa respiratória com a genital (Holmgren; Czerkinsky, 2005). Portanto, vários estudos são realizados para induzir respostas imunes eficazes com diferentes vias de vacinação. Por exemplo, a imunização de mucosa nasal não apenas estimula uma resposta no trato respiratório, mas também pode resultar em uma forte resposta imune na mucosa genital vaginal (Johansson *et al.*, 2001; Kozlowski *et al.*, 1997). A predominância de IgA nas secreções externas é considerada uma característica importante para prevenir infecções, mas alguns estudos comparativos de níveis de Ig em secreções externas coletadas de humanos e animais experimentais comuns, revelaram que em algumas secreções o nível de IgG pode até exceder os níveis de IgA (Holmgren; Czerkinsky, 2005). Na Figura 6 é possível observar a produção de IgA da resposta imunológica após diferentes vias de vacinação.

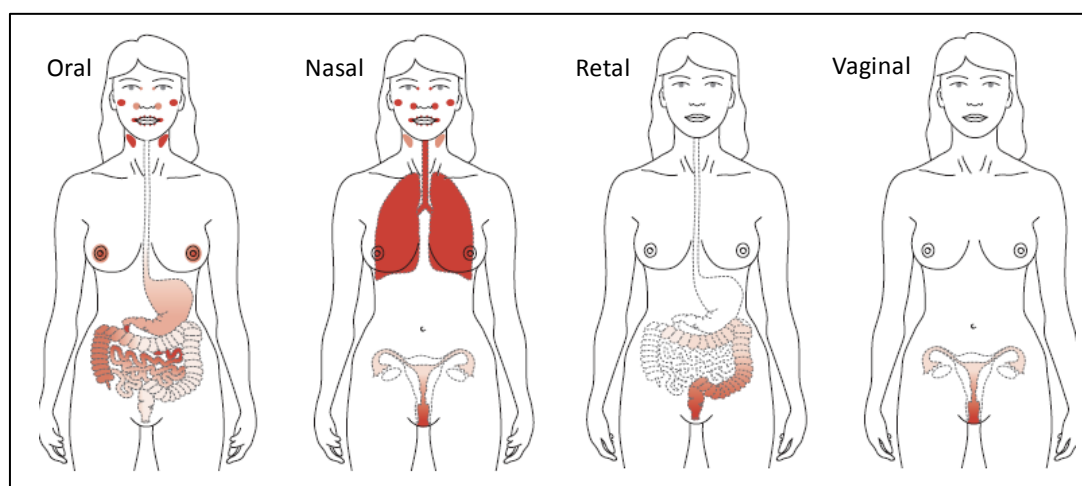


Figura 6. Identificação de IgA na mucosa após diferentes vias de vacinação. Vias de vacinação oral, nasal, retal e vaginal e os locais de respostas imunológicas nos quais há anticorpos IgA identificados em vermelho no esquema; onde o vermelho mais escuro indica uma resposta mais intensa. Adaptada de Holmgren e Czerkinsky (2005).

1.10. Eficácia de imunização com PspA em modelo de co-colonização por pneumococo

A eficácia do antígeno PspA na proteção contra colonização com um único isolado de pneumococo foi avaliada por diferentes laboratórios (Briles *et al.*, 2000; Fukuyama *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2010). No entanto, existem poucos trabalhos envolvendo desafios de co-colonização com linhagens diferentes de pneumococos.

A análise de competição em modelo de colonização com isolados dos sorotipos 6B, 14, 19A, 19F, 23F e 35B foi realizada em animais naive e mostrou que o determinante principal do sucesso competitivo durante a colonização é o sorotipo. Foi avaliado desafio de co-colonização com isolados de sorotipo 14 e 19F em camundongos imunizados com uma vacina celular inativada utilizando a toxina colérica como adjuvante. Houve uma tendência de redução de colonização em comparação ao grupo imunizado com o adjuvante apenas e não houve diferença na razão da recuperação dos isolados 14 e 19F (Trzcinski *et al.*, 2015).

Em estudos realizados por nosso laboratório, foram estabelecidos dois modelos de co-colonização em camundongos: i. Colonização com dois isolados de sorotipo 6B e ii. Colonização com um isolado de sorotipo 6B e outro de sorotipo 23F (Tostes *et al.*, 2017). Os sorotipos 6B e 23F estão contidos nas vacinas conjugadas. No trabalho realizado, foi testada a imunização de camundongos com PspAs recombinantes de diferentes clados. A imunização foi realizada por via nasal utilizando a vacina celular pertussis (wP), produzida pelo Instituto Butantan, como adjuvante. A imunização com a mistura de PspA1 (PspA recombinante de clado 1) e PspA4 (PspA recombinante de clado 4) levou a uma diminuição da colonização nos dois modelos de co-colonização (6B PspA1 + 6B PspA4 e 23F PspA2 + 6B PspA3). Além disso, não foi observado um crescimento exacerbado de um isolado em relação ao outro, indicando uma menor probabilidade da ocorrência de substituição por pressão seletiva da vacinação com PspA.

2. OBJETIVOS

Este projeto visa à comparação da eficácia da PCV13 com vacina baseada em antígenos proteicos em modelo de co-colonização por pneumococos VT e NVT.

Os objetivos específicos são:

- Construir isolados com cassetes de resistência a eritromicina (Erm) e espectinomomicina (Spec) para estabelecimento dos modelos de co-colonização.
- Imunizar os camundongos com a vacina proteica contendo PspA1, PspA4 e wP por via nasal e com PCV13 por via subcutânea.
- Avaliar a resposta humoral induzida pela imunização.
- Avaliar a proteção contra co-colonização nos modelos estabelecidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Lista de meios de cultura e soluções

1. Meios de Cultura:

1.1. Meio líquido LB: triptona 1% (m/V), extrato de levedura 0,5% (m/V) e NaCl 1% (m/V).

1.2. Meio líquido LB-amp: meio LB e 100 µg/mL de ampicilina.

1.3. Meio THY: meio Todd-Hewitt (Difco) contendo 0,5% de extrato de levedura.

1.4. Placas de ágar sangue: meio Tryptic Soy Agar (TSA), 5% de sangue de carneiro (V/V) (Laborclin).

1.5. Meio de estoque de pneumococo: meio THY contendo 25% de glicerol.

1.6. Meios para transformação de pneumococo:

1.6.1. Meio THY pH 6,8 com 1mM CaCl₂ e 0,2% BSA

1.6.2. Meio THY pH 8,0 com 1mM CaCl₂ e 0,2% BSA

2. Soluções para gel de agarose:

2.1. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE): 400mM Tris base, 200mM ácido acético, 10mM EDTA.

2.2. Tampão ficol 10X: Azul de bromofenol 0,2% (m/V), xileno cianol 0,42% (m/V), glicerol 50% v/V

3. Soluções para SDS-PAGE:

3.1. Tampão de amostra para SDS-PAGE 5x: 250mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% (m/V), azul de bromofenol 0,5% (m/V), glicerol 50% (v/V) e 1M β-mercaptoetanol.

- 3.2. Tampão Tris-glicina 5x: Tris base 1,5% (m/V), glicina 9,4% (m/V) e SDS 0,5% (m/V).
- 3.3. Solução corante de SDS-PAGE: *coomassie brilliant blue* 0,25% (m/V), etanol 40% (v/V) e ácido acético 10% (v/V).
- 3.4. Solução descorante de SDS-PAGE: etanol 30% (v/V) e ácido acético 10% (v/V).
- 3.5. Solução secante de SDS-PAGE: etanol 50% (v/V) e ácido acético 10% (v/V).
4. Soluções para *western blot*:
 - 4.1. Tampão de lise: 0,1% de desoxicolato de sódio, 0,01% de SDS, 0,15M de citrato de sódio.
 - 4.2. Solução TBS-T 0,1%: 100mM de Tris-HCl pH 8,0, 150mM de NaCl, 0,1% de Tween-20.
 - 4.3. Tampão de transferência: tampão Tris-glicina, 20% de etanol.
 - 4.4. Solução de bloqueio: TBS-T e 5% de leite em pó desnatado.
5. Soluções para purificação das proteínas recombinantes:
 - 5.1. Tampão de equilíbrio: 50mM Tris pH 8,0, 150mM NaCl e 5mM imidazol.
 - 5.2. Tampão de lavagem: 50mM Tris pH8,0, 150mM NaCl e 20mM ou 40mM de imidazol.
 - 5.3. Tampão de eluição: 50mM Tris pH8,0, 150mM NaCl e 250mM de imidazol.
 - 5.4. Tampão de diálise: 10mM Tris pH8,0, 20mM NaCl e 0,1% glicina.
6. Soluções para ELISA para detecção de anticorpos anti-PspA:
 - 6.1. PBS (Solução tampão salina fosfato): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na_2HPO_4 , 1,5mM KH_2PO_4 , pH 7,4.
 - 6.2. PBS-T: PBS e 0,1% Tween-20® (v/V).
 - 6.3. Tampão PBS-T/BSA 1%: PBS-T e 1% albumina bovina sérica.
 - 6.4. Tampão carbonato-bicarbonato: 50mM Na_2CO_3 e 50mM NaHCO_3 , pH 9,6.
 - 6.5. Tampão citrato-fosfato: 100mM citrato de sódio e 300mM fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), pH 5,0.
 - 6.6. Solução substrato para revelação do ELISA: tampão citrato-fosfato pH 5,0, 0,04% de ortofenildiamina (Sigma) e 0,01% H_2O_2 .
 - 6.7. Solução de ácido sulfúrico: H_2SO_4 4M
7. Soluções para ELISA para detecção de anticorpos anti-polissacarídeos:
 - 7.1. TBS pH 7,4: 2mM KCl, 50mM Tris pH7,4, 150mM NaCl
 - 7.2. Tampão para *coating*: PBS

- 7.3. Tampão para anticorpo: PBS e 0,05% Tween-20 (v/V)
- 7.4. Tampão de lavagem: TBS pH 7,2 e 0,1% Brij® 35 solução (v/V)
8. Solução anestésica para imunização e desafio: 0,2% de xilazina e 0,5% de quetamina.
9. Solução para eutanásia: 0,2% de xilazina e 1% de quetamina.

3.2. Construção dos cassetes de resistência por PCR

A IgA1 protease de pneumococo cliva especificamente IgA1 humana, não agindo como fator de virulência no modelo de colonização de camundongos por pneumococo (Janoff *et al.*, 2014; Kono *et al.*, 2016). Portanto, a estratégia utilizada para construção dos cassetes de resistência foi a inserção dos genes *erm* ou *spec* dentro do gene *iga*, que codifica a IgA1 protease. O cassete construído contém o gene de resistência ao antibiótico flanqueado por 1000 bp contendo a região 250-1250 bp de *iga* na porção *upstream* e 1000 bp contendo a região 1750-2750 bp de *iga* na porção *downstream*, permitindo a inserção de *erm* ou *spec* no *locus iga* por recombinação homóloga em diferentes linhagens de pneumococo, como mostrado no esquema da Figura 7. A recombinação no *locus iga* leva à inserção do cassete de resistência, permitindo a seleção das colônias.

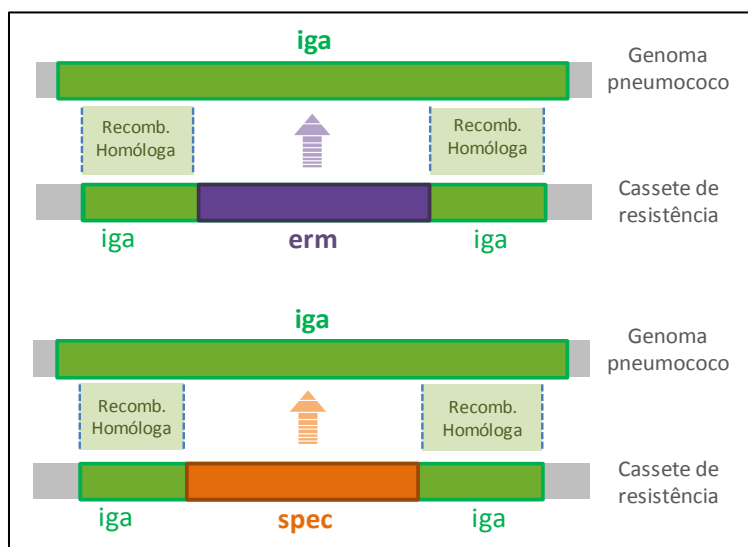


Figura 7. Representação do nocaute por recombinação homóloga. Nocaute por recombinação homóloga realizado no gene *iga* de *S. pneumoniae* com a inserção dos genes *erm* e *spec* que codificam para a resistência a eritromicina e espectinomicina. Os segmentos em verde representam o gene *iga*, em roxo e laranja os segmentos *erm* e *spec*, respectivamente. As linhas pontilhadas representam o local de recombinação homóloga e a seta representa a troca dos segmentos do plasmídeo para o genoma do pneumococo.

Para a construção de linhagens de pneumococo com resistência a diferentes antibióticos, a região 250-2750 do gene *iga* foi amplificada por PCR com *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) a partir do DNA genômico da linhagem TIGR4, com os *primers* Iga 250F e Iga 2750R (Tabela 2). A amostra foi separada em gel de agarose e o fragmento amplificado foi purificado pelo QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) conforme indicação do fabricante. O fragmento foi clonado em pGEM-TEasy (Promega), gerando pGEM Iga (Figura 8-A). Foi realizada uma PCR amplificando as regiões de 250-1250 (*iga up*) e 1750-2750 (*iga down*) (Tabela 2) junto ao vetor pGEM Iga, excluindo o segmento 1250-1750 do segmento de *iga* no plasmídeo, utilizando os *primers* Iga 1750 F Xho I e Iga 1250R Bam HI. O segmento *iga up* – pGEM – *iga down* (Figura 8-B) foi purificado e digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I para criar pontas coesivas nos dois segmentos de *iga*. O fragmento foi purificado novamente após a digestão.

Os cassetes de resistência a antibióticos foram amplificados de pE693 (*erm*) e pE729 (*spec*), com os *primers* Erm F Bam HI e Erm R Xho I, e Spec F Bam HI e Spec R Xho I (Tabela 2). As amostras foram separadas em gel de agarose e os fragmentos foram purificados para ligação em pGEM-TEasy, gerando pGEM Erm e pGEM Spec. Os plasmídeos foram digeridos com Bam HI e Xho I, liberando os insertos de *erm* ou *spec*, que foram ligados ao fragmento *iga up* – pGEM – *iga down* digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos gerados foram pGEM Iga Erm (Figura 8-C) e pGEM Iga Spec (Figura 8-D). Os plasmídeos obtidos foram submetidos a PCR de confirmação e sequenciamento por método de Sanger.

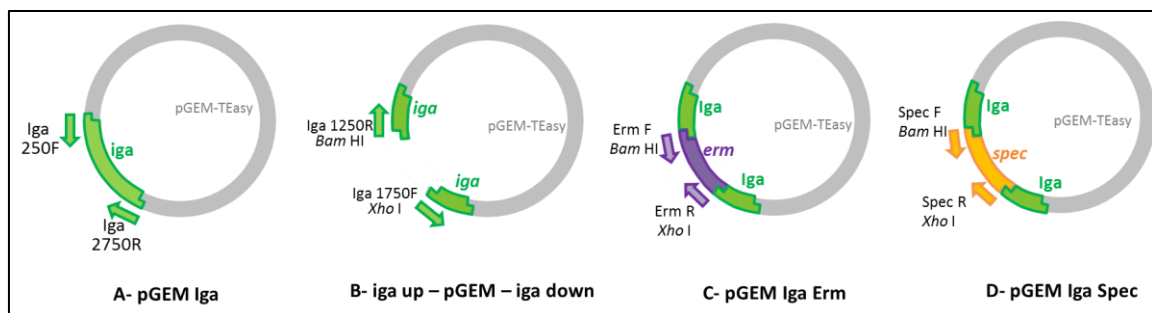


Figura 8. Esquema dos plasmídeos utilizados para construção do cassete. As setas representam os pares de *primers* utilizados para amplificação dos segmentos, em cinza o vetor pGEM-TEasy, em verde o gene *iga*, em roxo e amarelo os genes *erm* e *spec*, respectivamente.

3.2.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os fragmentos foram amplificados utilizando os *primers* listados na Tabela 2. As reações foram realizadas com *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) para clonagens de fragmentos ou com *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen) para confirmação de clonagens. As condições utilizadas estão listadas abaixo.

a) Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity

- **Mistura de reação.** Tampão PCR HiFi 1x (Thermo Fisher Scientific), dNTPs 0,2mM (Thermo Fisher Scientific), *primer forward* 2 μ M, *primer reverse* 2 μ M, 1U *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific), $MgSO_4$ 2 e 3,5 mM (Thermo Fisher Scientific) e H_2O Milli-Q para o volume final de 25 μ L.
- **Amplificação.** 94°C por 4min, 30 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 2min e 68°C por 1min para cada 1000 bp a amplificar, e por último 68°C por 7min.

b) Taq DNA polymerase recombinant

- **Mistura de reação.** Tampão PCR 1x (Thermo Fisher Scientific), dNTPs 0,2 mM (Thermo Fisher Scientific), *primer forward* 1 μ M, *primer reverse* 1 μ M, 1U *Taq DNA polimerase recombinante* (Thermo Fisher Scientific), $MgCl_2$ 2 mM (Thermo Fisher Scientific) e H_2O Milli-Q para o volume final de 25 μ L.

- **Amplificação.** 94°C por 4min, 30 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 2min e 72°C por 1min para cada 1000 bp a amplificar, e por último 72°C por 7min.

3.2.2. Digestão com enzimas de restrição

a) Digestão com *Bam* HI e *Xho* I

Tampão Tango 2x (Thermo Fisher Scientific), 10 µg de DNA, 2 U de enzima de restrição *Bam* HI e *Xho* I (Thermo Fisher Scientific) e H₂O Milli-Q para o volume final de 10 µL. As amostras para digestão foram incubadas a 37°C por 2 horas e analisadas em gel de agarose.

b) Digestão com *Eco* RI

Tampão Tango 2x (Thermo Fisher Scientific), 10 µg de DNA, 2 U de enzima de restrição *Eco* RI (Thermo Fisher Scientific) e H₂O Milli-Q para o volume final de 10 µL. As amostras para digestão foram incubadas a 37°C por 2 horas e analisadas em gel de agarose.

3.2.3. Eletroforese e purificação de fragmentos

As eletroforeses foram realizadas com gel de agarose 1% em TAE contendo brometo de etídeo, a 80 V por aproximadamente 40min. As amostras foram preparadas com tampão Ficol 1x e o padrão de peso molecular utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As purificações de fragmentos foram realizadas com *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

3.2.4. Clonagem e transformação de *Escherichia coli* com os cassetes de resistência

Os fragmentos amplificados por PCR e purificados foram clonados utilizando o kit do plasmídeo pGEM-TEasy (Promega) ou a T4 DNA ligase (Invitrogen). A reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias *E. coli* eletrocompetentes da cepa DH10B, que foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/ml. O DNA das colônias foi purificado com *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN).

Tabela 2. Primers utilizados na clonagem

Primer	Sequência	Amplificação (bp)
Iga 250F	GAGGAATAATGGAAAAGTATTTTG	2500
Iga 2750R	TTTTCACCGATTAACGAC	
Iga 1750F Xho I	GTAGCTCGAGGTCCAGAAAAACTGAAGAAG	5151
Iga 1250R Bam HI	TAGGGATCCTGAAAATCTATTTTTGTCTCTATAG	
Erm F Bam HI	TAGGGATCCTTCGTGCTGACTTGCACC	973
Erm R Xho I	GTAGCTCGAGAGTAACGTGTAACTTTCCAAATTTACAAAAG	
Spec F Bam HI	TAGGGATCCTAACTATAACTAATAACGTAACGTG	1134
Spec R Xho I	GTAGCTCGAGTATGCAAGGGTTTATTGTTTTC	

Os sítios de restrição estão sublinhados.

3.3. Isolados de *Streptococcus pneumoniae*

Os isolados de pneumococo foram cultivados em placas de ágar-sangue a 37°C durante 16 horas em microaerofilia. Posteriormente, as colônias foram coletadas e transferidas ao meio líquido THY para a preparação de estoques que foram mantidos a -80°C em THY contendo 25% de glicerol. As linhagens utilizadas foram TIGR4, HU368/06, 4431/119 e 237/53 (Tabela 3). O isolado TIGR4 foi cedido pelo Dr Jeffrey Weiser da Universidade da Filadélfia (EUA). O isolado HU368/06 foi cedido pela Dra. Marina B. Martinez do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo). Os isolados 4431/119 e 237/53 foram cedidos pela Dra. Daniela Ferreira da Liverpool School of Tropical Medicine (Reino Unido).

Tabela 3. Isolados de *S. pneumoniae*

Isolados	Sorotipo/ Sorogrupo	Presença do sorotipo na PCV13	Clado de PspA	Nomenclatura utilizada
TIGR4	4	VT	3	VT4-PspA3
HU368/06	23F	VT	2	VT23F-PspA2
4431/119	33	NVT	1	NVT33-PspA1
237/53	15B/C	NVT	4	NVT15B/C-PspA4

3.4. Transformação dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* com o cassete de resistência

As bactérias foram cultivadas em THY até atingir a densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 0,4 – 0,5. Em seguida, a cultura foi diluída em THY pH 6,8 (com $CaCl_2$ e BSA) até DO_{600nm} igual a 0,03. Após atingir DO_{600nm} igual a 0,10 - 0,15, a cultura foi diluída 1:10 em meio THY pH 8,0 (com $CaCl_2$ e BSA) em volume final de 10 mL. Foram adicionados 16 μ L do peptídeo indutor CSP2 (1 mg/mL) na transformação de VT4-PspA3 e CSP1 + CSP2 nas demais transformações, seguido de incubação por 15min a 37°C. Uma alíquota de 50 μ L do plasmídeo contendo o cassete de resistência foi adicionada ao cultivo. Em outro cultivo nas mesmas condições, como controle, não foi adicionado DNA. Os tubos foram então incubados por 1 hora a 30°C. Uma alíquota de cada cultivo foi plaqueada em ágar-sangue contendo os antibióticos adequados (Erm 1 μ g/mL ou Spec 300 μ g/mL). Para cada antibiótico, foram escolhidas oito colônias na primeira transformação (VT4-PspA3) e quatro colônias das demais linhagens para inóculo em ágar sangue por estria de esgotamento. As colônias de cada clone foram coletadas com auxílio de *swab* que foi agitado em meio THY com glicerol 25% para estoque em -80°C e uma alíquota foi utilizada para confirmação da transformação por PCR.

3.5. PCR para confirmação da transformação

A confirmação da transformação dos clones selecionados foi realizada por PCR com *Taq DNA Polymerase Recombinant* com os *primers* Iga 250F, Iga 2750R, Erm F *Bam* HI, Erm R *Xho* I, Spec F *Bam* HI, Spec R *Xho* I, conforme mostra a Figura 9.

