Luciana S. C Oliveira^a, Fátima Ribeiro Dias ^a, Maria Cristina C. Brandileone^b, Eliane N. Miyaji^c, Luciana C. C. Leite^c, Ana Lucia S.S. Andrade^a, Fabiana C. Pimenta^a. *Streptococcus pneumoniae* isolados de líquor, sangue e nasofaringe de crianças com meningites pneumocócicas: suscetibilidade, sorotipos e seqüência de PspA. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. *Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica* [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

***Streptococcus pneumoniae* isolados de líquor, sangue e nasofaringe de crianças com meningites pneumocócicas: suscetibilidade, sorotipos e seqüência de PspA**

Luciana S. C Oliveira^a, Fátima Ribeiro Dias ^a, Maria Cristina C. Brandileone^b, Eliane N. Miyaji^c, Luciana C. C. Leite^c, Ana Lucia S.S. Andrade^a, Fabiana C. Pimenta^a

a Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Tropical, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brasil

b Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL)

c Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, Meningite pneumocócica, PSpA

Introdução

Meningite bacteriana aguda é uma causa importante de morbidade e mortalidade entre crianças com menos de cinco anos de idade. *Streptococcus pneumoniae* é uma das causas mais importantes de meningites bacterianas nos países em desenvolvimento (Mulholland et al 1999, Laval et al 2003). Vacinas pneumocócicas conjugadas compostas de 7 a 11 polissacarídeos ligados a proteínas carreadoras foram recentemente licenciadas (WHO 1999). Di Fabio et al. (2001) estimaram uma cobertura de 64,4% para os sorotipos mais freqüentes nas meningites devido ao uso da vacina conjugada heptavalente no Brasil. Resultados similares foram reportados por Brandileone et al. (2003), que relataram que a vacina 7-valente cobriria 61% dos sorotipos mais prevalentes associados a meningites no Brasil em crianças com menos de 2 anos de idade. Porém essas novas vacinas são caras, não podem ser administrada antes de 2 meses de idade, e não cobrem todos os sorotipos capsulares patogênicos de pneumococos (Baril et al 2004).

Uma alternativa para as vacinas conjugadas seria o uso de antígenos protéicos que são expressos na maioria dos pneumococos. Entre as proteínas pneumocócicas identificadas como potenciais antígenos vacinas, a proteína pneumocócica de superfície A (PspA) e a adesina pneumocócica de superfície A (PsaA) são candidatas promissoras a vacinas (Jedrzejewski 2001). PspA tem variabilidade antigênica e estrutural entre diferentes cepas com tamanhos de 60 a 100 Kda, inibi a ativação de complemento e está presente em todas as cepas clinicamente importantes (Crain et al 1990, Tu et al 1999). Imunização passiva com anticorpos anti- PspA ou imunização ativa com purificado de PspA tem apresentado proteção em camundongos. Hollingshead et al (2000) propuseram uma classificação para PspA baseada na divergência da seqüência de aminoácidos localizados antes da rica região prolinha, aproximadamente 100 aminoácidos designados região de definição do clado (RCD) que contém epítomos de proteção cruzada. Essa classificação divide a PspA dentro de 3 famílias: família 1, composta de clados 1 e 2; família 2, composta de clados 3, 4 e 5; e família 3, raramente isolada e composta de clado 6. Seqüência de DNA do gene da *pspA* de diferentes isolados tem demonstrado uma estrutura mosaica complexa. PspA do mesmo clado possuem uma similaridade de aproximadamente 80% dos aminoácidos. Estas famílias de PspA e clado podem ser identificadas por antisoro policlonal PspA e por primers específicos de família de PspA na reação da polimerase (Coral et al 2001).

Imunização de humanos com um único fragmento recombinante de PspA induziu a produção de

anticorpos protetores. Miyaji et al (2002) construíram vacina de DNA com diferentes fragmentos de PspA pertencentes aos clados 1, 2, 3 e 4 e analisaram a reatividade cruzada de anticorpos anti-PspA e a proteção. Animais imunizados com vacinas de DNA expressando as regiões completas N-terminal de fragmentos de PspA foram protegidos quando desafiados com cepas expressando PspA de mesmo clado.

Brandileone et al. (2004) investigaram a frequência de família 1 (Fam 1) e família 2 (Fam 2) de PspA entre proteínas de *S. pneumoniae* recuperados de vigilância em andamento no Brasil. Fam 1 e Fam 2 foram expressas entre 366 isolados em ratos comparáveis, com a cobertura potencial de 94,3% das 64 cepas de pneumococos dos Estados Unidos, Canadá, Europa e Colômbia, 97% expressaram famílias 1 e 2 (Hollingshead et al 2000, Vela Coral et al 2001). Mollerach et al (2004) observaram que de 149 isolados de *S. pneumoniae* da Argentina, 54,4% foram família 1, 41,6% foram família 2. Informação de vigilância pneumocócica mostrou uma associação de Fam 2 com pneumococo resistente a penicilina (Beall et al 2000, Dicuonzo et al 2002, Brandileone et al 2004). Ao longo dos anos conhecimento substancial tem sido acumulado no campo da imunologia de proteína PspA e tipagem de clado. Para avaliar a conveniência do uso da PspA em vacinas é primariamente necessário identificar a prevalência da família e diversidade genética do clado entre *S. pneumoniae* isolados de doença invasiva e portador. Neste estudo foi investigado a suscetibilidade, sorotipos e seqüência de PspA pneumocócica isolados simultaneamente de nasofaringe, sangue e líquido de crianças com meningites pneumocócicas.

Materiais e Métodos

Crianças admitidas no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia com suspeita de meningite. Amostras de líquido, sangue e nasofaringe foram coletadas após consentimento dos responsáveis. As amostras de líquido, sangue e nasofaringe foram processadas de acordo com procedimentos padrão e diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS 1994). Pneumococos foram identificados pelos aspectos coloniais típicos, alfa-hemólise, suscetibilidade a optoquina e solubilidade em bile. O teste de suscetibilidade foi realizado pelo método de difusão em disco. Isolados de pneumococo foram sorotipados pela reação de Quellung com soro produzido pelo Statens Seruminstitute, Copenhagen, Dinamarca e realizados no Instituto Adolfo Lutz, centro de referência nacional para *S. pneumoniae* localizado em São Paulo, Brasil. Tipagem da PspA foi investigada no Instituto Butantan.

Identificação de famílias de PspA por ensaio de PCR

A suspensão de DNA de isolados de pneumococos, foi preparada transferindo colônias de cultura de 24 horas de placa de agar sangue para 200µL de meio líquido de Todd-Hewitt contendo 0,5% de extrato de leveduras. Essa suspensão foi estocada a -20 até o teste. DNA de cepa padrão RX1 (clado 1) e BG11703 (clado 4) foi usado como controle para Fam1 e Fam2, respectivamente, em cada grupo de reações de PCR. O PCR foi realizado empregando primers de oligonucleotídeos sintetizados com base na seqüência de DNA publicada para Fam1 de PspA, LSM12/SKH52 (Coral et al.). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese e a leitura feita em comparação com o peso molecular de cada produto da PCR com aqueles encontrados no controle padrão de DNA para Fam1 (0,9kDa) e Fam2 (1,1kDa).

Outra PCR foi realizada com primers de oligonucleotídeo LSM12/SKH2 para a realização do sequenciamento (Hollingshead et al 2000). Os produtos da PCR foram purificados de géis de agarose para sequenciamento direto usando SKH2 como primer. O sequenciamento foi realizado no Prisma-ABI (PE Applied Biosystems).

Resultados