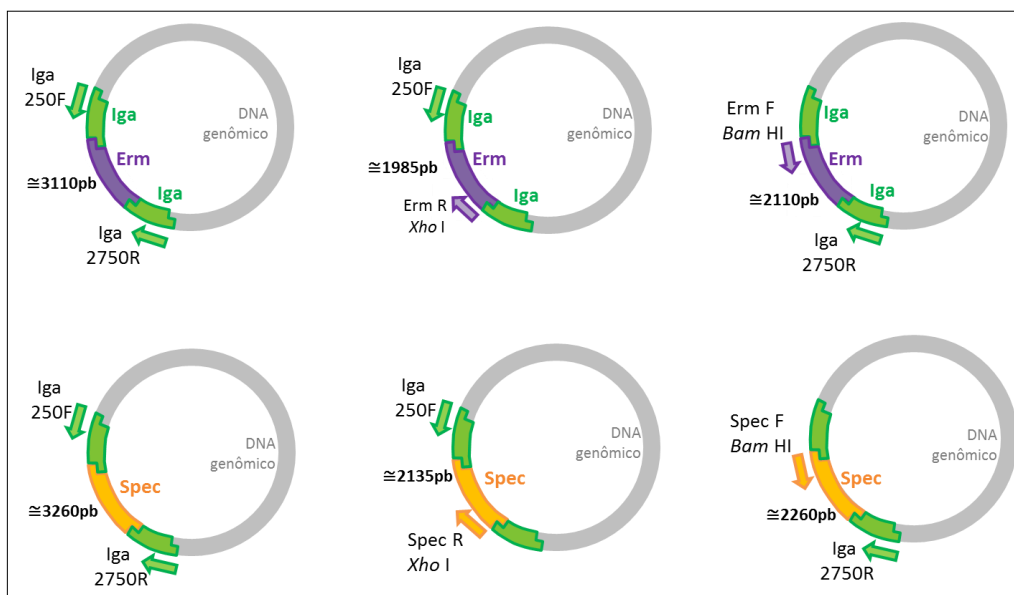


Figura 9. Representação das PCRs realizadas para confirmação da inserção do cassete. Foram utilizados os *primers* Iga 250F, Iga 2750R, Erm F Bam HI, Erm R Xho I, Spec F Bam HI, Spec R Xho I para a confirmação das transformações realizadas em *S. pneumoniae*. No esquema, as setas representam os pares *primers* utilizados, sendo que as setas em verde representam os *primers* que se ligam no gene *iga*, em roxo *primers* que se ligam em *erm* e em amarelo *primers* que se ligam em *spec*. Os tamanhos aproximados dos amplificados estão indicados entre os pares de *primers* e em cinza está a representação do DNA genômico da bactéria.

3.6. Estabelecimento dos modelos *in vitro* em co-cultura

Após a confirmação por PCR, os clones selecionados foram descongelados e cultivados em ágar sangue contendo Erm ou Spec, a 37°C durante 16 horas em microaerofilia. As colônias foram coletadas e transferidas ao meio líquido THY com antibiótico em DO_{600nm} inicial igual a 0,1 e incubadas a 37°C em microaerofilia até DO_{600nm} igual a 0,4. Posteriormente, os cultivos foram centrifugados a 3800 rpm por 10 minutos a 20°C. O precipitado celular foi ressuscitado em 2 mL de THY contendo 25% de glicerol para manutenção do estoque utilizado no estabelecimento dos modelos e no desafio. O estoque das linhagens foi quantificado por diluição seriada e avaliado quanto à estabilidade do plasmídeo para a resistência de Erm ou Spec em placas de ágar sangue contendo Gentamicina (Gent) (4 µg/mL), Erm ou Spec. Com base nos resultados, um clone resistente a Erm e Spec de cada linhagem foi escolhido para avaliação dos modelos *in vitro* em co-cultura.

Os clones selecionados resistentes a Erm ou Spec foram analisados quanto ao crescimento *in vitro* em co-cultura. Foram testadas misturas de clones derivados da mesma linhagem e diferentes resistências, sendo um clone resistente à Erm e outro resistente à Spec, provenientes da transformação de um mesmo isolado

representado na Figura 10 pela linha cheia preta. Além disso, foram avaliadas misturas de clones derivados de diferentes linhagens, sendo uma linhagem VT e outra NVT expressando PspAs de famílias diferentes, considerando a importância de avaliar a co-colonização com isolados expressando PspA de família 1 e de família 2. Um clone resistente à Erm e outro resistente à Spec foram utilizados na mistura, representado na Figura 10 pela linha cinza pontilhada. Assim, as misturas escolhidas para crescimento *in vitro* em co-cultura foram estão indicadas na Tabela 4.

Os isolados foram cultivados em 10 mL de meio THY sem antibióticos com inóculo de 10^7 UFC (5×10^6 UFC de cada clone) e o crescimento dos clones foi avaliado da seguinte forma: foram medidos seis pontos de DO a cada hora e a cada aumento de 0,2 na DO_{600nm} , foi registrado o tempo percorrido de cultivo e retiradas alíquotas até que a DO se estabilizasse. Foi realizada diluição seriada das alíquotas, que foi plaqueada em placas de ágar sangue sem antibiótico, com Gent, Erm e Spec para avaliação de crescimento das linhagens.

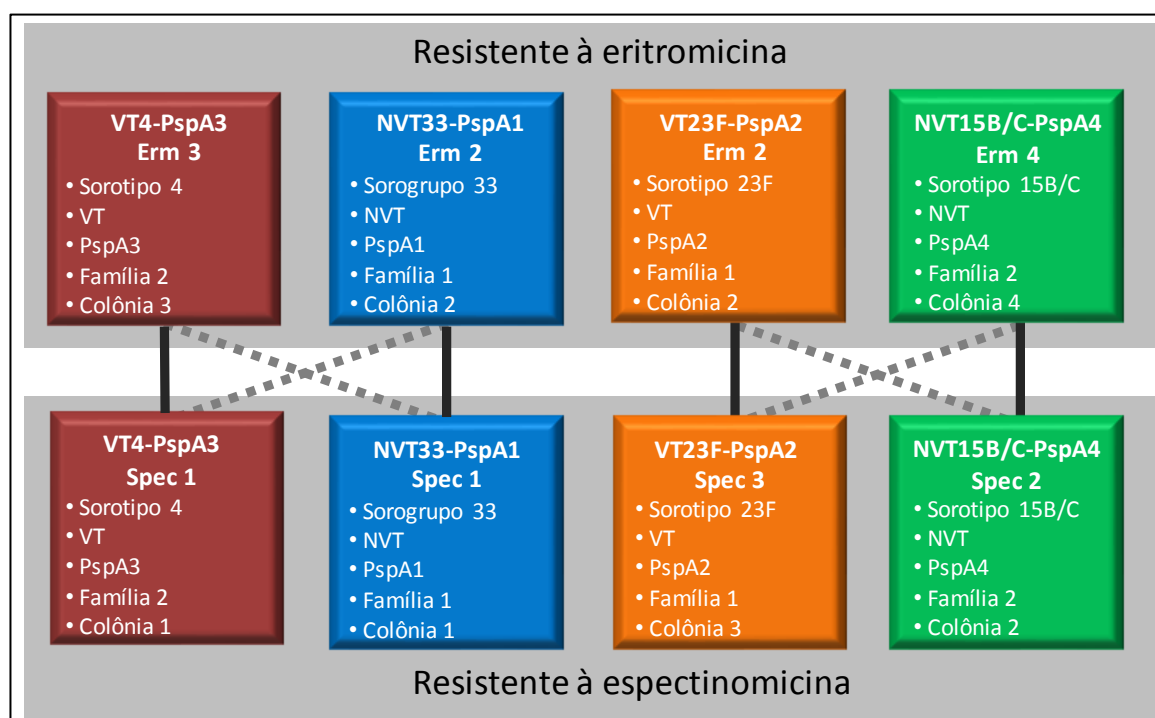


Figura 10. Representação das misturas testadas *in vitro*. Análise de crescimento *in vitro* em co-cultura das misturas. Misturas das mesmas linhagens e diferentes resistências: VT4-PspA3 Erm 3 + VT4-PspA3 Spec 1, NVT33-PspA1 Erm 2 + NVT33-PspA1 Spec 1, VT23F-PspA2 Erm 2 + VT23F-PspA2 Spec 3, NVT15B/C-PspA4 Erm 4 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2, representadas pela linha cheia preta. Misturas das linhagens diferentes e diferentes resistências: VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1, VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2, VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 e VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4, representadas pela linha pontilhada cinza.

Tabela 4. Misturas avaliadas para modelo de co-colonização

Mesma linhagem e diferentes resistências	Diferentes linhagens e diferentes resistências
VT4-PspA3 Erm 3 + VT4-PspA3 Spec 1	VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1
NVT33-PspA1 Erm 2 + NVT33-PspA1 Spec 1	VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2
VT23F-PspA2 Erm 2 + VT23F-PspA2 Spec 3	VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2
NVT15B/C-PspA4 Erm 4 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2	VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4

3.7. Western blot

A expressão de PspA e a reatividade cruzada de anticorpos anti-PspA com as linhagens utilizadas nos modelos de co-colonização foram avaliadas no precipitado celular da cultura dos isolados. Os isolados foram cultivados em meio THY e incubados a 37°C em microaerofilia até DO_{600nm} igual a 0,4. Os cultivos foram centrifugados e os precipitados celulares foram lisados em tampão de lise. O extrato proteico foi quantificado pelo método de Bradford (Protein Assay kit – Bio-Rad) e separado em gel de poli-acrilamida 12% e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12%). A transferência para a membrana de nitrocelulose foi realizada com tampão de transferência pelo sistema semi-seco (Trans-Blot[®] SD semi-dry transfer cell – Bio-Rad) a 10V por 1 hora. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio durante 16 horas, lavada três vezes com PBS-T e incubada com soro anti-PspA (Moreno *et al.*, 2010). A membrana foi lavada novamente três vezes e incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A detecção foi realizada com o kit de quimioluminescência ECL (GE Healthcare).

3.8. Avaliação dos modelos de co-colonização em camundongos

Os procedimentos experimentais utilizando camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob o protocolo 5824140716. Camundongos C57BL/6 SPF fêmeas de 10 semanas foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Grupos de 6 animais foram desafiados com as mesmas misturas de linhagens testadas *in vitro*: mistura de dois clones derivados da mesma linhagem e mistura de dois clones de linhagens diferentes, resistentes a antibióticos diferentes. O desafio foi realizado pela via intranasal com o auxílio de micropipeta nas duas

narinas dos animais previamente anestesiados pela via intraperitoneal com 200 μ L de solução anestésica. Foram inoculados 10 μ l de mistura contendo 5×10^5 UFC de cada linhagem por animal, totalizando em 10^6 UFC de bactérias.

As bactérias foram recuperadas 5 dias após o desafio através de lavagem nasal. Os camundongos foram sacrificados com 300 μ L de solução de eutanásia, posteriormente a traqueia foi seccionada e foram feitas duas lavagens de 200 μ L cada com solução salina pela nasofaringe. Os lavados nasais foram coletados pelas narinas dos animais e plaqueadas em placas de ágar-sangue (Oliveira *et al.*, 2010) com Gent, Erm e Spec, separadamente, para a quantificação das UFCs. A análise estatística foi avaliada pelo teste t pareado, utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

3.9. Expressão e purificação das proteínas PspA1 e 4 recombinantes

Bactérias quimiocompetentes *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS foram transformadas com os vetores pAE-*pspA1* e pAE-*pspA4*, que codificam para proteínas que contém o domínio α -hélice seguidas de um bloco do domínio rico em prolina para PspA1 e duas regiões ricas em prolina separadas por uma região não rica em prolina para PspA4, como representado na Figura 11 (Moreno *et al.*, 2010).

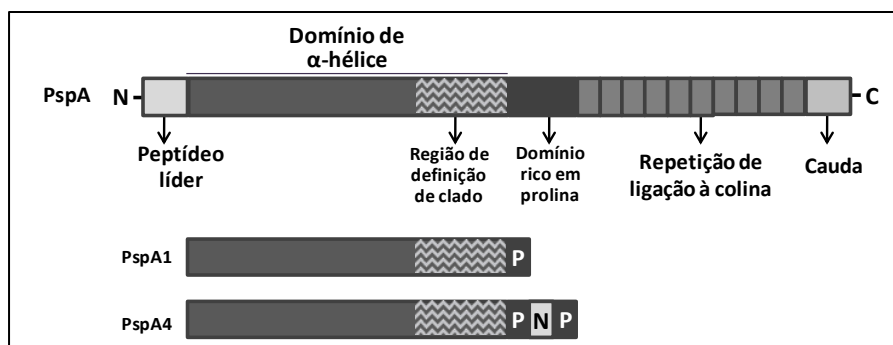


Figura 11. Representação da estrutura dos PspAs recombinantes utilizados na vacina proteica. PspA1 e PspA4 recombinantes apresentam domínio em α -hélice e parte do domínio rico em prolina. PspA1 apresenta um bloco rico em prolina (P) e o PspA4 apresenta um bloco rico em prolina (P), seguido por um bloco não rico em prolina (N), seguido por outro bloco rico em prolina (P).

Posteriormente à transformação com os vetores, foram selecionadas quatro colônias resistentes à ampicilina, que foram cultivadas em LB_{amp} a $37^{\circ}C$ durante 16 horas sob agitação de 200 rpm. Para estoque de cada colônia a $-80^{\circ}C$, foram retirados 500 μ L e adicionado glicerol na concentração final de 25%. Cada um dos

inóculos foi diluído na proporção de 1:40 em 12 mL de LB_{amp} e incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm até DO_{600nm} igual a 0,6-0,7. Foi retirado 1 mL de cada cultivo (alíquota não induzida) e no restante foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM para induzir a expressão. Após 3 horas de indução a 37°C sob agitação de 200 rpm, foi retirado 1 mL (alíquota induzida). Todas as alíquotas foram centrifugadas e as células foram ressuspensas em tampão SDS-PAGE 1X. As amostras foram aquecidas a 96°C por 10 minutos e separadas por SDS-PAGE 12% para análise de expressão de PspA.

Os clones com maiores níveis de expressão foram cultivados em um volume de 300 mL de meio LB_{amp} e induzidos com o mesmo protocolo de indução com IPTG (1mM) por 3 horas. As células foram centrifugadas a 3500 rpm durante 30 minutos, ressuspensas em 50 mL de tampão de equilíbrio e lisadas em homogeneizador de alta pressão Panda (GEA Niro Soavi – 1300bar). As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de nitrocelulose 0,22 µm (Millipore).

A fração solúvel com a proteína foi purificada pelo sistema Akta Prime Plus utilizando coluna His-Trap (GE Healthcare) previamente equilibrada em tampão de equilíbrio (5 mM imidazol). O sobrenadante do lisado bacteriano foi adsorvido à coluna, que foi então lavada com tampão de lavagem (20mM e 40mM de imidazol) e eluída com o tampão de eluição (250 mM de imidazol). Após a purificação por cromatografia, as frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 12% e a amostra de maior concentração e pureza foi dialisada em tampão de diálise para a retirada do imidazol, com a membrana de diálise 7 kDa (Thermo Fisher Scientific). As proteínas foram estocadas a -20°C e quantificadas pelo método de Bradford (Protein Assay kit – Bio-Rad), utilizando curva padrão de BSA.

Para utilização em imunização, as proteínas recombinantes foram tratadas com Triton X-114 para redução da quantidade de lipopolissacarídeo (LPS) contaminante (Aida; Pabst, 1990). Para 1mL de proteína, foram adicionados 20 µL de Triton X-114 (2% v/v). As amostras foram agitadas em vortex e incubadas em gelo por 30 minutos em homogeneizador de tubos tridimensional e posteriormente incubadas a 37°C por 10 minutos. Após a centrifugação a 37°C por 20 minutos a 13200 rpm, a fase superior aquosa foi coletada. Foram realizados 3 ciclos de extração de LPS com Triton X-114.

Após a remoção de LPS, as amostras foram tratadas com *beads* SM-2 (Biorad) para a retirada do Triton X-114 residual (Teodorowicz *et al.*, 2017). Todos os processos foram realizados com materiais apirogênicos. Em 4 mL de PBS 1X, foram adicionados *beads* SM-2 na proporção de 1:20, seguindo-se cinco vezes de agitação por inversão. Com o tubo na vertical, as *beads* foram decantadas, o PBS foi descartado e 2 mL da amostra com proteína foram adicionados. Após incubação por 8 horas no gelo em homogeneizador de tubos tridimensional, as *beads* foram novamente decantadas e o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C.

3.10. Imunização e desafio de co-colonização dos camundongos

Camundongos C57BL/6 SPF fêmeas de 5 a 7 semanas foram utilizados nos ensaios de imunização e desafios.

3.10.1. Imunização

Grupos de 6 ou 8 camundongos foram imunizados via nasal com três doses das formulações com um intervalo de duas semanas (Figura 12). Para a imunização com a vacina proteica, foram utilizados 2 µg de cada proteína, PspA1 e PspA4, e o adjuvante vacina celular pertussis (wP, produzida pelo Instituto Butantan) na dose de 1/16 da dose humana. Cada dose foi composta, portanto, por 4 µg de proteína recombinante despirogenizada e wP em volume final de 10 µL. O uso da wP como adjuvante nasal de PspA foi descrito em nosso laboratório (Lima *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2010). A dose utilizada em testes de eficácia em camundongos da vacina pertussis produzida pelo Instituto Butantan equivale a 1/8 da dose aplicada para humanos. A dose de wP foi testada no nosso laboratório em camundongos e a dose de 1/16 mostrou-se adequada como adjuvante para PspA, com menor efeito não específico comparado à dose de 1/8. Um grupo de camundongos foi imunizado com 3 doses de 1/20 da dose humana da vacina PCV13 (Pfizer) por via subcutânea e outro grupo foi imunizado com 3 doses de PspA1+PspA4+wP por via nasal e com PCV13 por via subcutânea – (PspA1+PspA4+wP)+PCV13. Além disso, foram imunizados grupos controle com salina ou apenas com o adjuvante wP. Os camundongos que receberam imunização nasal foram anestesiados com 200 µL de solução anestésica via intraperitoneal e foram inoculados 10 µL de cada formulação via nasal com o auxílio de micropipeta.

3.10.2. Soro

Amostras de sangue foram coletadas por punção retro orbital após a segunda e terceira imunizações (Figura 12), incubadas por 30 minutos a 37°C e em seguida por 16 horas a 4°C. As amostras foram então centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C e o soro foi coletado e armazenado a -20°C.

3.10.3. Lavado Vaginal

O lavado vaginal foi coletado duas semanas após a última imunização, por cinco dias seguidos (Figura 12) com auxílio de micropipeta. Em cada dia, foram realizados dois lavados vaginais seguidos com 25 µL cada de solução salina apirogênica, totalizando em 50 µL por dia de cada camundongo, que foram armazenados a -20°C. No quinto dia, as amostras do mesmo animal foram reunidas e centrifugadas a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

3.10.4. Desafio

Uma semana após a segunda sangria, os animais foram desafiados (Figura 12) com a mistura dos modelos de co-colonização. Para o desafio, os camundongos receberam 200 µL de solução anestésica via intraperitoneal e foram inoculados 10 µL da mistura de bactérias contendo 5×10^5 UFC de cada linhagem por animal, totalizando em 10^6 UFC de bactérias, via intranasal com o auxílio de micropipeta. Após 5 dias, os animais foram eutanasiados e a carga bacteriana avaliada conforme descrito no item 3.8. As diferenças entre os grupos da carga bacteriana de cada isolado foram analisadas pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de multicomparações de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism 5*. As diferenças entre a carga bacteriana de isolados resistentes a Erm e Spec na mesma amostra foram analisadas pelo teste t pareado, utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

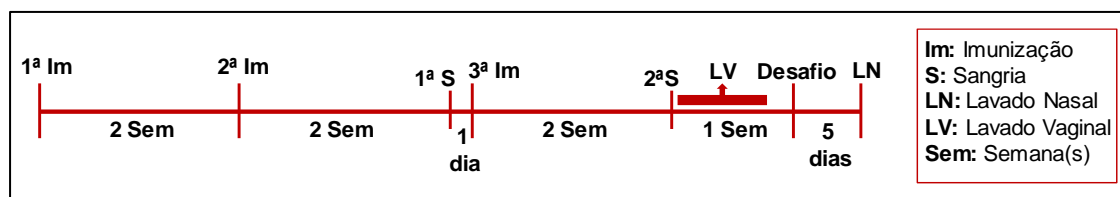


Figura 12. Esquema de imunização, sangria, lavado vaginal, desafio e lavado nasal realizados nos camundongos. Foram realizadas três imunizações com intervalo de duas semanas. As sangrias foram realizadas duas semanas após a segunda e terceira imunizações. O lavado vaginal foi realizado duas semanas após a terceira imunização, por 5 dias consecutivos. Uma semana após a segunda sangria, foi realizado o desafio e 5 dias depois, o lavado nasal para recuperação das bactérias.

3.11. Avaliação da indução de anticorpos contra PspA por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Foram incubadas placas de 96 poços de fundo plano (*High binding*, Costar®) com solução de proteínas recombinantes (1 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato a 4°C por 16 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T, bloqueadas com solução de bloqueio (PBS-T/BSA) a 37°C por 30 minutos e lavadas novamente três vezes. As amostras de soro ou lavado vaginal foram adicionadas, foram realizadas diluições seriadas com PBS-T/BSA e a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Após mais três lavagens nos poços, foi adicionado anticorpo anti-IgG ou anti-IgA de camundongo produzido em cabra conjugado à peroxidase (HRP) (Sigma®) diluído em PBS-T/BSA na proporção de 1:5000. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas novamente três vezes com PBS-T. Os anticorpos foram detectados pela adição do substrato OPD, as reações foram interrompidas com solução de ácido sulfúrico 4 M e a absorbância detectada a 492 nm (A_{492nm}) em leitor de ELISA (Labsystems). O título de anticorpo para as amostras de soro foi definido como o inverso da maior diluição com absorbância $\geq 0,1$. Para as amostras de lavado vaginal foram consideradas as absorbâncias na diluição 1:2 para análise de IgG e da amostra sem diluição para IgA. A análise estatística das diferenças dos títulos de anticorpos e A_{492nm} entre os grupos foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de multicomparações de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

3.12. Avaliação da indução de anticorpos contra polissacarídeo por ELISA

Os PS 4, 33F, 23F, 15B e 22F (American Type Culture Collection – ATCC) foram reconstituídos com água milli-Q estéril para a concentração final de 1 mg/mL, incubados em gelo por 8 horas em homogeneizador de tubos tridimensional, aliquotados e estocados a -80°C.

Placa de 96 poços de fundo plano (*Medium binding*, Costar®) foi incubada com solução de polissacarídeos 10 µg/mL em tampão para *coating* (1X PBS) a 37°C por 5 horas e posteriormente a 4°C por 16 horas. Depois da incubação, a placa foi lavada com solução de lavagem cinco vezes. Em outra placa de 96 poços de fundo “U” (Greiner Bio-One) foram adicionados solução tampão de anticorpo, PS 22F (5 µg/mL) e as amostras de soro na proporção de 1:20. Foi realizada diluição seriada e posteriormente a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação, as diluições foram transferidas para a placa de fundo plano para ELISA que havia sido incubada (*coating*) com PS. A incubação com PS 22F visa à diminuição de ligação inespecífica do soro com contaminantes derivados de pneumococo presentes na solução de PS utilizada no *coating* e presentes também na solução de PS 22F.

A placa de fundo plano já com as diluições foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente lavada cinco vezes com tampão de lavagem. O anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado à peroxidase (HRP) (Sigma®) foi adicionado à placa em tampão de anticorpo em diluição 1:5000. A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente e novamente lavada cinco vezes com tampão de lavagem. Os anticorpos foram detectados e titulados da mesma maneira utilizada no ELISA para a avaliação da indução de anticorpos contra PspA no soro dos camundongos. A análise estatística das diferenças dos títulos de anticorpos entre os grupos foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de multicomparações de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

3.13. Ensaio de ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície da bactéria por citometria de fluxo

O estoque das linhagens de *S. pneumoniae* utilizado para desafios dos camundongos foi descongelado e 100 µL foram inoculados em 10 mL de meio THY. As bactérias foram cultivadas até DO_{600nm} igual a 0,4-0,5 ($\sim 10^8$ UFC/mL). Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 3200 rpm durante 10 minutos, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 10 mL de PBS. Alíquotas de 100 µL de cada uma das bactérias foram incubadas com 1% do *pool* de soro durante 30 minutos a 37°C e lavadas mais duas vezes com PBS. Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC foi adicionado na proporção de 1:100 (Sigma) por 30 minutos em gelo na ausência de luz. Após duas novas lavagens, as amostras foram fixadas com o reagente BD Cytifix™ e analisadas por citometria de fluxo com auxílio do aparelho FACSCantoll (BD Biosciences). No equipamento, foram contados 15.000 eventos e os dados foram analisados pelo programa FlowJo V10. A mediana da intensidade da fluorescência do total de bactérias foi utilizada para comparação entre os grupos.

3.14. Avaliação da aglutinação de bactérias e anticorpos do soro

Para o ensaio de aglutinação, o estoque das linhagens do desafio de *S. pneumoniae*, DO_{600nm} igual a 0,4-0,5 ($\sim 10^8$ UFC/mL), foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos e ressuspensado em PBS na concentração final de 5×10^7 UFC/mL. No volume final de 50 µL, as bactérias foram incubadas com 20% do *pool* de soro da segunda sangria de cada grupo de imunização na concentração de 2×10^6 UFC/mL, a 37°C durante 90 minutos, sem agitação. As amostras foram fixadas com 100 µL de BD Cytifix™ e incubadas a 37°C com agitação de 80 rpm por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de PBS e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo com auxílio do aparelho FACSCantoll (BD Biosciences). No equipamento, foram contados 15.000 eventos e os dados foram analisados pelo programa FlowJo V10. A complexidade (SSC-A) e o tamanho (FSC-A) das bactérias foram utilizados para a comparação entre os grupos. Os eventos foram separados em quatro quadrantes (Q) e a porcentagem de aglutinação foi calculada pela soma dos eventos em Q1, Q2 e Q3 (Habets *et al.*, 2017; Mitsi *et al.*, 2017).

3.15. Quantificação de citocinas e quimiocinas por LUMINEX

Para a quantificação de citocinas e quimiocinas no lavado nasal, foi utilizado kit Luminex MCYTOMAG-70K-10 (Merck Millipore) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de lavado nasal coletadas cinco dias após o desafio foram descongeladas em gelo, centrifugadas a 13200 rpm por 30 minutos e posteriormente foram adicionados 50 μ L de amostra nos respectivos poços. Em todos os poços da placa, foram adicionados 25 μ L da solução que contém *beads* conjugadas a anticorpos anti-citocinas e quimiocinas (IFN- γ , TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 17 (IL-17), CXCL1, CXCL2 e CCL2). Além disso, curvas de padrão de citocinas e quimiocinas e controles máximos e mínimos com concentrações conhecidas também foram misturados às *beads* paralelamente. Posteriormente, a placa foi incubada com agitação por 18 horas à temperatura de 4°C.

Na lavagem da placa, foi utilizada a lavadora magnética manual para a fixação das *beads* no fundo dos poços. A placa foi lavada duas vezes e foram adicionados 25 μ L por poço dos anticorpos de detecção conjugados à biotina. Após incubação da placa em agitação por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 25 μ L por poço de Estreptavidina-Ficoeritrina e a placa foi incubada novamente por 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. A placa foi lavada novamente duas vezes com tampão de lavagem com o auxílio da lavadora magnética manual. Após a lavagem, foram adicionados 150 μ L por poço de *Drive Fluid* (fluido do equipamento) e a placa foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente com agitação. A leitura foi realizada em leitor Magpix (Merck Millipore) e os resultados foram obtidos em concentração de citocinas com base nas curvas padrão obtidas no experimento. As diferenças das concentrações de citocinas e quimiocinas entre os grupos foram avaliadas pelo teste *One-way ANOVA* seguido do teste de multicomparações de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

4. RESULTADOS

4.1. Construção dos cassetes de resistência a Erm e Spec

Para a construção dos cassetes de resistência, os fragmentos foram amplificados a partir dos plasmídeos pE693 e pE729 utilizando os *primers* Erm F Bam HI / Erm R XhoI e Spec F Bam HI / Spec R XhoI. O gene *iga* foi amplificado do genoma da linhagem TIGR4 com os primers Iga 250F e Iga 2750R. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Figura 13) e foram observados os fragmentos esperados de 2500, 992 e 1143 bp para *iga*, *erm* e *spec* respectivamente. As bandas foram excisadas e purificadas.

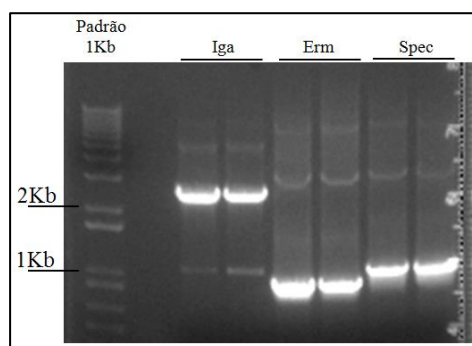


Figura 13. Gel de eletroforese da amplificação por PCR de *iga*, *erm* e *spec*. As amostras foram submetidas à reação de PCR para amplificação dos fragmentos *iga*, *erm* e *spec* e separadas em gel de agarose. Padrão 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Posteriormente, os fragmentos purificados de *iga*, *erm* e *spec* foram submetidos à reação de ligação com o vetor pGEM-TEasy, resultando em pGEM Iga, pGEM Erm e pGEM Spec. Os plasmídeos foram utilizados na transformação de bactérias eletrocompetentes. Para a confirmação da presença do plasmídeo nos clones transformados, foi realizada eletroforese em gel de agarose com alíquotas da purificação de DNA dos clones selecionados em meio contendo ampicilina. O DNA plasmidial dos clones de 1 a 7 e do clone 9 resultantes da transformação com a ligação para obtenção de pGEM Iga (Figura 14) apresentaram tamanho maior do que o controle negativo utilizado (pGEM-TEasy vazio), indicando que estes clones possivelmente apresentavam inserção do gene *iga* em pGEM-TEasy. O DNA plasmidial de colônias recuperadas após transformação para obtenção de pGEM Erm e pGEM Spec também foi analisado em gel de agarose (Figura 15). Foi observado que o tamanho do DNA de todas as colônias era maior do que pGEM-

TEasy vazio, indicando a possível presença dos cassetes de resistência a Erm ou Spec inseridos em pGEM-TEasy. Além disso, foi realizada confirmação por sequenciamento com os *primers* M13F e M13R e foi possível confirmar a inserção dos genes sem nenhuma mutação.

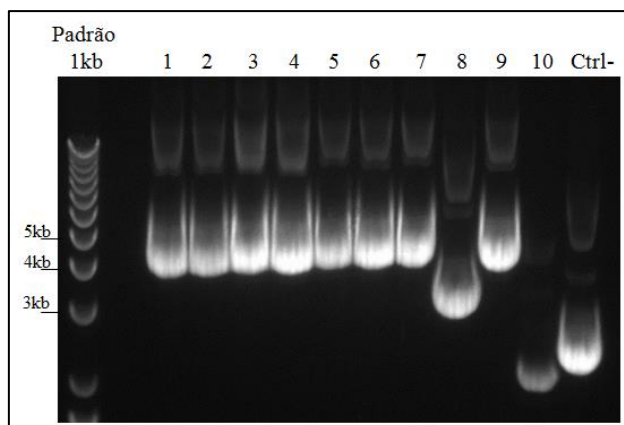


Figura 14. Gel de agarose das minipreps de pGEM Iga. O DNA das colônias numeradas de 1 a 10 resultantes da transformação com pGEM TE + iga foi submetido à eletroforese em gel de agarose. O DNA plasmidial de uma colônia transformada com o vetor vazio foi purificado e utilizado como controle negativo (Ctrl-). Padrão 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

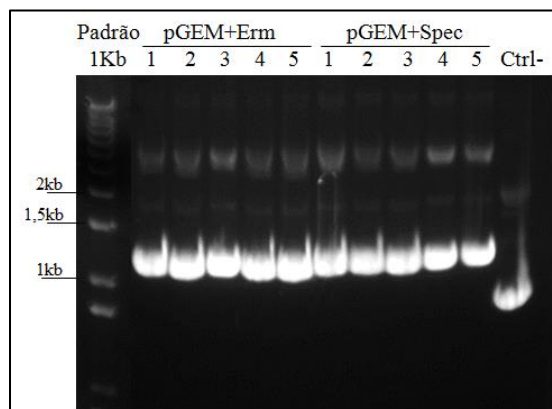


Figura 15. Gel de agarose das minipreps de pGEM Erm e pGEM Spec. O DNA das colônias numeradas de 1 a 5 resultantes da transformação com pGEM TE + erm ou pGEM TE + spec foi submetido à eletroforese em gel de agarose. O DNA plasmidial de uma colônia transformada com o vetor vazio foi purificado e utilizado como controle negativo (Ctrl-). Padrão 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

O plasmídeo pGEM Iga foi submetido a PCR com os *primers* Iga 1250R Bam HI e Iga 1750F Xho I para a exclusão do segmento 1250-1750 e inclusão dos sítios de restrição das enzimas *Bam* HI e *Xho* I, resultando na amplificação de um fragmento contendo a região 1750-2750 bp de *iga*, seguido do plasmídeo pGEM T-

Easy e depois pela região 250-1250 bp de *iga*. A amostra resultante da reação de PCR foi separada em gel de agarose e o fragmento amplificado foi purificado. Em seguida, os segmentos 1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250, pGEM Erm e pGEM Spec foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I, para criar as pontas coesivas necessárias para a ligação, separados em gel de agarose e purificados (Figura 16). A digestão de 1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250 com *Bam* HI e *Xho* I apresentaria pontas coesivas resultando em um segmento de 5146 bp. A digestão de pGEM Erm e pGEM Spec resultaria em dois segmentos, um com 3030 bp (vetor) e outro de 979 ou 1130 bp, respectivamente.

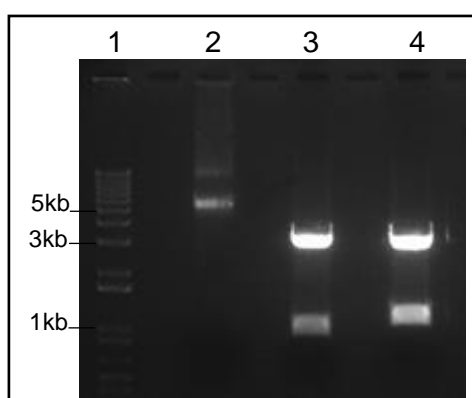


Figura 16. Análise de restrição de 1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250, pGEM Erm e pGEM Spec. Eletroforese em gel de agarose do segmento 1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250 e dos plasmídeos pGEM Erm e pGEM Spec digeridos com *Bam* HI e *Xho* I. 1- 1Kb Plus DNA Ladder; 2- 1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250 digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 3- pGEM Erm digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 4 -pGEM Spec digerido com *Bam* HI e *Xho* I.

A reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase foi realizada com os segmentos 1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250 *Bam* HI / *Xho* I e *erm* *Bam* HI / *Xho* I e com os segmentos 1750-2750/pGEM T-Easy /250-1250 *Bam* HI / *Xho* I e *spec* *Bam* HI / *Xho* I, resultando nos plasmídeos pGEM Iga Erm e pGEM Iga Spec. Um clone positivo de cada construção foi avaliado por análise de restrição para confirmação da inserção dos fragmentos em pGEM-TEasy. O plasmídeo pGEM Iga apresentaria três sítios de restrição de *Eco* RI e os tamanhos esperados da digestão são 2997 (vetor), 1643 e 1000 bp. A digestão de pGEM Iga Clone 1 com *Eco* RI apresentou o padrão de banda esperado com três fragmentos (Figura 17). O DNA das colônias transformadas com os plasmídeos pGEM Iga Erm e pGEM Iga Spec digeridos com *Bam* HI e *Xho* I apresentariam dois fragmentos, com 5146 bp (1750-2750/pGEM T-Easy/250-1250 *Bam* HI / *Xho* I) e *erm* com 979 ou *spec* com 1130 bp.

Como esperado, foram observadas bandas de aproximadamente 5000 e 1000 bp (Figura 17). Os resultados dessas reações indicam a inserção correta dos genes *erm* e *spec* dentro de *iga* no vetor pGEM-TEasy.

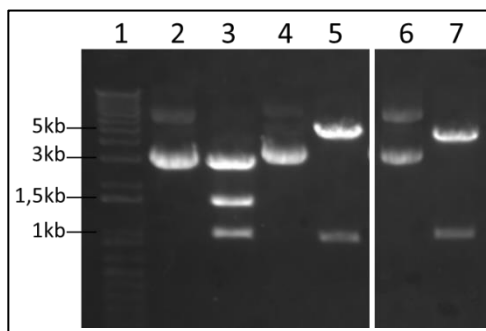


Figura 17. Análise de restrição dos plasmídeos pGEM Iga, pGEM Iga Erm e pGEM Iga Spec. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos pGEM Iga digerido com *Eco* RI e pGEM Iga Erm e pGEM Iga Spec digeridos com *Bam* HI e *Xho* I. 1- 1Kb Plus DNA Ladder; 2- Clone 1 pGEM Iga; 3- Clone 1 pGEM-iga digerido com *Eco* RI; 4 – Clone 1 pGEM Erm; 5 – Clone 1 pGEM Erm digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 6 – Clone 1 pGEM Spec; 7 – Clone 1 pGEM Spec digerido com *Bam* HI e *Xho* I.

Além disso, o DNA plasmidial de colônias recuperadas foi submetido à análise por PCR para confirmar a inserção de *erm* e *spec* dentro de *iga*. Foi realizado PCR com os *primers* Erm F *Bam* HI e Iga 2750R e (Figura 18-A), Iga 250F e Erm R *Xho* I (Figura 18-B), Spec F *Bam* HI e Iga 2750R (Figura 18-C) e Iga 250F e Spec R *Xho* I (Figura 18-D). Nessa análise foi possível observar que não houve amplificação de fragmentos utilizando pGEM-Iga como molde, já que um dos *primers* utilizados se liga à região que codifica resistência a Erm ou Spec. Já utilizando os vetores pGEM Iga Erm e pGEM Iga Spec como molde, foram amplificados fragmentos com os tamanhos esperados, confirmando a inserção dos genes que codificam resistência a *erm* e *spec* dentro de *iga*.

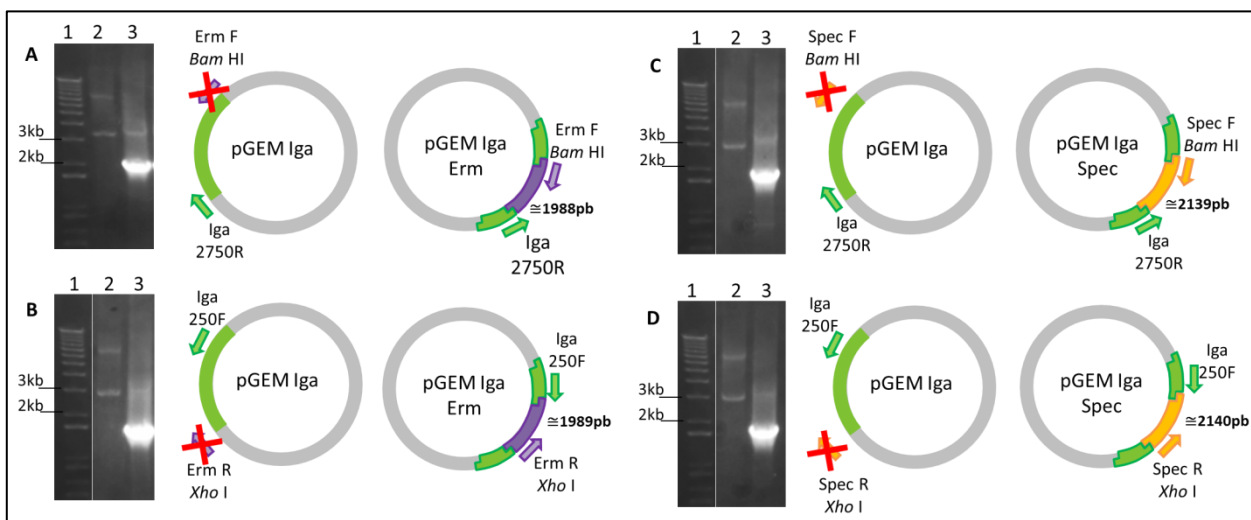


Figura 18. Confirmação da inserção dos genes *erm* e *spec* dentro de *iga* por PCR. A inserção de *erm* e *spec* dentro de *iga* foi confirmada por PCR com os primers Erm F *Bam* HI e Iga 2750R e (A), Iga 250F e Erm R *Xho* I (B), Spec F *Bam* HI e Iga 2750R (C) e Iga 250F e Spec R *Xho* I (D). 1- 1Kb Plus DNA Ladder, 2- PCR com pGEM Iga e 3- PCR com pGEM Iga Erm ou pGEM Iga Spec.

4.2. Transformação das linhagens de *Streptococcus pneumoniae*

As linhagens VT4-PspA3, NVT33-PspA1, VT23F-PspA2 e NVT15B/C-PspA4 foram transformadas com os plasmídeos construídos. As colônias foram selecionadas com os respectivos antibióticos e o DNA genômico de diferentes clones foi avaliado por PCR para confirmar a inserção do cassete. Os isolados não transformados foram utilizados como controle negativo (Figuras 19 e 20). Foram utilizados os pares de *primers* Iga 250F + Iga 2750R para todas as linhagens. Além disso, para as linhagens transformadas com pGEM Iga Erm foram utilizados os conjuntos de *primers* Iga 250F / Erm R *Xho* I e Erm F *Bam* HI / Iga 2750R (Figura 19) e para as linhagens transformadas com pGEM Iga Spec foram utilizados Iga 250F / Spec R *Xho* I e Spec F *Bam* HI / Iga 2750R (Figura 20). Foi possível observar bandas com tamanhos esperados em algumas das colônias selecionadas (pGEM Iga Erm – 3110 bp para Iga 250F/Iga 2750R, 1985 bp para Iga 250F/Erm R *Xho*I, 2110 bp para Erm F *Bam* HI/Iga 2750R e pGEM Iga Spec -3260 bp para Iga 250F/Iga 2750R, 2135 bp para Iga 250F/Spec R *Xho*I, 2260 bp para Spec F *Bam* HI/Iga 2750R). Não foi possível observar amplificação de banda das colônias negativas para a transformação quando foram utilizados *primers* específicos para *erm* ou *spec*, como esperado. A PCR com Iga 250F/Iga 2750R deveria ter resultado em amplificação mesmo nas colônias negativas, mas foi observada amplificação de

fragmento apenas para VT4-PspA3. É possível que não haja pareamento adequado entre os *primers* e *iga* de algumas linhagens, já que existe certa variabilidade no gene.

Foram observadas bandas de tamanho correto para as 3 PCRs para os clones 2 e 3 de VT4-PspA3 Erm, clones 2 e 4 de NVT33-PspA1 Erm, e clones 3 e 4 de NVT15B/C-PspA4 Erm. As linhagens VT23F-PspA2 transformadas com pGEM Iga Erm não apresentaram amplificação de tamanho esperado com Iga 250F/Iga 2750R, sendo que o clone 2 apresentou banda de tamanho próximo ao esperado com os *primers* Erm F Bam HI/Iga 2750R, e o clone 3 apresentou bandas próximas ao esperado para Iga 250F/Erm R XhoI e para Erm F Bam HI/Iga 2750R. O fragmento amplificado com Erm F Bam HI/Iga 2750R parece ser um pouco menor que o esperado, o que pode indicar perda de alguma parte do gene *iga*. No entanto, a perda de uma parte de *iga* não deve impactar no fenótipo do clone, já que o gene foi nocauteado pela entrada do cassete de resistência.

Foram observadas bandas de tamanho correto para as 3 PCRs de todos os clones de VT4-PspA3 Spec (clones 1 a 6), clones 1 e 3 de NVT33-PspA1 Spec e clone 2 de NVT15B/C-PspA4 Spec. Novamente, na linhagem VT23F-PspA2 transformada com pGEM Iga Spec, não houve amplificação de banda com tamanho esperado com Iga 250F/Iga 2750R ou Iga 250F/Spec R XhoI. Banda de tamanho esperado foi observada para amplificação com Spec F Bam HI/Iga 2750R nos clones 1, 2 e 3. Novamente, é possível que haja alguma perda de parte de *iga*, o que não impactaria no fenótipo dos clones selecionados. As colônias indicadas em vermelho, azul, verde e laranja nas Figuras 19 e 20 foram selecionadas para o próximo experimento.

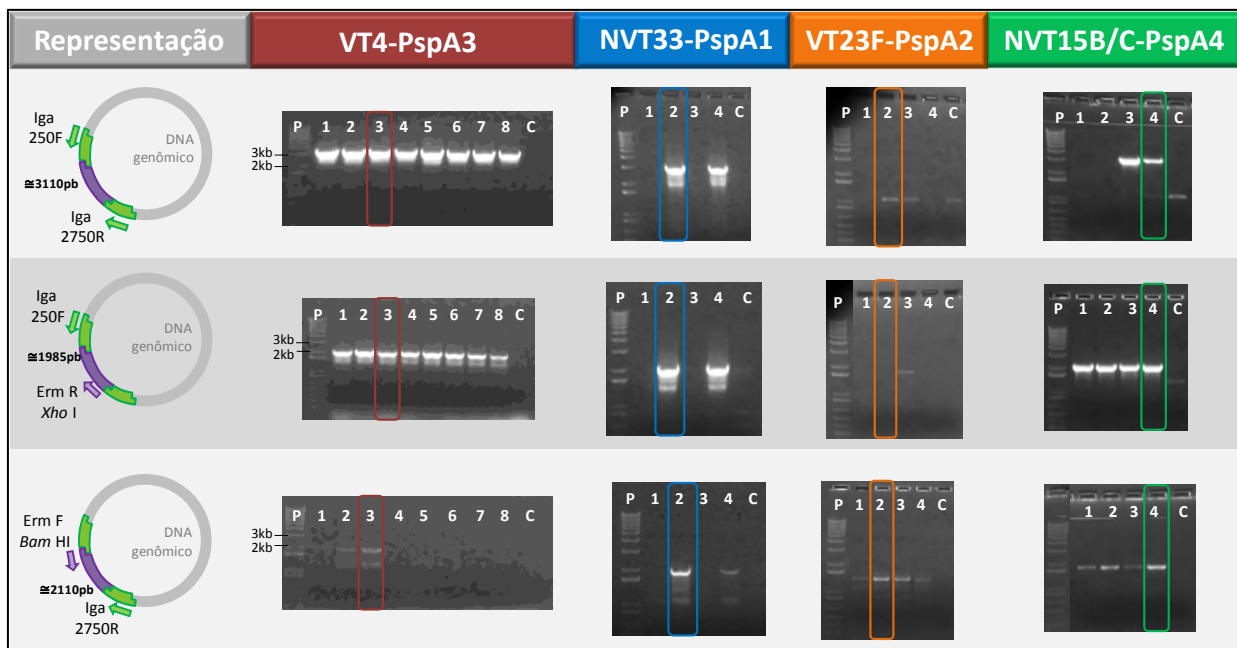


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose da PCR dos clones de pneumococo resultantes da transformação com DNA que codifica resistência à Erm. Oito colônias de VT4-PspA3 e 4 colônias das demais linhagens foram selecionadas para confirmação de inserção do cassete de resistência em *iga*. Como controle negativo foram utilizadas as linhagens não transformadas. P- 1Kb Plus DNA Ladder, C- Controle negativo. Ao lado esquerdo da imagem estão a representação dos pares de *primers* utilizados para a PCR e o tamanho esperado da amplificação. Os clones selecionados para os próximos experimentos estão marcados em vermelho, azul, verde e laranja na imagem dos géis.

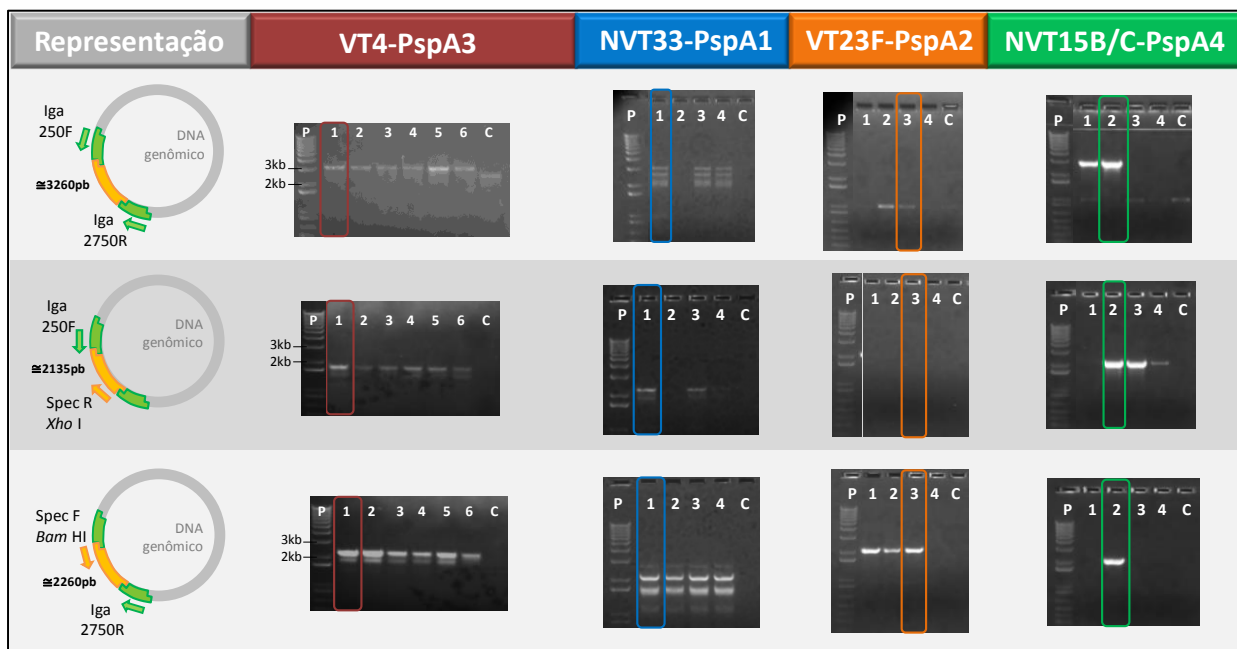


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose da PCR dos clones de pneumococo resultantes da transformação com DNA que codifica resistência à Spec. Seis colônias de VT4-PspA3 e 4 colônias das demais linhagens foram selecionadas para confirmação da inserção do cassete de resistência em *iga*. Como controle negativo foram utilizadas as linhagens não transformadas. P- 1Kb Plus DNA Ladder, C- Controle negativo. Ao lado esquerdo da imagem estão a representação dos pares de *primers* utilizados para a PCR e o tamanho esperado da amplificação. Os clones selecionados para os próximos experimentos estão marcados em vermelho, azul, verde e laranja na imagem dos géis.

4.3. Modelos *in vitro* em co-cultura

O estoque dos clones selecionados foram quantificado e avaliados quanto à estabilidade do plasmídeo para a resistência à Erm ou Spec em placas de ágar sangue contendo Gent, Erm ou Spec. Foi escolhido um clone resistente a Erm e outro a Spec de cada linhagem para a avaliação em co-cultura, sendo eles (nomenclatura da linhagem, resistência, número do clone):

- VT4-PspA3 Erm 3
- VT4-PspA3 Spec 1
- NVT33-PspA1 Erm 2
- NVT33-PspA1 Spec 1
- VT23F-PspA2 Erm 2
- VT23F-PspA2 Spec 3
- NVT15B/C-PspA4 Erm 4
- NVT15B/C-PspA4 Spec 2

Os co-cultivos com os clones selecionados foram acompanhados para determinação de DO_{600nm} e UFC/mL. Nas misturas com as mesmas linhagens resistentes a diferentes antibióticos, as linhagens VT23F-PspA2 e NVT33-PspA1 apresentaram um crescimento similar nos co-cultivos, atingindo a fase estacionária após cerca de quatro horas em $DO_{600nm}=1,0$ (Figura 21-B e C). Já os co-cultivos das linhagens VT4-PspA3 e NVT15B/C-PspA4 atingiram a fase estacionária em uma DO_{600nm} mais baixa, por volta de 0,8 (Figura 21-A e D).

Amostras dos co-cultivos foram plaqueados em placas de ágar-sangue contendo Gent, Erm ou Spec. Todos os pneumococos crescem em Gent, enquanto as placas contendo Erm e Spec permitem a identificação diferencial dos clones. Todas as linhagens mostraram crescimento semelhante do clone Erm e Spec (Figura 22). As linhagens VT4-PspA3, NVT33-PspA1 e VT23F-PspA2 atingiram concentrações bacterianas por volta de 10^8 UFC/mL (Figura 22-A-C), enquanto a linhagem NVT15B/C-PspA4 atingiu concentrações um pouco abaixo de 10^8 UFC/mL (Figura 22-D).

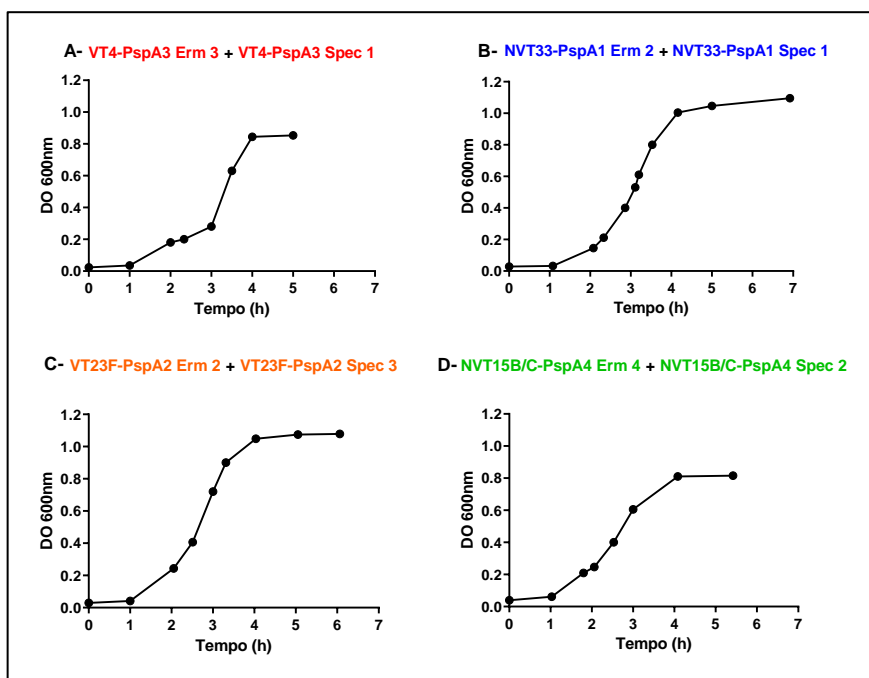


Figura 21. Curva de crescimento de dois clones da mesma linhagem com diferentes resistências a antibióticos. Foi determinada a DO_{600nm} em diferentes tempos de co-cultivo em meio THY de dois clones derivados da mesma linhagem de pneumococo e resistentes a diferentes antibióticos: VT4-PspA3 Erm 3 + VT4-PspA3 Spec 1 (A), NVT33-PspA1 Erm 2 + NVT33-PspA1 Spec 1 (B), VT23F-PspA2 Erm 2 + VT23F-PspA2 Spec 3 (C) e NVT15B/C-PspA4 Erm 4 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (D).

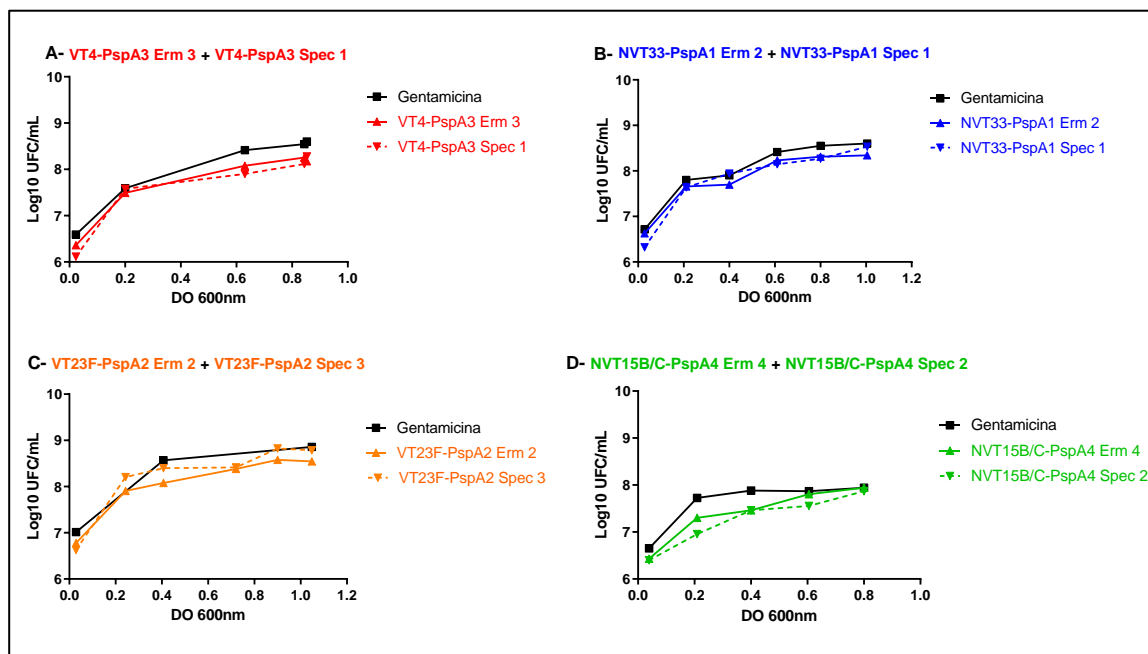


Figura 22. Determinação da concentração bacteriana em co-cultivo de dois clones da mesma linhagem com diferentes resistências a antibióticos. A concentração bacteriana foi determinada em diferentes DOs dos co-cultivos em meio THY de dois clones derivados da mesma linhagem de pneumococo e resistentes a diferentes antibióticos: VT4-PspA3 Erm 3 + VT4-PspA3 Spec 1 (A), NVT33-PspA1 Erm 2 + NVT33-PspA1 Spec 1 (B), VT23F-PspA2 Erm 2 + VT23F-PspA2 Spec 3 (C) e NVT15B/C-PspA4 Erm 4 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (D).

Foram então realizados co-cultivos contendo uma linhagem vacinal (VT) e outra não-vacinal (NVT) com resistência a diferentes antibióticos e expressando PspAs de famílias diferentes. As seguintes misturas foram cultivadas em THY sem antibióticos:

- VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1
- VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2
- VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2
- VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4

As quatro misturas testadas apresentaram curvas de crescimento semelhantes com a fase estacionária após aproximadamente quatro horas de cultivo, com a mistura VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1 atingido DO_{600nm} igual a 1,0 e as demais misturas atingindo DO_{600nm} por volta de 0,9 (Figura 23). As misturas com VT4-PspA3 e NVT33-PspA1 mostraram concentrações bacterianas similares das duas linhagens (Figura 24-A e B), enquanto as misturas de VT23F-PspA2 e NVT15B/C-PspA4 resultaram em menores concentrações de NVT15B/C-PspA4 (Figura 24-C e D). Esses dados estão de acordo com os dados mostrados nas Figuras 21 e 22, com a linhagem NVT15B/C-PspA4 atingindo a fase estacionária em uma DO mais baixa e com menor concentração bacteriana.

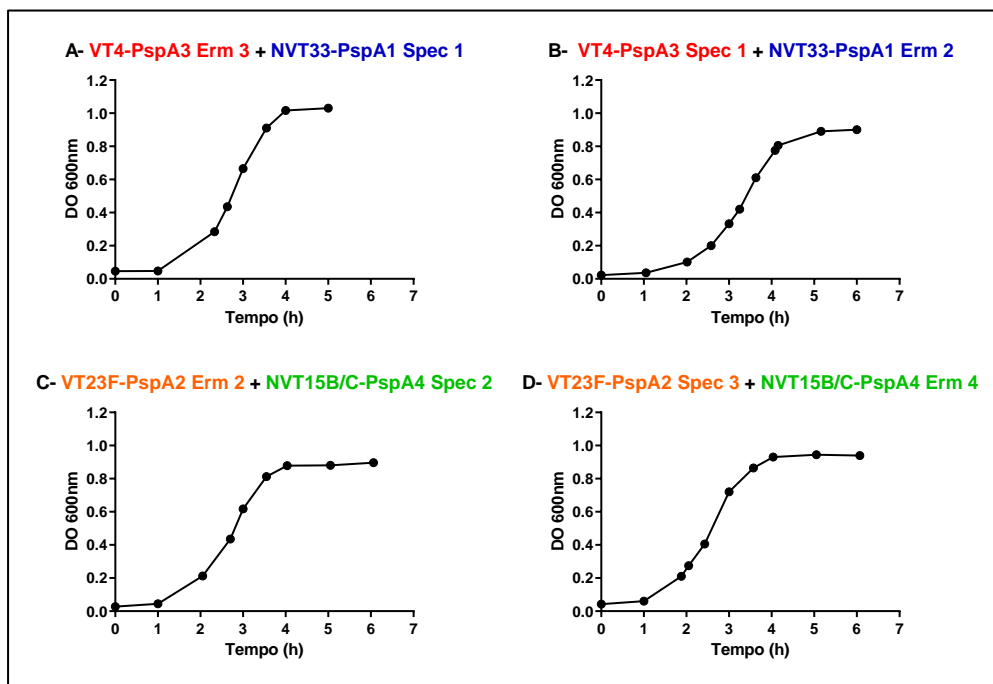


Figura 23. Curva de crescimento de dois clones de linhagens e resistências diferentes. Foi determinada a DO_{600nm} em diferentes tempos de co-cultivo em meio THY de dois clones derivados de diferentes linhagens de pneumococo e resistentes a diferentes antibióticos: VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1 (A), VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 (B), VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (C), VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4 (D).

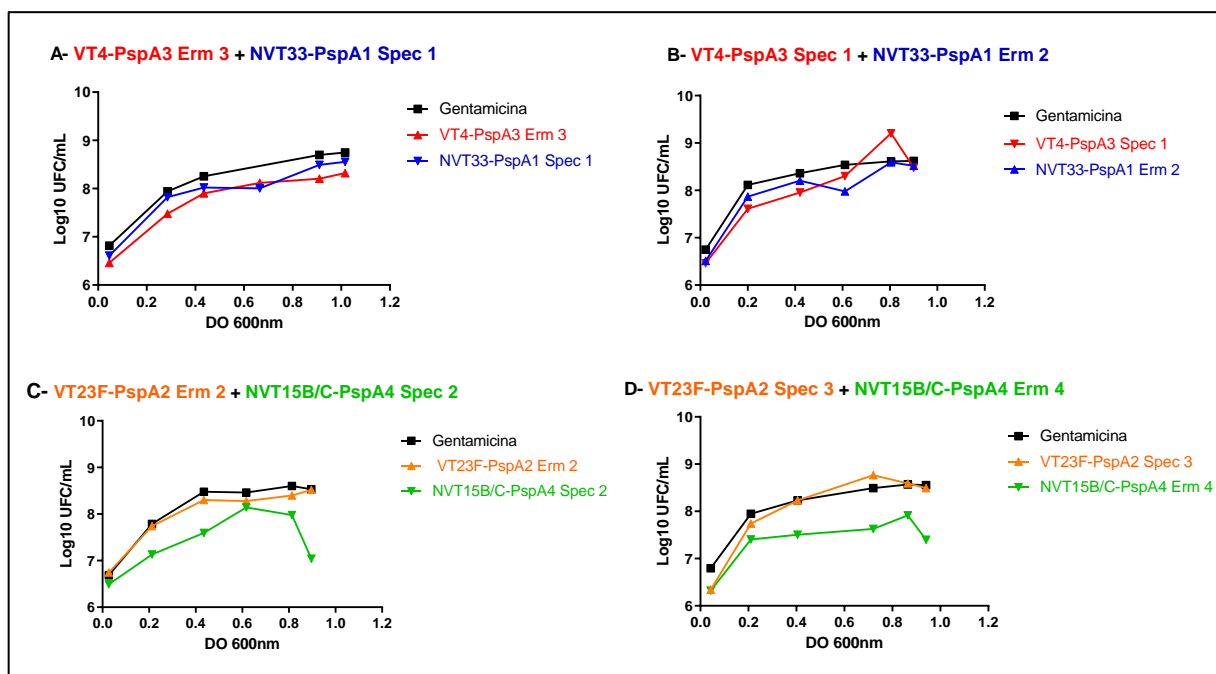


Figura 24. Determinação da concentração bacteriana em co-cultivo de crescimento de dois clones de linhagens e resistências diferentes. A concentração bacteriana foi determinada em diferentes DOs dos co-cultivos em meio THY de dois clones derivados de diferentes linhagens de pneumococo e resistentes a diferentes antibióticos: VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1 (A), VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 (B), VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (C), VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4 (D).

4.4. *Western blot* com anticorpos anti-PspA

Os clones selecionados das linhagens de pneumococo transformadas foram utilizados para a avaliação da expressão de PspA e reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspA com as diferentes PspAs das linhagens. Foi realizado *western blot* com soro anti-PspA1 (1:5000) para as linhagens NVT33-PspA1 e VT23F-PspA2 não transformadas e transformadas com os cassetes de resistência para Erm e Spec. Como controle positivo foi utilizada a linhagem D39 (PspA2) e como controle negativo foi utilizada a linhagem D39 nocauteada para PspA (D39- Δ PspA) (Figura 25-A). Foi observado que o controle positivo e as linhagens testadas apresentaram banda de tamanho esperado, indicando presença de expressão de PspA nas linhagens e reatividade cruzada de anti-PspA1 com PspA2. Para as linhagens VT4-PspA3 e NVT15B/C-PspA4, foi utilizado soro anti-PspA4 (1:5000) (Figura 25-B). Como controle negativo, foi utilizada a linhagem TIGR4 (VT4-PspA3) nocauteada para PspA (TIGR4- Δ PspA). Foi verificada ausência de banda na linhagem VT4-PspA3, enquanto os clones da linhagem NVT15B/C-PspA4 apresentaram banda de tamanho esperado, indicando reconhecimento de PspA4 na linhagem.

Em seguida, o mesmo grupo de amostras utilizadas na Figura 25-B foi avaliado com maior concentração do soro anti-PspA4 (1:500) e também com soro anti-PspA3 (1:5000) (Figura 26). Na avaliação com anti-PspA4, a linhagem NVT15B/C-PspA4 apresentou o mesmo padrão de bandas, porém com intensidade mais forte, possivelmente pela maior concentração de anti-PspA4 utilizada no experimento. Na linhagem VT4-PspA3 e clones resistentes aos antibióticos, foi possível observar uma banda, indicada pela seta, que provavelmente representa PspA3, já que a banda não foi visualizada em TIGR4- Δ PspA (Figura 26-A). O soro anti-PspA3 confirmou a expressão de PspA3 em VT4-PspA3 e nos clones resistentes a antibióticos (Figura 26-B).

Esses dados mostram que a transformação das linhagens com os cassetes de resistência não afetou a expressão de PspA. Além disso, foi observado reconhecimento de PspA1 e PspA2 por soro anti-PspA1. Já o soro anti-PspA4 reconheceu PspA4, mas mostrou baixa reatividade cruzada com PspA3.

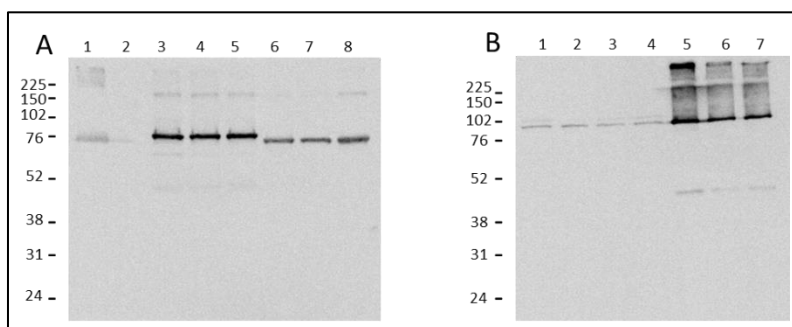


Figura 25. Análise da expressão de PspA com soro anti-PspA1 e anti-PspA4. O extrato proteico de diferentes linhagens de pneumococo foi analisado para a expressão de PspA por *western blot* com soro anti-PspA1 (A) e anti-PspA4 (B) na concentração de 1:5000. (A). 1- D39, 2- D39- Δ PspA, 3- NVT33-PspA1, 4- NVT33-PspA1 Erm 2, 5- NVT33-PspA1 Spec 1, 6- VT23F-PspA2, 7- VT23F-PspA2 Erm 2, 8- VT23F-PspA2 Spec 3. (B). 1- VT4-PspA3, 2- TIGR4- Δ PspA, 3- VT4-PspA3 Erm 3, 4- VT4-PspA3 Spec 1, 5- NVT15B/C-PspA4, 6- NVT15B/C-PspA4 Erm 4, 7- NVT15B/C-PspA4 Spec 2. A migração do padrão de massa molecular está indicada em kDa.

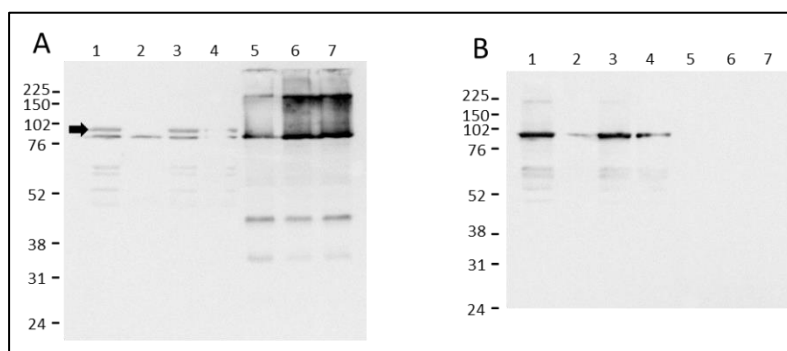


Figura 26. Análise da expressão de PspA com soro anti-PspA4 e anti-PspA3. O extrato proteico de diferentes linhagens de pneumococo foi analisado para a expressão de PspA por *western blot* com soro anti-PspA4 na concentração de 1:500 (A) e anti-PspA3 na concentração de 1:5000 (B). 1- VT4-PspA3, 2- TIGR4- Δ PspA, 3- VT4-PspA3 Erm 3, 4- VT4-PspA3 Spec 1, 5- NVT15B/C-PspA4, 6- NVT15B/C-PspA4 Erm 4, 7- NVT15B/C-PspA4 Spec 2. A migração do padrão de massa molecular está indicada em kDa.

4.5. Desafio com modelos de co-colonização em camundongos

As misturas avaliadas em co-cultivo *in vitro* foram então testadas em camundongos para estabelecimento dos modelos de co-colonização. Camundongos foram inoculados primeiramente com a mistura de clones derivados de um mesmo isolado e lavado nasal foi realizado depois de 5 dias para avaliar a carga bacteriana. Observou-se que quantidades semelhantes de bactérias resistentes a Erm e Spec foram recuperadas para as linhagens VT4-PspA3 e NVT33-PspA1 (Figura 27-A e B). Foi observada menor recuperação de VT23F-PspA2 Spec 3 em relação a VT23F-PspA2 Erm 2 (Figura 27-C) e de NVT15B/C-PspA4 Spec 2 em relação a NVT15B/C-PspA4 Erm 4 (Figura 27-D).

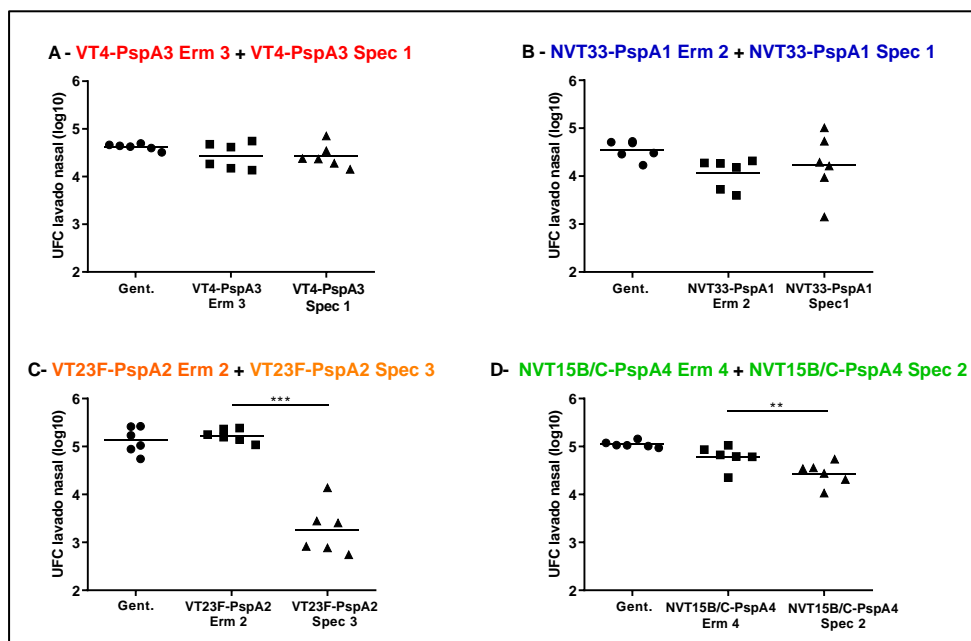


Figura 27. Desafio de co-colonização de camundongos com mistura de pneumococos derivados da mesma linhagem e resistentes a diferentes antibióticos. Os camundongos foram desafiados com a mistura de duas linhagens e lavados nasais foram coletados. As misturas utilizadas foram: VT4-PspA3 Erm 3 + VT4-PspA3 Spec 1 (A), NVT33-PspA1 Erm 2 + NVT33-PspA1 Spec 1 (B), VT23F-PspA2 Erm 2 + VT23F-PspA2 Spec 3 (C) e NVT15B/C-PspA4 Erm 4 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (D). Os gráficos indicam a quantidade de bactérias recuperadas resistentes a Gent, Erm e Spec no lavado nasal de cada animal. Teste t pareado entre os grupos Erm e Spec – **P=0.01, ***P=0.001.

Em seguida, camundongos foram desafiados com a mistura de clones VT + NVT resistentes a antibióticos diferentes e expressando diferentes PspAs. O lavado nasal realizado depois de 5 dias mostrou recuperação semelhante de bactérias em camundongos desafiados com as misturas VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1, VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 e VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (Figura 28A-C). No entanto, desafio com a mistura VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4 levou à recuperação de uma quantidade muito menor de VT23F-PspA2 (Figura 28-D). As misturas VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 e VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 foram então escolhidas para avaliar a eficácia da vacina polissacarídica conjugada (PCV13) em comparação com os antígenos proteicos PspA1 e PspA4 em ensaios de imunização de camundongos.

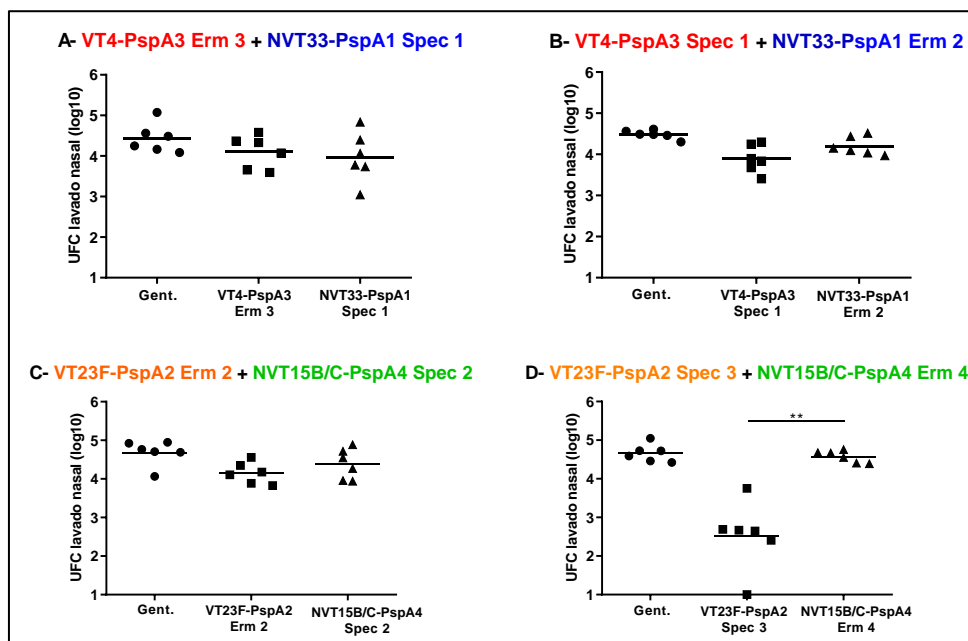


Figura 28. Desafio de co-colonização de camundongos com mistura de pneumococos derivados de linhagens diferentes e resistentes a diferentes antibióticos. Os camundongos foram desafiados com a mistura de duas linhagens e lavados nasais foram coletados. As misturas utilizadas foram: VT4-PspA3 Erm 3 + NVT33-PspA1 Spec 1 (A), VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 (B), VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (C), VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4 (D). Os gráficos indicam a quantidade de bactérias recuperadas resistentes a Gent, Erm e Spec no lavado nasal de cada animal. Teste t pareado entre os grupos Erm e Spec – **P=0.01.

4.6. Expressão e purificação das proteínas PspA1 e PspA4

As proteínas recombinantes PspA1 e PspA4 foram produzidas por indução em *E. coli* BL21 Star (DE3) pLys transformada com os vetores pAE-pspA1 e pAE-pspA4, respectivamente. Após a expressão, as proteínas contendo cauda de polihistidina foram purificadas a partir da fração solúvel do extrato bacteriano em coluna de afinidade por níquel com eluição com imidazol e foi possível observar um único pico destacado de proteína. Foi realizado SDS-PAGE com as frações para confirmação da purificação de PspA1 (Figura 29) e PspA4 (Figura 30). As amostras L5 de PspA1 e E3 de PspA4 foram dialisadas e tratadas com Triton X-114 para eliminar o LPS contaminante. O Triton X-114 residual foi retirado com *beads* SM-2. Após os tratamentos, a integridade e a pureza das proteínas foram confirmadas por eletroforese em SDS-PAGE (Figura 31). A quantificação de proteínas nas amostras após os tratamentos foi realizada pelo método de Bradford e resultou em 1 µg/µL e 2 µg/µL nas amostras de PspA1 e PspA4, respectivamente.

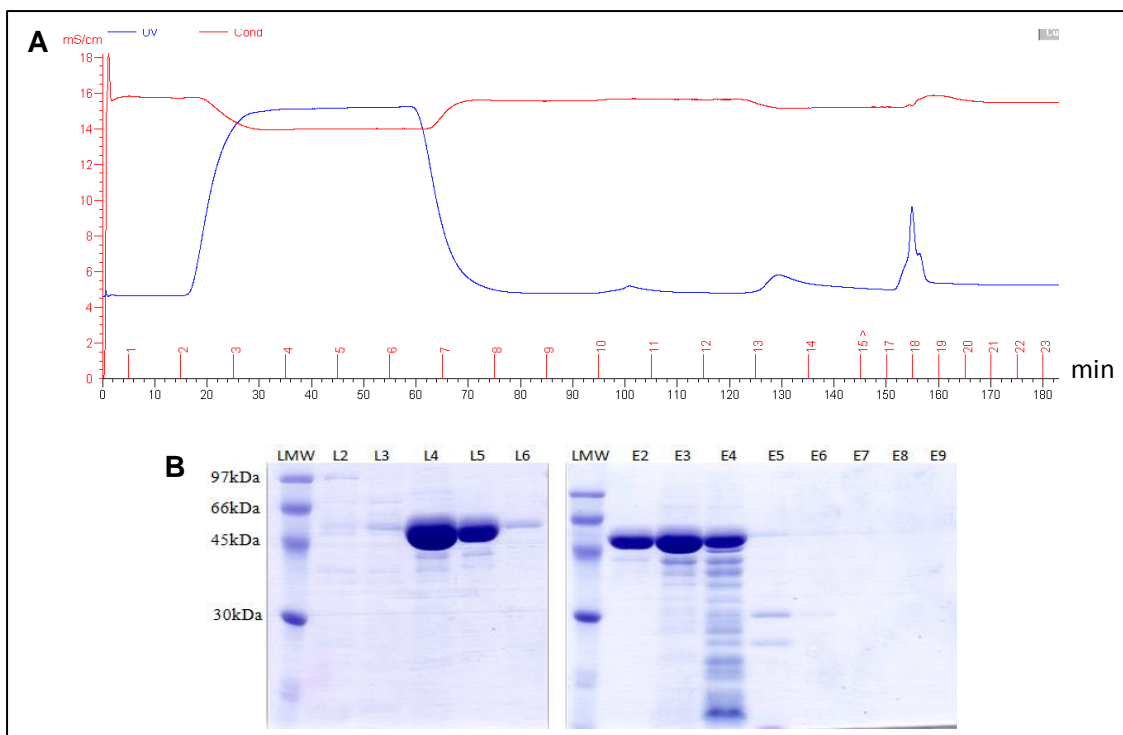


Figura 29. Purificação da proteína PspA1 por coluna de afinidade. A PspA1 foi purificada em coluna de afinidade por níquel. Abs280nm e condutância durante o processo de purificação foram detectadas (A). Amostras das frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE: lavagens L2-L6, eluições E2-E9 e LMW (Padrão de massa molecular LMW, GE Healthcare) (B).

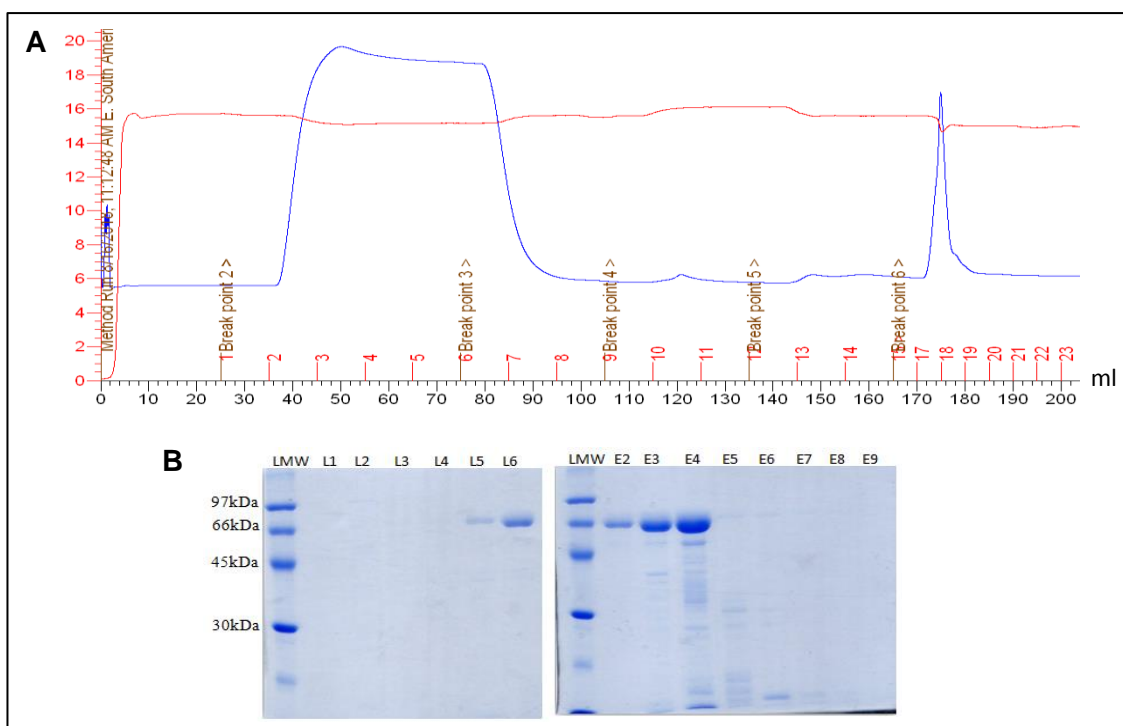


Figura 30. Purificação da proteína PspA4 por coluna de afinidade. A PspA4 foi purificada em coluna de afinidade por níquel. Abs280nm e condutância durante o processo de purificação foram detectadas (A). As amostras das frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE: lavagens L2-L6, eluições E2-E9 e LMW (Padrão de massa molecular LMW, GE Healthcare) (B).

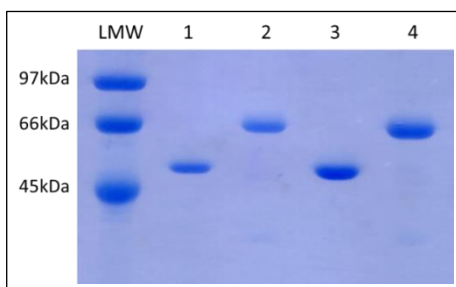


Figura 31. Análise por SDS-PAGE das proteínas PspA1 e PspA4 purificadas e tratadas para retirada de LPS e Triton X-114. SDS-PAGE das amostras L5 de PspA1 e E3 de PspA4 dialisadas e tratadas para retirada de LPS e Triton X-114. LMW: Padrão de massa molecular (GE Healthcare); 1: PspA1 L5 1 μ L; 2: PspA4 E3 1 μ L; 3: PspA1 L5 2 μ L; 4: PspA4 E3 2 μ L.

4.7. Indução de anticorpos IgG anti-PspA1 e anti-PspA4 no soro

Camundongos foram então imunizados com 3 doses das seguintes formulações: salina, adjuvante wP, PspA1+PspA4+wP, PCV13 e (PspA1+PspA4+wP) + PCV13. A determinação dos títulos de anticorpos IgG anti-PspA1 e anti-PspA4 no soro foi realizada por ELISA após a segunda (sangria 1) e terceira (sangria 2) imunizações (Figura 32). A imunização com a vacina PspA1+PspA4+wP levou a um aumento significativo nos títulos de anticorpos anti-PspA1 e anti-PspA4 após a segunda imunização. Maiores títulos foram observados após a terceira imunização. O grupo imunizado com PspA1+PspA4+wP por via nasal e com PCV13 por via subcutânea mostrou aumento semelhante nos níveis de anticorpos após a terceira imunização.

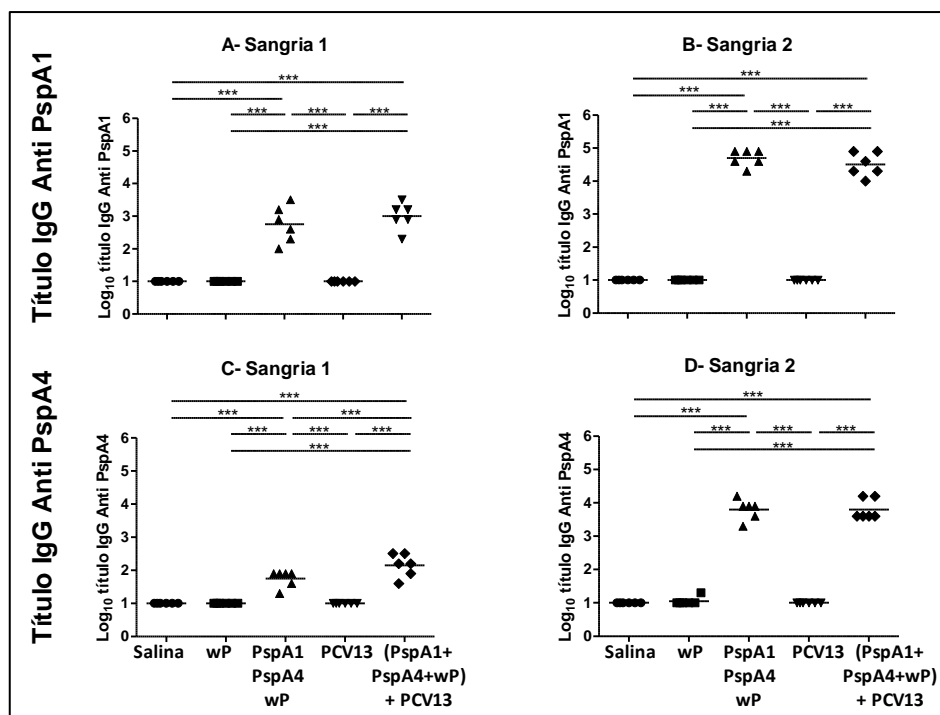


Figura 32. Indução de anticorpos IgG anti-PspA1 e anti-PspA4. Anticorpos anti-PspA1 (A e B) e anti-PspA4 (C e D) foram detectados por ELISA em amostras de soro coletadas após a segunda (A e C) e terceira (B e D) imunizações. *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey – *** $P=0.001$. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

4.8. Indução de anticorpos IgG anti-PS no soro

Foram determinados também os títulos de anticorpos IgG anti-PS para os sorotipos 4, 23F, 33F e 15B por ELISA no soro coletado após 3 imunizações (Figura 33). As imunizações nos dois grupos de camundongos que receberam PCV13 levaram à indução de anticorpos anti-PS para os sorotipos 4 e 23F, com títulos mais baixos detectados para PS 23F comparado ao PS 4. Nos grupos imunizados com salina, wP e PspA1+PspA4+wP não foram detectados anticorpos. Para os sorotipos 33F e 15B não foram detectados anticorpos em nenhum dos grupos, como esperado, já que se tratam de PS NVT (dados não mostrados).

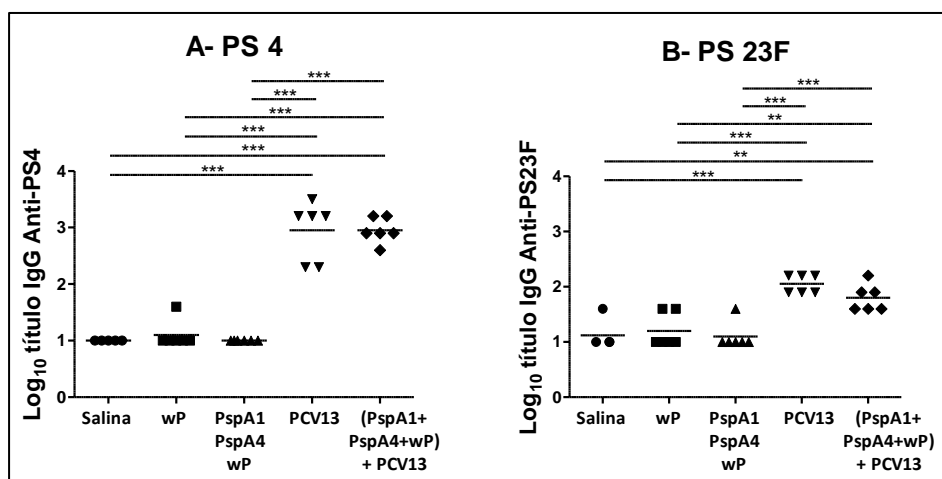


Figura 33. Indução de anticorpos IgG anti-PS4 e anti-PS23F. Anticorpos anti-PS 4 (A) e anti-PS 23F (B) foram detectados por ELISA em amostras de soro coletadas após a terceira imunização. *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey – ** $P=0.01$, *** $P=0.001$. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

4.9. Análise de anticorpos IgG e IgA anti-PspA1 e anti-PspA4 em lavado vaginal

Anticorpos IgG e IgA anti-PspA1 foram detectados por ELISA em lavado vaginal realizado após três imunizações (Figura 34). Os dois grupos imunizados com a vacina proteica (PspA1+PspA4+wP) e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 levaram a um aumento tanto de IgG quanto de IgA anti-PspA1 em lavados vaginais de camundongos comparado aos grupos salina, wP e PCV13. Além disso, os níveis de IgG detectados (Figura 34-A) foram mais altos do que os níveis de IgA (Figura 34-B). Portanto, a imunização nasal foi capaz de induzir anticorpos IgG e IgA específicos na mucosa vaginal.

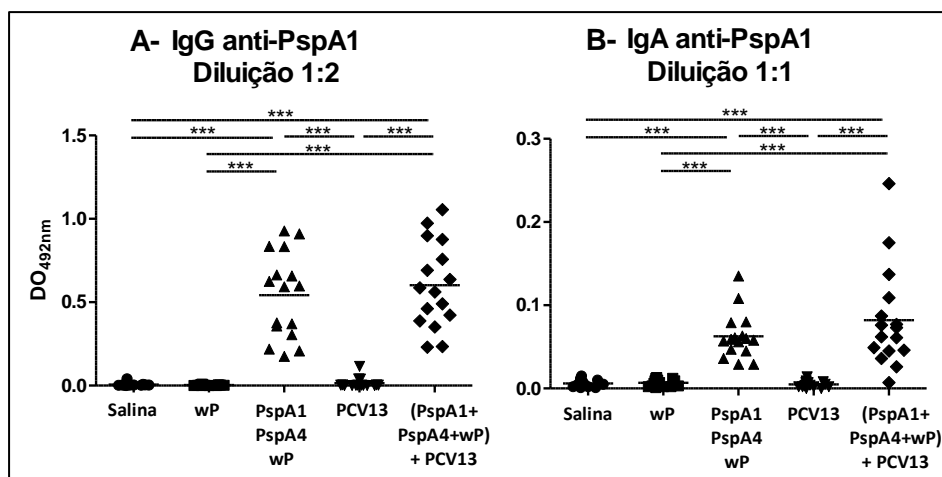


Figura 34. Indução de anticorpos IgG e IgA anti-PspA1 no lavado vaginal. Anticorpos IgG anti-PspA1 (A) e IgA anti-PspA1 (B) foram detectados por ELISA em amostras de lavado vaginal coletadas dos camundongos após três imunizações. *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey – *** $P=0.001$. Resultados obtidos de 2 experimentos independentes.

4.10. Análise de ligação de anticorpos IgG à superfície da bactéria por citometria de fluxo

A ligação dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações à superfície de pneumococos intactos foi avaliada por citometria de fluxo. As bactérias foram incubadas com o *pool* de soros da sangria 2 e, em seguida, com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado a FITC. Soro de camundongos imunizados com PCV13 e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 apresentaram ligação a VT4-PspA3 (Figura 35-A). Como não houve ligação à bactéria do soro de animais imunizados com PspA1+PspA4+wP, parece não haver reconhecimento de PspA3 expressa por essa linhagem. A ligação observada deve-se, provavelmente, à indução de anticorpos anti-PS 4. Com a bactéria NVT33-PspA1, houve ligação de anticorpos do soro de animais imunizados com PspA1+PspA4+wP e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 (Figura 35-B). Como se trata de uma bactéria NVT, não houve reconhecimento pelo soro de PCV13. Para a bactéria VT23F-PspA2, foi observada ligação de anticorpos presentes no soro dos grupos PspA1+PspA4+wP e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 (Figura 35-C). Embora se trate de uma bactéria VT, não foi observada ligação com soro de animais imunizados com PCV13. Finalmente, com a bactéria NVT15B/C-PspA4 também foi observada ligação nos grupos PspA1+PspA4+wP e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 (Figura 35-D). Novamente, como se trata de uma bactéria NVT, não houve reconhecimento pelo soro do grupo PCV13.

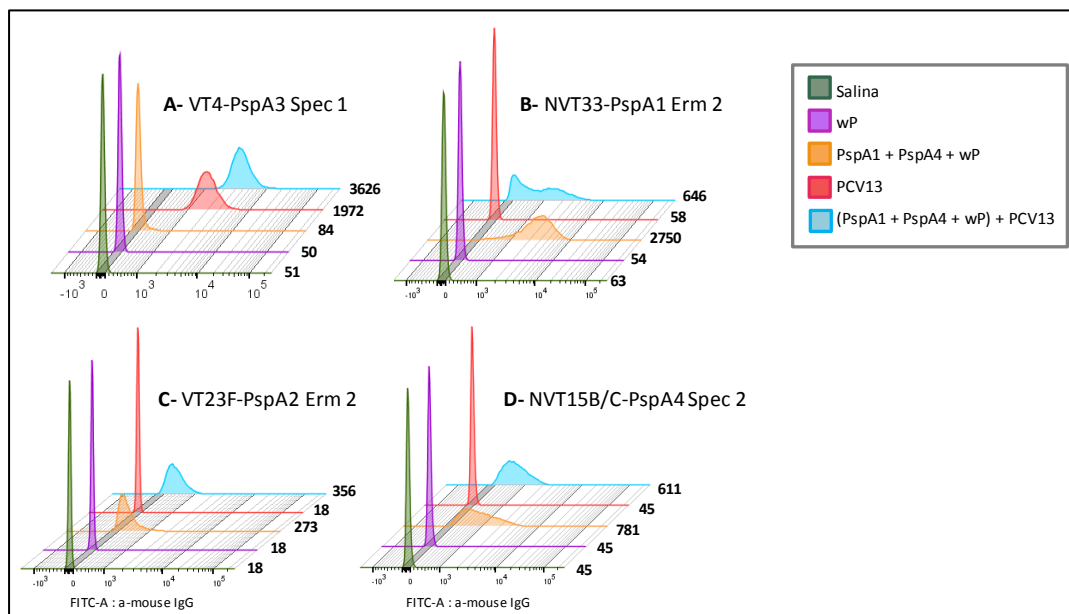


Figura 35. Ligação de anticorpos IgG à superfície de pneumococos. As linhagens VT4-PspA3 Spec 1 (A), NVT33-PspA1 Erm 2 (B), VT23F-PspA2 Erm 2 (C) e NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (D) foram incubadas com a *pool* de soros da sangria 2 dos grupos indicados e em seguida com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC. A ligação de anticorpos IgG na superfície das bactérias foi analisada por citometria de fluxo. A mediana de intensidade de fluorescência está indicada para cada grupo nos histogramas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão apresentados como histograma de intensidade de fluorescência.

4.11. Avaliação da aglutinação de bactérias por anticorpos do soro

As bactérias utilizadas no desafio foram incubadas com *pool* de soro da segunda sangria dos grupos da imunização e a aglutinação foi avaliada por citometria de fluxo. Os quadrantes (Q) definidos a partir do ensaio realizado com o soro do grupo imunizado com salina (negativo) foram utilizados para quantificar a porcentagem de aglutinação, sendo os eventos em Q1, Q2 e Q3 considerados como bactérias aglutinadas.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 36 e a Tabela 5, foi possível observar que os anticorpos presentes no soro dos grupos imunizados com salina, wP e PspA1+PspA4+wP não foram capazes de aglutinar nenhuma das linhagens utilizadas no desafio, variando Q1+Q2+Q3 de 4,5 a 7,1%. Na amostra da linhagem VT4-PspA3 incubada com soro dos camundongos imunizados com PCV13 e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13, a porcentagem de aglutinação aumentou aproximadamente 10% comparado ao grupo salina (de 4,5% para 14,6 % em PCV13 e de 4,5% para 15,7% em (PspA1+PspA4+wP)+PCV13). Nas demais

linhagens, o aumento na porcentagem de bactérias aglutinadas não alcançou 10%, chegando no máximo a 5,3% para PCV13 em VT-23FPspA2 (de 5,8% para 11,1%). Ainda assim, esse aumento não foi reproduzível no grupo (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 (de 5,8% para 5,8%).

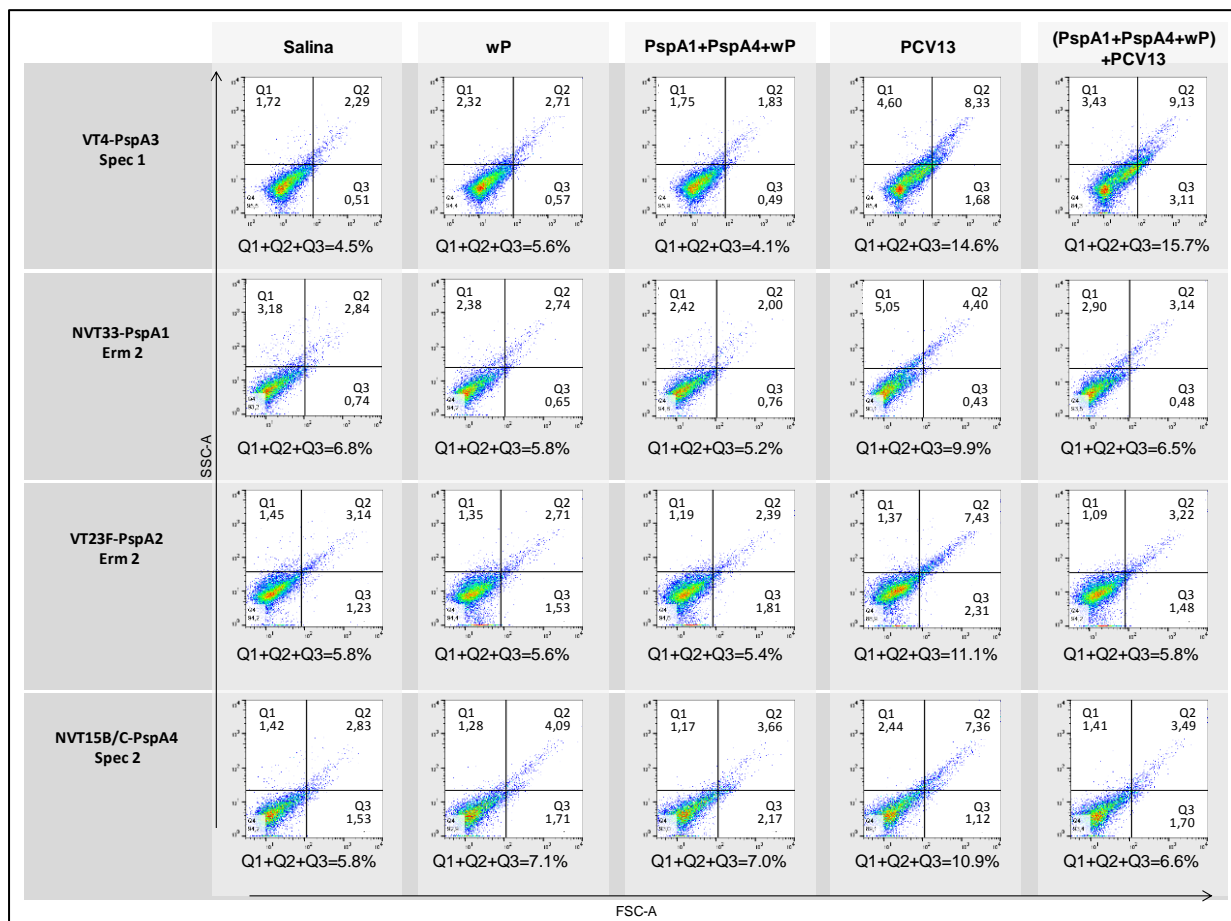


Figura 36. Ensaio de aglutinação com as linhagens e soro dos camundongos. O ensaio de aglutinação com as linhagens VT4-PspA3, NVT33-PspA1, VT23F-PspA2, NVT15B/C-PspA4, utilizadas no desafio, foi realizado com os soros dos camundongos imunizados com as formulações indicadas. A aglutinação foi quantificada pela soma dos quadrantes Q1, Q2 e Q3, que estão indicados em porcentagem de eventos na área determinada. As cores vão do azul que representa menor densidade de eventos ao vermelho representando região uma região mais densa.

Tabela 5. Porcentagem de aglutinação das linhagens de *S. pneumoniae*

Linhagem	Q1+Q2+Q3 (%)				
	Salina	wP	PspA1+PspA4+wP	PCV13	(PspA1+PspA4+wP)+PCV13
VT4-PspA3 Spec 1	4.5	5.6	4.1	14.6	15.7
NVT33-PspA1 Erm 2	6.8	5.8	5.2	9.9	6.5
VT23F-PspA2 Erm 2	5.8	5.6	5.4	11.1	5.8
NVT15B/C-PspA4 Spec 2	5.8	7.1	7.0	10.9	6.6

4.12. Avaliação da proteção induzida pela imunização com proteína e PCV13 contra co-colonização por pneumococos VT e NVT

Os camundongos imunizados com 3 doses das formulações vacinais foram então desafiados utilizando os modelos de co-colonização com pneumococos VT e NVT. No desafio realizado com as misturas VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 (Figura 37), observou-se que houve uma diminuição da quantidade de bactérias VT e NVT nos grupos imunizados apenas com o adjuvante wP comparado ao grupo salina, indicando um efeito inespecífico. No grupo imunizado com PspA1+PspA4+wP, houve diminuição significativa em relação a wP apenas para NVT33-PspA1 Erm 2. Nos animais imunizados com PCV13, houve uma diminuição significativa de VT4-PspA3 Spec 1, mas não de NVT33-PspA1 Erm 2, como esperado. Além disso, o grupo imunizado com (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 apresentou carga bacteriana menor do que o grupo PCV13 tanto para VT4-PspA3 Spec 1 quanto para NVT33-PspA1 Erm 2 (Figura 37-A e B). Na figura 37-C, quando comparadas as duas linhagens da mistura no mesmo grupo vacinal, foi possível observar que a linhagem VT apresentou menor recuperação de bactérias comparada à linhagem NVT no grupo imunizado com PCV13.

No desafio com VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (Figura 38), foi observada novamente diminuição de bactérias VT e NVT nos grupos imunizados com wP. No grupo imunizado com PspA1+PspA4+wP, houve diminuição significativa em relação a wP apenas de VT23F-PspA2 Erm 2. Nos animais imunizados com PCV13, não foi observada diminuição de nenhuma das linhagens. Novamente, o grupo (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 apresentou carga bacteriana menor do que o grupo PCV13 tanto para VT23F-PspA2 Erm 2 como para

NVT15B/C-PspA4 Spec 2 (Figura 38-A e B). Comparando as duas linhagens na mistura do mesmo grupo vacinal (Figura 38-C), foi possível observar diferença significativa para os grupos vacinados com wP, PspA1+PspA4+wP e (PspA1+PspA4+wP)+PVC13. Não houve diferença significativa no grupo imunizado com salina ou PVC13.

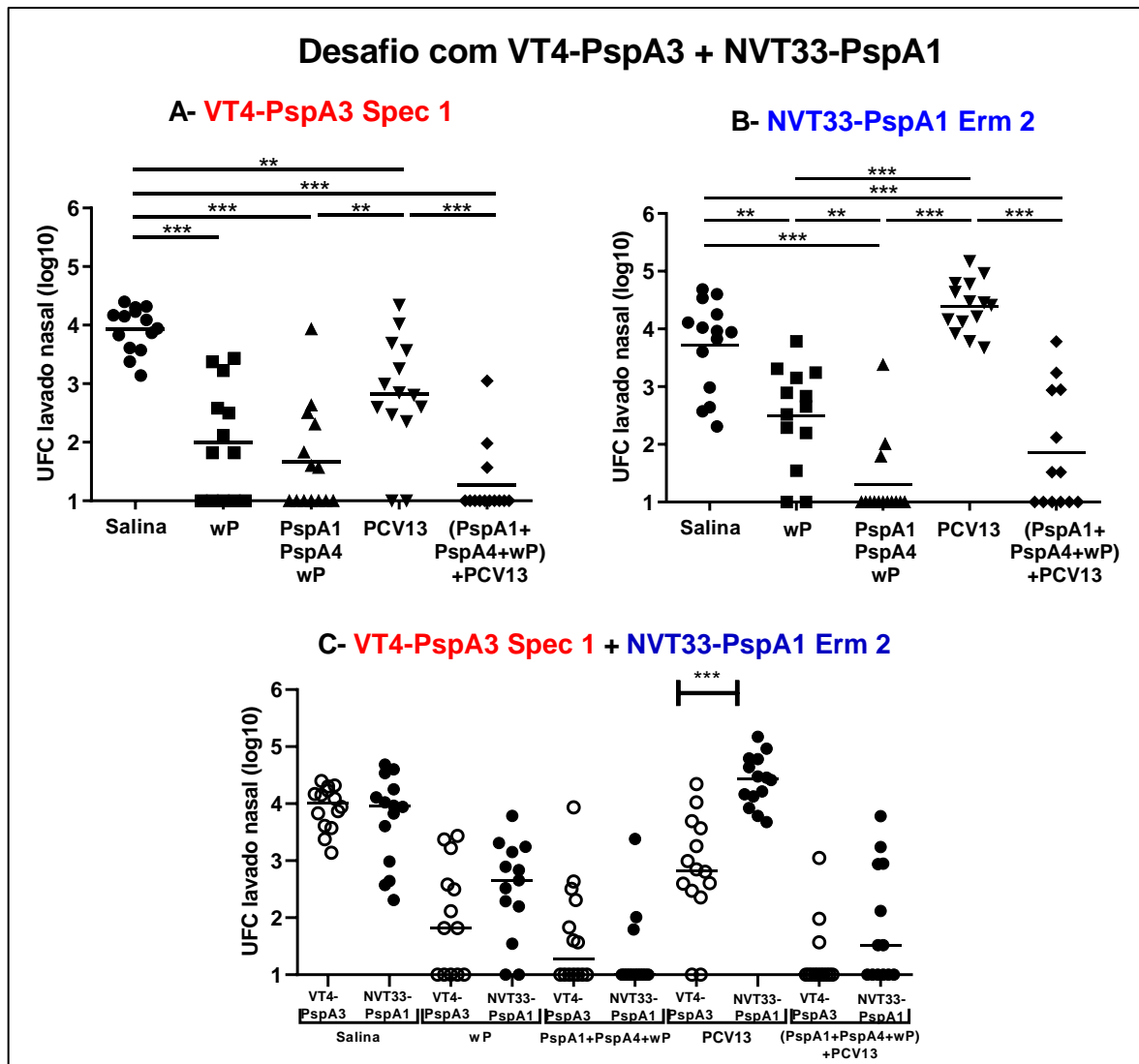


Figura 37. Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados e desafiados com a mistura VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2. Camundongos foram imunizados com 3 doses das formulações indicadas. Depois de 3 semanas da última imunização, foi realizado desafio nasal com mistura de isolados VT e NVT: VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2. Após 5 dias, foram coletados e plaqueados os lavados nasais para determinação da carga bacteriana. *One-way ANOVA* com pós teste de Tukey (A-B) e teste t pareado (C) (* $P=0.05$; ** $P=0.01$, *** $P=0.001$). Resultados obtidos de 2 experimentos independentes.

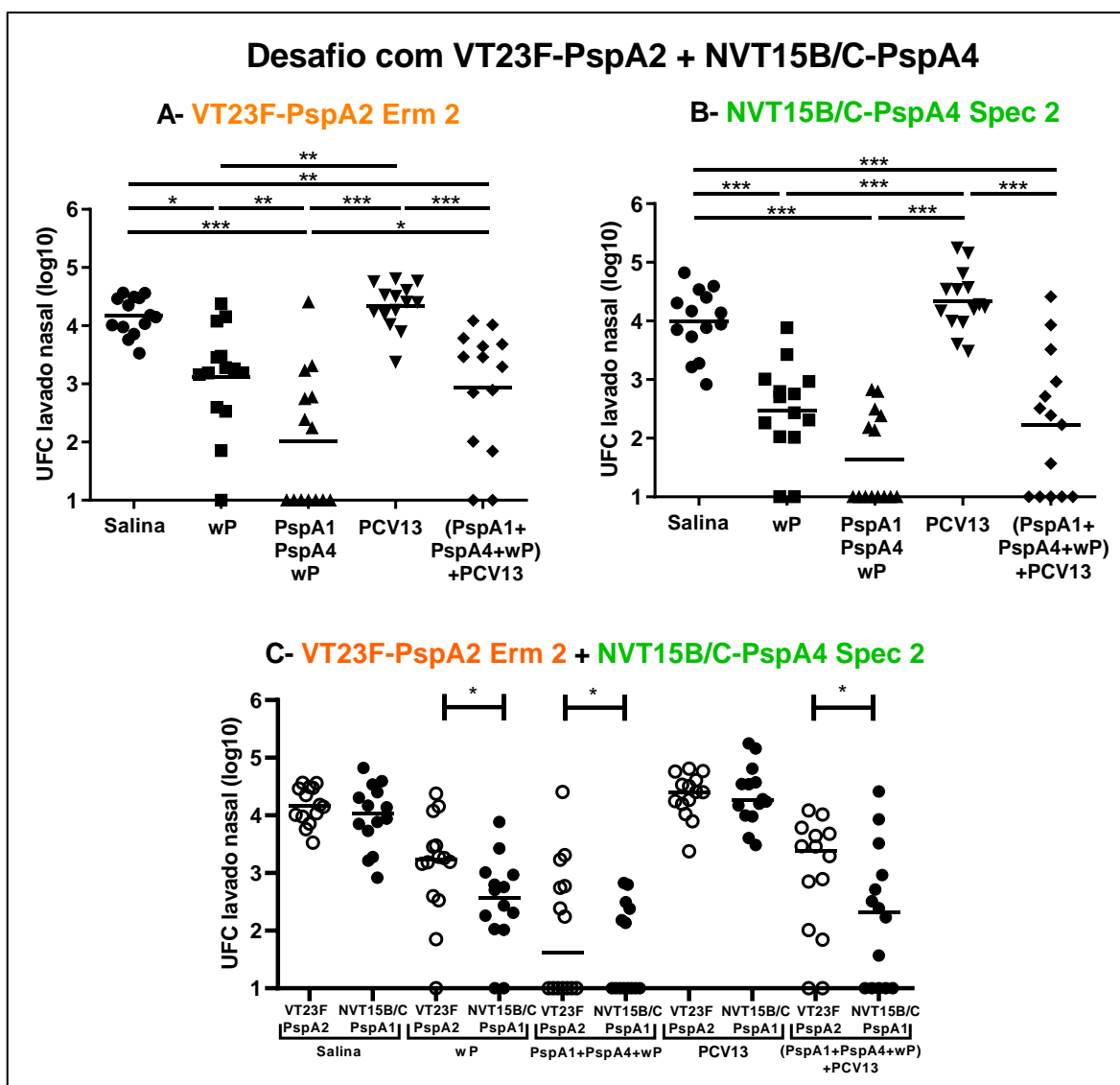


Figura 38. Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados e desafiados com a mistura VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2. Camundongos foram imunizados com 3 doses das formulações indicadas. Depois de 3 semanas da última imunização, foi realizado desafio nasal com mistura de isolados VT e NVT: VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2. Após 5 dias, foram coletados e plaqueados os lavados nasais para determinação da carga bacteriana. *One-way ANOVA* com pós teste de Tukey (A-B) e teste t pareado (C) (* $P=0.05$; ** $P=0.01$, *** $P=0.001$). Resultados obtidos de 2 experimentos independentes.

4.13. Quantificação de citocinas e quimiocinas no lavado nasal

Foi realizada a quantificação de citocinas e quimiocinas no lavado nasal realizado 5 dias após o desafio com as misturas de pneumococo. Foram avaliadas as citocinas/quimiocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, CXCL1, CXCL2 e CCL2. Dentre as citocinas/quimiocinas avaliadas, foi possível observar diferenças apenas para CXCL1, CXCL2 e IL-6 (Figura 39). Foi possível observar que os grupos

imunizados com wP, PspA1+PspA4+wP e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 apresentaram menor concentração dessas citocinas/quimiocinas comparados aos grupos salina e PCV13. Esses dados estão de acordo com a carga bacteriana mais elevada encontrada nos lavados desses dois últimos grupos (Figura 37 e 38).

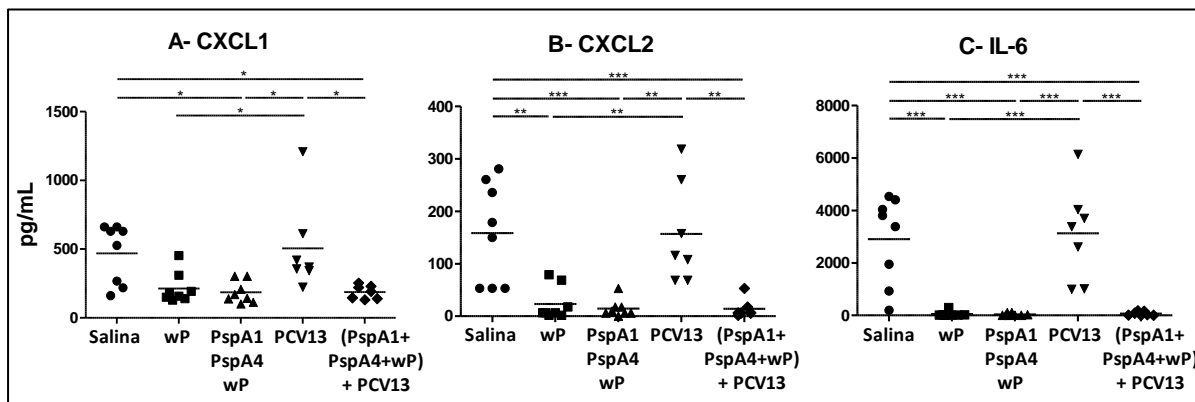


Figura 39. Quantificação das citocinas/quimiocinas CXCL1, CXCL2 e IL-6 nas amostras de lavado nasal dos camundongos imunizados e desafiados. Lavado nasal foi realizado cinco dias após o desafio e as citocinas/quimiocinas foram quantificadas: CXCL1 (A), CXCL2 (B) e IL-6 (C). *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey – * $P=0.05$; ** $P=0.01$, *** $P=0.001$. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

A vacina conjugada atualmente cobre apenas 13 (PCV13) dos 98 sorotipos de pneumococo descritos. Seu uso levou a um aumento tanto na colonização quanto nas doenças causadas por sorotipos não vacinais. Estratégias para ampliar a cobertura vacinal incluem o uso de antígenos proteicos, como a PspA (Ogunniyi; Paton, 2015). Vários trabalhos demonstram abordagens vacinais utilizando PspA contra infecções por pneumococo em modelos vacinais (Briles *et al.*, 2000; Briles *et al.*, 2003; Ogunniyi *et al.*, 2000). Nosso grupo demonstrou anteriormente que a imunização com uma formulação nasal composta por PspA recombinante com adjuvante wP protegeu camundongos contra colonização por pneumococo, com proteção induzida por PspA5 contra uma bactéria expressando PspA1 (Oliveira *et al.*, 2010). Uma combinação de PspA1, PspA4 e wP também foi testada por nosso grupo em modelos de co-colonização. No trabalho foram estabelecidos dois modelos de co-colonização em camundongos com isolados VT: i. Colonização com dois isolados de sorotipo 6B e ii. Colonização com um isolado de sorotipo 6B e outro de sorotipo 23F. A imunização levou a uma diminuição da colonização nos dois modelos de co-colonização. Além disso, não foi observado um crescimento

exacerbado de um isolado em relação ao outro, indicando uma menor probabilidade da ocorrência de substituição por pressão seletiva da vacinação com PspA (Tostes *et al.*, 2017). Foi proposto agora testar a formulação vacinal em modelos de co-colonização com isolado VT e NVT expressando PspAs de famílias diferentes em comparação com PCV13.

Para estabelecer os modelos de co-colonização, quatro linhagens de pneumococo foram utilizadas para a transformação com cassetes de resistência à eritromicina e à espectinomicina dentro de gene *iga*. Janoff *et al.* (2014) realizou um estudo indicando que a IgA1 protease produzida por *S. pneumoniae* cliva IgA1 de humanos, mas não apresenta ação em camundongos, não atuando como fator de virulência em modelo murino. Os cassetes construídos possibilitaram o nocaute nas quatro linhagens de pneumococo, VT4-PspA3 (TIGR4), NVT33-PspA1 (4431/119), VT23F-PspA2 (HU368/06) e NVT15B/C-PspA4 (237/53), por recombinação homóloga. Kono *et al.* (2016) também realizou com sucesso o nocaute do *iga* para inserir os genes de resistência a eritromicina e espectinomicina para estabelecer modelos de colonização, invasão e transmissão de pneumococo em camundongos. No trabalho, o crescimento *in vitro* e *in vivo* de uma linhagem de pneumococo nocauteada no *locus iga* foi avaliado combinando a mesma linhagem com diferentes resistências. A capacidade de colonizar a nasofaringe foi equivalente, mostrando que a transformação não alterou o crescimento do pneumococo utilizado (Kono *et al.*, 2016).

Os clones construídos resistentes a Erm ou Spec utilizados para o estabelecimento de modelos de co-colonização de camundongos com isolados VT e NVT expressando diferentes PspAs foram avaliados para expressão de PspA e reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspA. Os anticorpos anti-PspA1 reagiram com a linhagem NVT33-PspA1 transformada com os genes de resistência a *erm* e *spec* da mesma forma que a linhagem não transformada, mostrando que a inserção dos genes de resistência não modificou a produção de PspA. A linhagem VT23F-PspA2 transformada e não transformada não alterou a produção de PspA2 e reagiu com anticorpos anti-PspA1, demonstrando reatividade cruzada entre anticorpos anti-PspA1 e a proteína PspA2 produzida pela linhagem, também observada por Tostes *et al.* (2017) com camundongos imunizados com PspA, e Nabors *et al.* (2000) com coelhos imunizados com PspA.

Para NVT15B/C-PspA4, não houve diferença entre os clones resistentes aos antibióticos na produção de PspA4, que reagiu com o anticorpo anti-PspA4. Já para a linhagem VT4-PspA3, com o anticorpo anti-PspA3 verificou-se que a inserção do gene de resistência não modificou a produção de PspA3, mas houve baixa reação cruzada com anticorpos anti-PspA4. Dois estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que PspA4 e PspA5 seriam capazes de induzir anticorpos com reatividade cruzada entre PspAs de diferentes clados (Darrieux *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2010), o que não foi observado para PspA3 no atual trabalho. Uma explicação para a diferença de resultados é a utilização do adjuvante hidróxido de alumínio na imunização parenteral nos trabalhos já publicados, o que resultou em títulos mais altos de anticorpos anti-PspA. Além disso, as proteínas não haviam sido tratadas para redução do LPS contaminante.

Na avaliação de crescimento em co-cultura *in vitro* de duas linhagens diferentes, sendo uma VT e a outra NVT, resistentes a diferentes antibióticos e expressando PspAs de famílias diferentes, foi observado que as misturas VT4-PspA3 + NVT33-PspA1 apresentaram crescimento e concentração bacteriana semelhantes. Já com a mistura VT23F-PspA2 + NVT15B/C-PspA4, foi observado menor crescimento e menor concentração bacteriana para NVT15B/C-PspA4. A co-colonização em camundongos foi testada e as misturas apresentaram recuperação similar das duas linhagens inoculadas nos camundongos, exceto para a mistura VT23F-PspA2 Spec 3 + NVT15B/C-PspA4 Erm 4, que apresentou diferença significativa na colonização.

Dois linhagens diferentes em uma co-colonização podem interagir entre si variando da competição ao favorecimento do crescimento (Gaivao *et al.*, 2017). No estudo de Lipsitch *et al.* (2000), foram mostradas evidências de que pode ocorrer competição direta entre cepas de *S. pneumoniae*. No trabalho de Dawid *et al.* (2007), foi possível observar diferenças no crescimento entre isolados. Portanto, duas linhagens podem inibir fortemente uma a outra, afetando a proporção de infecções bem sucedidas ao longo de ensaios de desafios (Gaivao *et al.*, 2017), o que pode explicar a diferença de crescimento entre duas linhagens em um modelo de co-colonização ou mesmo em co-cultura. Como o objetivo do trabalho é comparar a eficiência das duas vacinas contra co-colonização, as linhagens escolhidas foram aquelas que apresentaram colonização semelhante em

camundongos quando inoculadas conjuntamente. Portanto, os dois modelos escolhidos, para serem testados após a imunização, foram VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 e VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2, pois apresentaram capacidades de colonização da nasofaringe de camundongos equivalentes.

Os animais foram então imunizados com as diferentes formulações e a análise de anticorpos anti-PspA1 e anti-PspA4 no soro dos animais coletado após duas e três imunizações mostrou a indução de anticorpos específicos nos grupos imunizados com as proteínas. Além disso, na segunda sangria a concentração de anticorpos apresentou um aumento consequente da terceira imunização, mostrando a importância de três imunizações com a formulação proteica para maior produção de anticorpos em camundongos. Nas amostras de lavado vaginal, foram detectados IgG e IgA anti-PspA1 nos dois grupos imunizados com a vacina proteica PspA1+PspA4+wP. A concentração de anticorpos IgG no lavado vaginal foi menor do que a concentração identificada no sangue. Esses dados mostram que a imunização nasal foi capaz de induzir anticorpos IgG e IgA na mucosa vaginal, o que, provavelmente, se reflete na presença também de anticorpos na mucosa respiratória.

Também foram analisados anticorpos anti-PS para os polissacarídeos presentes nas misturas que foram utilizadas no desafio (4, 23F, 33 e 15B). Os anticorpos encontrados contra PS 4 e PS 23F nos grupos imunizados com PCV13 indicam que as três imunizações de 1/20 da dose humana com a PCV13 foram capazes de induzir anticorpos contra estes dois tipos de polissacarídeos presentes na vacina PCV13. Porém, o título de IgG anti-PS 23F foi mais baixo comparado ao de IgG anti-PS 4. Nos estudos de Esposito *et al.* (2010), foi verificado que o sorotipo 23F induziu menor concentração de anticorpo IgG anti-PS comparado aos outros sorotipos vacinais em crianças após a segunda dose da vacina PCV13 (Esposito *et al.*, 2010). Outros resultados da literatura também demonstram que após o esquema completo de vacinação, os níveis de anticorpos anti-PS vacinais variam entre si por apresentarem imunogenicidade variada (Grant *et al.*, 2013; Kieninger *et al.*, 2010; Wijmenga-Monsuur *et al.*, 2015). Portanto, os dados da literatura podem explicar os níveis de anticorpos anti-PS 23F mais baixos do que aqueles obtidos contra PS 4.

Poucos estudos de imunogenicidade dos polissacarídeos presentes na vacina PCV foram realizados em camundongos. Caro-Aguilar *et al.* (2017) realizou um estudo em camundongos, no qual avaliou a imunogenicidade de diferentes polissacarídeos utilizados na vacina PCV15 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F), atualmente em ensaios clínicos. Nesse estudo, camundongos imunizados com 3 doses de 1/25 da dose humana (0,08 µg de cada PS, exceto 6B com 0,16 µg) foram protegidos contra desafio intraperitoneal com sorotipo 6B, quando comparado ao grupo imunizado apenas com adjuvante. Resultado semelhante foi observado na imunização com a dose inteira humana (2 µg de cada PS, exceto 6B com 4 µg). Os soros dos camundongos imunizados apresentaram concentrações de IgG anti-PS semelhantes contra os sorotipos contidos na vacina PCV15 quando imunizados com a dose inteira ou com 1/25 da dose humana. Comparando o título de IgG induzido pela mesma dose contra os diferentes sorotipos, também foi possível observar uma menor concentração de IgG anti-PS 23F comparado ao anti-PS 4, indicando uma menor imunogenicidade do PS 23F em camundongos, mesmo no soro dos animais imunizados com a dose inteira (Caro-Aguilar *et al.*, 2017).

A ligação de anticorpos do soro de animais após três imunizações à superfície da bactéria foi analisada com as mesmas linhagens resistentes escolhidas para o desafio. Os grupos imunizados com PCV13 apresentaram ligação a VT4-PspA3, sorotipo 4 VT que expressa PspA3. Provavelmente, essa ligação deve-se à presença de anticorpos contra PS 4, uma vez que não houve ligação à bactéria do soro de animais imunizados com PspA1+PspA4+wP. Com a linhagem NVT33-PspA1, sorogrupo 33 NVT que expressa PspA1, apenas os dois grupos imunizados com PspA1+PspA4+wP apresentaram anticorpos ligados à superfície da bactéria. Como se trata de uma linhagem NVT, possivelmente a ligação deve-se a anticorpos anti-PspA. Os dois grupos imunizados com PspA1+PspA4+wP apresentaram anticorpos que se ligaram à bactéria VT23F-PspA2, o que provavelmente se deve a reatividade cruzada de anticorpos contra PspA1 no soro. Nesse caso, trata-se de uma bactéria VT, mas não houve detecção de ligação no grupo imunizado apenas com PCV13, o que pode ser explicado pela baixa indução de anticorpos contra PS 23F. O ensaio realizado com a linhagem NVT15B/C-PspA4, sorotipo 15B/C NVT que expressa PspA4, apresentou ligação de anticorpos nos

grupos imunizados com PspA1+PspA4+wP e (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 e, como se trata de uma bactéria NVT, é esperado que apenas anticorpos anti-PspA se liguem à bactéria.

Um dos mecanismos propostos de eliminação do pneumococo da nasofaringe é a aglutinação (Brouwer *et al.*, 2008). Uma técnica baseada em citometria de fluxo avaliando as bactérias quanto ao tamanho e à complexidade após incubação de linhagens de pneumococo com soro foi proposta recentemente para detectar aglutinação (Mitsi *et al.*, 2017). No atual trabalho, ao utilizar esse protocolo, foi observado que soro dos camundongos imunizados com salina e wP não foram capazes de aglutinar nenhuma das quatro linhagens, atuando como controle negativo. Apenas na linhagem VT4-PspA3 incubada com soro dos animais imunizados com PCV13 houve aumento de cerca de 10% na aglutinação comparado ao grupo salina, mostrando que a vacina PCV13 induziu anticorpos capazes de aglutinar a linhagem de sorotipo 4. Não foi observada aglutinação da linhagem VT23F-PspA2 pelos anticorpos do grupo imunizado com a PCV13, o que está de acordo com a ausência de ligação dos anticorpos IgG nessa linhagem. Não foi observada aglutinação de nenhuma das linhagens analisadas com soros dos grupos imunizados com a formulação vacinal contendo PspA. No experimento de Mitsi *et al.* (2017), o lavado nasal de indivíduos vacinados com PCV, com presença de IgG anti-PS, foi capaz de aglutinar fortemente uma bactéria VT. No trabalho, foi proposto que a cápsula polissacarídica pode ser um dos únicos alvos que provocam respostas de anticorpos aglutinantes contra pneumococo (Mitsi *et al.*, 2017). No entanto, Habets *et al.* (2017) propuseram um ensaio com pequenas alterações e observaram que anticorpos contra PspA presentes no soro de camundongos foram capazes de induzir aglutinação de linhagens não capsuladas que expressam PspA1, PspA2, PspA3, PspA4 e PspA5. No atual trabalho, foram realizados ensaios com bactérias não capsuladas para avaliar a capacidade aglutinante do soro dos animais imunizados com PspA1+PspA4+wP, mas não foram observados resultados positivos (dados não mostrados). Esses dados não significam necessariamente que anticorpos anti-PspA não possuem capacidade aglutinante, podendo ser apenas uma limitação da técnica.

Os camundongos posteriormente foram desafiados com as misturas VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 e VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4

Spec 2. No desafio com a primeira mistura, houve diminuição de bactérias VT e NVT nos camundongos imunizados com wP em relação ao grupo salina, indicando um efeito não específico do adjuvante contra pneumococo. A indução de resposta imune inespecífica pelo adjuvante wP quando coadministrado com a PspA já havia sido observado por nosso grupo (Tostes *et al.*, 2017). Uma resposta similar foi observada na utilização da subunidade B recombinante não tóxica da toxina da cólera (CTB) na imunização nasal, que também reduziu a colonização de pneumococo em camundongos (Malley *et al.*, 2004). Essa resposta inespecífica contra a colonização pneumocócica em camundongos pode envolver a ativação de inflamassoma, células T da mucosa e macrófagos por resposta imune inata local (Kuipers *et al.*, 2016).

No grupo imunizado apenas com a vacina proteica, não foi observada diminuição significativa para VT4-PspA3 em comparação com o grupo wP, indicando que não houve proteção cruzada através da imunização com PspA4. Foi observada redução significativa de NVT33-PspA1 em relação a wP no grupo imunizado com a vacina proteica, mostrando que a PspA1 presente na vacina proteica induziu anticorpos que foram capazes de proteger os camundongos da linhagem que expressa PspA de mesmo clado. Dados semelhantes haviam sido obtidos por nosso grupo no trabalho em que se avaliou a proteção contra co-colonização com dois isolados VT expressando PspAs diferentes. A imunização com PspA4+wP levou à redução da colonização de isolado de sorotipo 6B e PspA3 em comparação ao grupo salina, mas não em comparação com o grupo inoculado com o adjuvante wP. Além disso, imunização com PspA1+wP resultou em proteção contra colonização em camundongos desafiados com uma linhagem que apresenta PspA de mesmo clado, com diferença estatisticamente significativa com o grupo wP (Tostes *et al.*, 2017).

Os grupos imunizados com a PCV13 apresentaram diminuição significativa da linhagem VT4-PspA3, mas não da linhagem NVT33-PspA1. Esses dados podem refletir o que ocorre em crianças colonizadas ao mesmo tempo com isolados de sorotipo vacinal e não vacinal, com diminuição do sorotipo vacinal e aumento do sorotipo não vacinal após imunização com PCV13, resultando em substituição de sorotipo na colonização (Frazao *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Weinberger *et al.*, 2011). Além disso, o grupo imunizado com (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 apresentou

carga bacteriana menor do que o grupo PCV13 tanto para VT4-PspA3 quanto para NVT33-PspA1, apontando que essa seria uma alternativa interessante para aprimorar a vacina comercial.

No desafio com a segunda mistura (VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2), foi observado novamente o efeito inespecífico do adjuvante wP pela diminuição significativa de bactérias VT e NVT comparadas ao grupo controle imunizado com salina. No mesmo desafio, o grupo imunizado com a vacina proteica, PspA1+PspA4+wP, apresentou diminuição significativa de VT23F-PspA2 em relação a wP, demonstrando proteção cruzada entre PspAs da mesma família (Clado 1 e 2). Essa proteção cruzada não havia sido observada no trabalho anterior do nosso grupo, no qual a imunização com PspA1+wP não levou à redução significativa de isolado de clado 2 em comparação com o grupo wP (Tostes *et al.*, 2017). Ainda no grupo imunizado com a vacina proteica, a linhagem NVT15B/C-PspA4 não diminuiu significativamente em relação a wP, apenas em relação a salina, o que pode indicar diminuição de colonização apenas pela ativação de resposta inespecífica do adjuvante. Nos animais imunizados com PCV13, não foram observadas diferenças na carga bacteriana em nenhuma linhagem quando comparado ao grupo imunizado com salina. A falta de eficácia de PCV13 contra a linhagem VT23F-PspA2 pode ser justificada pela concentração de anticorpos anti-PS 23F mais baixa, observada no ELISA, e pela ausência de ligação do anticorpo à superfície de pneumococo, observada por citometria de fluxo. Já para NVT15B/C-PspA4, por ser sorotipo não-vacinal, era esperado que não houvesse diminuição na colonização desta linhagem. Novamente, o grupo imunizado com (PspA1+PspA4+wP)+PCV13 apresentou carga bacteriana menor do que o grupo PCV13 tanto para VT23F-PspA2 quanto para NVT15B/C-PspA4, confirmando que a formulação é um interessante candidato vacinal.

Dentre as citocinas e quimiocinas avaliadas no lavado nasal de camundongos 5 dias após o desafio, foram observadas diferenças nas concentrações de IL-6, CXCL1 e CXCL2, com diferenças significativas entre os lavados nasais dos grupos de camundongos imunizados com adjuvante e os dois grupos imunizados com a vacina proteica PspA1+PspA4+wP. Os grupos imunizados com salina e PCV13 apresentaram maior concentração da citocina pró-inflamatória IL-6 e das quimiocinas CXCL1 e CXCL2. Possivelmente, nestes grupos

ainda há uma maior inflamação causada por uma carga bacteriana maior na nasofaringe quando comparado aos grupos imunizados com wP e os dois grupos imunizados com a vacina proteica.

Em conclusão, os experimentos realizados permitiram nocautear o gene *iga* e estabelecer os modelos de co-colonização VT4-PspA3 Spec 1 + NVT33-PspA1 Erm 2 e VT23F-PspA2 Erm 2 + NVT15B/C-PspA4 Spec 2. Esses modelos foram desenvolvidos para mimetizar a situação de colonização concomitante por mais de um isolado de pneumococo, sendo um VT e outro NVT. Os dois modelos de co-colonização foram utilizados para a comparação da PCV13 e de vacina proteica e mostraram diminuição de colonização tanto de isolados VT como NVT nos grupos imunizados com a vacina proteica composta por PspA1+PspA4+wP, com a presença de efeito inespecífico do adjuvante. Já a imunização somente com PCV13 levou à redução significativa de um dos isolados VT testados. Nesse caso, foi observado um aumento do isolado NVT, indicando uma vantagem seletiva de pneumococos NVT após imunização com PCV13. É importante ressaltar que a imunização com a combinação de PspA1+PspA4+wP e PCV13 mostrou-se mais eficiente no controle tanto de isolados VT quanto de isolados NVT quando comparada com a vacinação apenas com PCV13, demonstrando potencial para uso de combinação vacinal como estratégia de proteção contra infecções causadas por pneumococo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETIFA, I. M.; ANTONIO, M.; OKOROMAH, C. A.; EBRUKE, C. *et al.* Pre-vaccination nasopharyngeal pneumococcal carriage in a Nigerian population: epidemiology and population biology. **PLoS One**, 7, n. 1, p. e30548, 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **J Immunol Methods**, 132, n. 2, p. 191-195, Sep 14 1990.

ANDRADE, A. L.; MINAMISAVA, R.; POLICENA, G.; CRISTO, E. B. *et al.* Evaluating the impact of PCV-10 on invasive pneumococcal disease in Brazil: A time-series analysis. **Hum Vaccin Immunother**, 12, n. 2, p. 285-292, 2016. Research Support, Non-U.S. Gov't.

ARNOLD, R. R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. **Infect Immun**, 28, n. 3, p. 893-898, Jun 1980.

AUSTRIAN, R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. **J Antimicrob Chemother**, 18 Suppl A, p. 35-45, Jul 1986.

BEALL, B.; GHERARDI, G.; FACKLAM, R. R.; HOLLINGSHEAD, S. K. Pneumococcal *pspA* sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones. **J Clin Microbiol**, 38, n. 10, p. 3663-3669, Oct 2000.

BLUESTONE, C. D. Pathogenesis of otitis media: role of eustachian tube. **Pediatr Infect Dis J**, 15, n. 4, p. 281-291, Apr 1996.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, 4, n. 3, p. 144-154, Mar 2004.

BRANDILEONE, M.-C. d. C.; ZANELLA, R. C.; ALMEIDA, S. C. G.; CASSIOLATO, A. P. *et al.* Long-term effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in children in Brazil. **Vaccine**, 37, n. 36, p. 5357-5363, 2019/08/23/ 2019.

BRANDILEONE, M. C.; ANDRADE, A. L.; TELES, E. M.; ZANELLA, R. 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**, 22, n. 29-30, p. 3890-3896, Sep 28 2004.

BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE, A. L.; DI FABIO, J. L.; GUERRA, M. L. *et al.* Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J Infect Dis**, 187, n. 8, p. 1206-1212, Apr 15 2003.

BRILES, D. E.; ADES, E.; PATON, J. C.; SAMPSON, J. S. *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**, 68, n. 2, p. 796-800, Feb 2000.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PATON, J. C.; ADES, E. W. *et al.* Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect Dis**, 188, n. 3, p. 339-348, Aug 1 2003.

BROOME, C. V.; FACKLAM, R. R. Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. **Rev Infect Dis**, 3, n. 2, p. 277-281, Mar-Apr 1981.

BROUWER, N.; DOLMAN, K. M.; VAN HOUDT, M.; STA, M. *et al.* Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. **J Immunol**, 180, n. 6, p. 4124-4132, Mar 15 2008.

BROWN, E. J.; HOSEA, S. W.; FRANK, M. M. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. **Rev Infect Dis**, 5 Suppl 4, p. S797-805, Sep-Oct 1983.

BRYANT, K. A.; BLOCK, S. L.; BAKER, S. A.; GRUBER, W. C. *et al.* Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatrics**, 125, n. 5, p. 866-875, May 2010.

CALIX, J. J.; PORAMBO, R. J.; BRADY, A. M.; LARSON, T. R. *et al.* Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. **J Biol Chem**, 287, n. 33, p. 27885-27894, Aug 10 2012.

CARO-AGUILAR, I.; INDRAWATI, L.; KAUFHOLD, R. M.; GAUNT, C. *et al.* Immunogenicity differences of a 15-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (PCV15) based on vaccine dose, route of immunization and mouse strain. **Vaccine**, 35, n. 6, p. 865-872, 2017/02/07/ 2017.

CENTRO DE CONTROLE DE DOENÇAS, C. **Global Pneumococcal Disease**. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/global.html>. Acesso em: 19, nov. 2019.

CHAPPLE, D. S.; MASON, D. J.; JOANNOU, C. L.; ODELL, E. W. *et al.* Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. **Infect Immun**, 66, n. 6, p. 2434-2440, Jun 1998.

CROUCHER, N. J.; FINKELSTEIN, J. A.; PELTON, S. I.; MITCHELL, P. K. *et al.* Population genomics of post-vaccine changes in pneumococcal epidemiology. **Nat Genet**, 45, n. 6, p. 656-663, May 5 2013.

CROUCHER, N. J.; HARRIS, S. R.; FRASER, C.; QUAIL, M. A. *et al.* Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. **Science**, 331, n. 6016, p. 430-434, Jan 28 2011.

CROUCHER, N. J.; LOCHEN, A.; BENTLEY, S. D. Pneumococcal Vaccines: Host Interactions, Population Dynamics, and Design Principles. **Annu Rev Microbiol**, 72, p. 521-549, Sep 8 2018.

DALIA, A. B.; STANDISH, A. J.; WEISER, J. N. Three surface exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, promote resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils. **Infect Immun**, 78, n. 5, p. 2108-2116, May 2010. Research Support, N.I.H., Extramural.

DARRIEUX, M.; MORENO, A. T.; FERREIRA, D. M.; PIMENTA, F. C. *et al.* Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J Med Microbiol**, 57, n. Pt 3, p. 273-278, Mar 2008.

DAWID, S.; ROCHE, A. M.; WEISER, J. N. The blp bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. **Infection and immunity**, 75, n. 1, p. 443-451, 2007.

DEL MAR GARCÍA-SUÁREZ, M.; VÁZQUEZ, F.; MÉNDEZ, F. J. *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 24, n. 8, p. 512-517, 2006/10/01/ 2006.

DOMINGUES, C. M. A. S.; VERANI, J. R.; MONTENEGRO RENOINER, E. I.; DE CUNTO BRANDILEONE, M. C. *et al.* Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2, n. 6, p. 464-471, 2014/06/01/ 2014.

ESPOSITO, S.; TANSEY, S.; THOMPSON, A.; RAZMPOUR, A. *et al.* Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to those of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine given as a three-dose series with

routine vaccines in healthy infants and toddlers. **Clin. Vaccine Immunol.**, 17, n. 6, p. 1017-1026, 2010.

FEIKIN, D. R.; KAGUCIA, E. W.; LOO, J. D.; LINK-GELLES, R. *et al.* Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. **PLoS Med**, 10, n. 9, p. e1001517, 2013.

FERREIRA, D. M.; OLIVEIRA, M. L.; MORENO, A. T.; HO, P. L. *et al.* Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microb Pathog**, 48, n. 6, p. 205-213, Jun 2010.

FITZWATER, S. P.; CHANDRAN, A.; SANTOSHAM, M.; JOHNSON, H. L. The worldwide impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatr Infect Dis J**, 31, n. 5, p. 501-508, May 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

FRAZAO, N.; BRITO-AVO, A.; SIMAS, C.; SALDANHA, J. *et al.* Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. **Pediatr Infect Dis J**, 24, n. 3, p. 243-252, Mar 2005.

FUKUYAMA, Y.; KING, J. D.; KATAOKA, K.; KOBAYASHI, R. *et al.* A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG oligodeoxynucleotide as nasal adjuvant elicits protective secretory-IgA immunity to *Streptococcus pneumoniae* in aged mice. **J Immunol**, 186, n. 4, p. 2454-2461, Feb 15 2011.

GAIVAO, M.; DIONISIO, F.; GJINI, E. Transmission Fitness in Co-colonization and the Persistence of Bacterial Pathogens. **Bull Math Biol**, 79, n. 9, p. 2068-2087, Sep 2017.

GENO, K. A.; GILBERT, G. L.; SONG, J. Y.; SKOVSTED, I. C. *et al.* Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. **Clin Microbiol Rev**, 28, n. 3, p. 871-899, Jul 2015.

GRANT, L. R.; O'BRIEN, S. E.; BURBIDGE, P.; HASTON, M. *et al.* Comparative immunogenicity of 7 and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines and the development of functional antibodies to cross-reactive serotypes. **PLoS one**, 8, n. 9, p. e74906, 2013.

GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. **J Hyg (Lond)**, 64, n. 2, p. 129-124, Jun 1966.

HABETS, M. N.; VAN SELM, S.; VAN DER GAAST-DE JONGH, C. E.; DIAVATOPOULOS, D. A. *et al.* A novel flow cytometry-based assay for the quantification of antibody-dependent pneumococcal agglutination. **PLoS One**, 12, n. 3, p. e0170884, 2017.

HEEG, C.; FRANKEN, C.; VAN DER LINDEN, M.; AL-LAHHAM, A. *et al.* Genetic diversity of pneumococcal surface protein A of *Streptococcus pneumoniae* meningitis in German children. **Vaccine**, 25, n. 6, p. 1030-1035, Jan 22 2007.

HEIDELBERGER, M.; AVERY, O. T. The Soluble Specific Substance of Pneumococcus. **J Exp Med**, 38, n. 1, p. 73-79, Jun 30 1923.

HICKS, L. A.; HARRISON, L. H.; FLANNERY, B.; HADLER, J. L. *et al.* Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. **J Infect Dis**, 196, n. 9, p. 1346-1354, Nov 1 2007.

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

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**, 11, n. 4 Suppl, p. S45-53, Apr 2005.

HUANG, S. S.; PLATT, R.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; PELTON, S. I. *et al.* Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. **Pediatrics**, 116, n. 3, p. e408-413, Sep 2005.

JANOFF, E. N.; RUBINS, J. B.; FASCHING, C.; CHARBONEAU, D. *et al.* Pneumococcal IgA1 protease subverts specific protection by human IgA1. **Mucosal Immunol**, 7, n. 2, p. 249-256, Mar 2014.

JEDRZEJAS, M. J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. **Microbiol Mol Biol Rev**, 65, n. 2, p. 187-207 ; first page, table of contents, Jun 2001.

JOCHEMS, S. P.; DE RUITER, K.; SOLÓRZANO, C.; VOSKAMP, A. *et al.* Innate and adaptive nasal mucosal immune responses following experimental human pneumococcal colonization. **The Journal of clinical investigation**, 129, n. 10, 2019.

JOCHEMS, S. P.; MARCON, F.; CARNIEL, B. F.; HOLLOWAY, M. *et al.* Inflammation induced by influenza virus impairs human innate immune control of pneumococcus. **Nature immunology**, 19, n. 12, p. 1299, 2018.

JOHANSSON, E. L.; WASSEN, L.; HOLMGREN, J.; JERTBORN, M. *et al.* Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. **Infect Immun**, 69, n. 12, p. 7481-7486, Dec 2001.

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**, 6, n. 4, p. 288-301, Apr 2008.

KÄYHTY, H.; AURANEN, K.; NOHYNEK, H.; DAGAN, R. *et al.* Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. **Expert Review of Vaccines**, 5, n. 5, p. 651-667, 2006/10/01 2006.

KIENINGER, D. M.; KUEPER, K.; STEUL, K.; JUERGENS, C. *et al.* Safety, tolerability, and immunologic noninferiority of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine given with routine pediatric vaccinations in Germany. **Vaccine**, 28, n. 25, p. 4192-4203, 2010.

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**, 177, n. 2, p. 368-377, Feb 1998.

KONO, M.; ZAFAR, M. A.; ZUNIGA, M.; ROCHE, A. M. *et al.* Single Cell Bottlenecks in the Pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS Pathog**, 12, n. 10, p. e1005887, Oct 2016.

KOZLOWSKI, P. A.; CU-UVIN, S.; NEUTRA, M. R.; FLANIGAN, T. P. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. **Infect Immun**, 65, n. 4, p. 1387-1394, Apr 1997.

KUIPERS, K.; DIAVATOPOULOS, D. A.; VAN OPZEELAND, F.; SIMONETTI, E. *et al.* Antigen-independent restriction of pneumococcal density by mucosal adjuvant cholera toxin subunit B. **The Journal of infectious diseases**, 214, n. 10, p. 1588-1596, 2016.

LEONARD, A.; LALK, M. Infection and metabolism – *Streptococcus pneumoniae* metabolism facing the host environment. **Cytokine**, 112, p. 75-86, 2018/12/01/ 2018.

LIMA, F. A.; MIYAJI, E. N.; QUINTILIO, W.; RAW, I. *et al.* Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice. **Vaccine**, 31, n. 20, p. 2465-2470, May 7 2013.

LINK-GELLES, R.; THOMAS, A.; LYNFIELD, R.; PETIT, S. *et al.* Geographic and Temporal Trends in Antimicrobial Nonsusceptibility in *Streptococcus pneumoniae* in the Post-vaccine era in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, 208, n. 8, p. 1266-1273, 2013.

LIPSITCH, M.; DYKES, J. K.; JOHNSON, S. E.; ADES, E. W. *et al.* Competition among *Streptococcus pneumoniae* for intranasal colonization in a mouse model. **Vaccine**, 18, n. 25, p. 2895-2901, 2000/06/15/ 2000.

LOUGHRAN, A. J.; ORIHUELA, C. J.; TUOMANEN, E. I. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. **Microbiol Spectr**, 7, n. 2, Mar 2019.

LYSENKO, E. S.; CLARKE, T. B.; SHCHEPETOV, M.; RATNER, A. J. *et al.* Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing. **PLoS Pathog**, 3, n. 8, p. e118, Aug 24 2007. Research Support, N.I.H., Extramural.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E.; JETT, B. D. **Primer to the Immune Response**. 2 ed ed. 2014 2014. 1-702 p.

MALLEY, R.; MORSE, S. C.; LEITE, L. C.; AREAS, A. P. M. *et al.* Multiserotype protection of mice against pneumococcal colonization of the nasopharynx and middle ear by killed nonencapsulated cells given intranasally with a nontoxic adjuvant. **Infection and immunity**, 72, n. 7, p. 4290-4292, 2004.

MALLEY, R.; TRZCINSKI, K.; SRIVASTAVA, A.; THOMPSON, C. M. *et al.* CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 13, p. 4848-4853, Mar 29 2005.

MATTHIAS, K. A.; ROCHE, A. M.; STANDISH, A. J.; SHCHEPETOV, M. *et al.* Neutrophil-toxin interactions promote antigen delivery and mucosal clearance of *Streptococcus pneumoniae*. **J Immunol**, 180, n. 9, p. 6246-6254, May 1 2008. Research Support, N.I.H., Extramural.

MCCOOL, T. L.; WEISER, J. N. Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. **Infect Immun**, 72, n. 10, p. 5807-5813, Oct 2004.

MESTECKY, J.; MORO, I.; KERR, M. A.; WOOF, J. M. Mucosal immunoglobulins. *In: Mucosal immunology*: Academic Press, 2005. p. 153-181.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. **Calendário Nacional de Vacinação**. 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/vacinacao/calendario-vacinacao>. Acesso em: 15 de outubro.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, 16, n. 5, p. 411-418, 2010/05/01/ 2010.

MITSI, E.; ROCHE, A. M.; REINE, J.; ZANGARI, T. *et al.* Agglutination by anti-capsular polysaccharide antibody is associated with protection against experimental human pneumococcal carriage. **Mucosal Immunol**, 10, n. 2, p. 385-394, Mar 2017.

MOOK-KANAMORI, B. B.; GELDHOFF, M.; VAN DER POLL, T.; VAN DE BEEK, D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. **Clin Microbiol Rev**, 24, n. 3, p. 557-591, Jul 2011.

MORENO, A. T.; OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, D. M.; HO, P. L. *et al.* Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clin Vaccine Immunol**, 17, n. 3, p. 439-446, Mar 2010.

MOSSER, J. F.; GRANT, L. R.; MILLAR, E. V.; WEATHERHOLTZ, R. C. *et al.* Nasopharyngeal carriage and transmission of Streptococcus pneumoniae in American Indian households after a decade of pneumococcal conjugate vaccine use. **PLoS One**, 9, n. 1, p. e79578, 2014.

MURPHY, T. F.; BAKALETZ, L. O.; SMEESTERS, P. R. Microbial interactions in the respiratory tract. **Pediatr Infect Dis J**, 28, n. 10 Suppl, p. S121-126, Oct 2009.

MUSHER, D. M. How contagious are common respiratory tract infections? **N Engl J Med**, 348, n. 13, p. 1256-1266, Mar 27 2003.

NABORS, G. S.; BRAUN, P. A.; HERRMANN, D. J.; HEISE, M. L. *et al.* Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. **Vaccine**, 18, n. 17, p. 1743-1754, 2000/03/06/ 2000.

NAHM, M. H.; LIN, J.; FINKELSTEIN, J. A.; PELTON, S. I. Increase in the prevalence of the newly discovered pneumococcal serotype 6C in the nasopharynx after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. **J Infect Dis**, 199, n. 3, p. 320-325, Feb 1 2009.

NELSON, A. L.; ROCHE, A. M.; GOULD, J. M.; CHIM, K. *et al.* Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. **Infection and immunity**, 75, n. 1, p. 83-90, 2007.

NOVAES, H. M.; SARTORI, A. M.; SOAREZ, P. C. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004 - 2006. **Rev Saude Publica**, 45, n. 3, p. 539-547, Jun 2011.

O'BRIEN, K. L.; WOLFSON, L. J.; WATT, J. P.; HENKLE, E. *et al.* Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, 374, n. 9693, p. 893-902, Sep 12 2009.

OGUNNIYI, A. D.; FOLLAND, R. L.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K. *et al.* Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 68, n. 5, p. 3028-3033, May 2000.

OGUNNIYI, A. D.; PATON, J. C. Vaccine potential of pneumococcal proteins. *In: Streptococcus pneumoniae*: Elsevier, 2015. p. 59-78.

OLIVEIRA, M. L.; MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; MORENO, A. T. *et al.* Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. **PLoS One**, 5, n. 5, p. e10863, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, O. **Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age 2008**. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, O. **The top 10 causes of death**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 06 nov 2019.

PELTON, S. I.; DAGAN, R.; GAINES, B. M.; KLUGMAN, K. P. *et al.* Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **Vaccine**, 21, n. 15, p. 1562-1571, Apr 2 2003.

PESSOA, D.; HOTI, F.; SYRJANEN, R.; SA-LEAO, R. *et al.* Comparative analysis of *Streptococcus pneumoniae* transmission in Portuguese and Finnish day-care centres. **BMC Infect Dis**, 13, p. 180, Apr 18 2013.

PRYMULA, R.; PEETERS, P.; CHROBOK, V.; KRIZ, P. *et al.* Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. **Lancet**, 367, n. 9512, p. 740-748, Mar 4 2006.

PRYMULA, R.; SCHUERMAN, L. 10-valent pneumococcal nontypeable Haemophilus influenzae PD conjugate vaccine: Synflorix. **Expert Rev Vaccines**, 8, n. 11, p. 1479-1500, Nov 2009.

REN, B.; SZALAI, A. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. **Infect Immun**, 72, n. 1, p. 114-122, Jan 2004.

REN, B.; SZALAI, A. J.; THOMAS, O.; HOLLINGSHEAD, S. K. *et al.* Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of Streptococcus pneumoniae. **Infect Immun**, 71, n. 1, p. 75-85, Jan 2003.

RICHTER, S. S.; HEILMANN, K. P.; DOHRN, C. L.; RIAHI, F. *et al.* Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999-2011(1.). **Emerg Infect Dis**, 19, n. 7, p. 1074-1083, Jul 2013.

ROBBINS, J. B.; AUSTRIAN, R.; LEE, C. J.; RASTOGI, S. C. *et al.* Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. **J Infect Dis**, 148, n. 6, p. 1136-1159, Dec 1983.

ROCA, A.; SIGAUQUE, B.; QUINTÓ, L.; MANDOMANDO, I. *et al.* Invasive pneumococcal disease in children < 5 years of age in rural Mozambique. **Tropical Medicine & International Health**, 11, n. 9, p. 1422-1431, 2006.

ROCHE, A. M.; RICHARD, A. L.; RAHKOLA, J. T.; JANOFF, E. N. *et al.* Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination. **Mucosal Immunol**, 8, n. 1, p. 176-185, Jan 2015.

SÁ-LEÃO, R.; TOMASZ, A. Streptococcus Pneumoniae Evolving – Impact of Antibiotics and Vaccines☆. *In*: SCHMIDT, T. M. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)**. Oxford: Academic Press, 2019. p. 321-333.

SCOTT, D. A.; KOMJATHY, S. F.; HU, B. T.; BAKER, S. *et al.* Phase 1 trial of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. **Vaccine**, Jun 26 2007.

SHAK, J. R.; VIDAL, J. E.; KLUGMAN, K. P. Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. **Trends in Microbiology**, 21, n. 3, p. 129-135, 2013/03/01/ 2013.

SHAPER, M.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BENJAMIN, W. H., Jr.; BRILES, D. E. PspA protects Streptococcus pneumoniae from killing by apolactoferrin, and antibody to

PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. **Infect Immun**, 72, n. 9, p. 5031-5040, Sep 2004.

SONG, J. Y.; MOSELEY, M. A.; BURTON, R. L.; NAHM, M. H. Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody. **J Infect Chemother**, 19, n. 3, p. 412-425, Jun 2013.

TEODOROWICZ, M.; PERDIJK, O.; VERHOEK, I.; GOVERS, C. *et al.* Optimized Triton X-114 assisted lipopolysaccharide (LPS) removal method reveals the immunomodulatory effect of food proteins. **PLoS One**, 12, n. 3, p. e0173778, 2017.

TIGOI, C. C.; GATAKAA, H.; KARANI, A.; MUGO, D. *et al.* Rates of acquisition of pneumococcal colonization and transmission probabilities, by serotype, among newborn infants in Kilifi District, Kenya. **Clin Infect Dis**, 55, n. 2, p. 180-188, Jul 2012.

TOCHEVA, A. S.; JEFFERIES, J. M.; CHRISTODOULIDES, M.; FAUST, S. N. *et al.* Increase in serotype 6C pneumococcal carriage, United Kingdom. **Emerg Infect Dis**, 16, n. 1, p. 154-155, Jan 2010.

TOSTES, R. O.; RODRIGUES, T. C.; DA SILVA, J. B.; SCHANOSKI, A. S. *et al.* Protection Elicited by Nasal Immunization with Recombinant Pneumococcal Surface Protein A (rPspA) Adjuvanted with Whole-Cell Pertussis Vaccine (wP) against Co-Colonization of Mice with *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS One**, 12, n. 1, p. e0170157, 2017.

TROEGER, C.; FOROUZANFAR, M.; RAO, P. C.; KHALIL, I. *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Infectious Diseases**, 17, n. 11, p. 1133-1161, 2017/11/01/ 2017.

TRZCINSKI, K.; LI, Y.; WEINBERGER, D. M.; THOMPSON, C. M. *et al.* Effect of Serotype on Pneumococcal Competition in a Mouse Colonization Model. **MBio**, 6, n. 5, p. e00902-00915, 2015.

TU, A. H.; FULGHAM, R. L.; MCCRORY, M. A.; BRILES, D. E. *et al.* Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 67, n. 9, p. 4720-4724, Sep 1999.

TURNER, P.; HINDS, J.; TURNER, C.; JANKHOT, A. *et al.* Improved detection of nasopharyngeal cocolonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray. **J Clin Microbiol**, 49, n. 5, p. 1784-1789, May 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't.

WAHL, B.; O'BRIEN, K. L.; GREENBAUM, A.; MAJUMDER, A. *et al.* Burden of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. **The Lancet Global Health**, 6, n. 7, p. e744-e757, 2018.

WEINBERGER, D. M.; BRUDEN, D. T.; GRANT, L. R.; LIPSITCH, M. *et al.* Using Pneumococcal Carriage Data to Monitor Postvaccination Changes in Invasive Disease. **American Journal of Epidemiology**, 178, n. 9, p. 1488-1495, 2013.

WEINBERGER, D. M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, 378, n. 9807, p. 1962-1973, Dec 3 2011.

WEISER, J. N.; AUSTRIAN, R.; SREENIVASAN, P. K.; MASURE, H. R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. **Infect Immun**, 62, n. 6, p. 2582-2589, Jun 1994.

WIJMENGA-MONSUUR, A. J.; VAN WESTEN, E.; KNOL, M. J.; JONGERIUS, R. M. *et al.* Direct comparison of immunogenicity induced by 10-or 13-valent pneumococcal conjugate vaccine around the 11-month booster in Dutch infants. **PLoS one**, 10, n. 12, p. e0144739, 2015.

WYLLIE, A. L.; CHU, M. L.; SCHELLENS, M. H.; VAN ENGELSDORP GASTELAARS, J. *et al.* Streptococcus pneumoniae in saliva of Dutch primary school children. **PLoS One**, 9, n. 7, p. e102045, 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

YOTHER, J.; BRILES, D. E. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, as revealed by sequence analysis. **J Bacteriol**, 174, n. 2, p. 601-609, Jan 1992.

ZHANG, Z.; CLARKE, T. B.; WEISER, J. N. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. **J Clin Invest**, 119, n. 7, p. 1899-1909, Jul 2009.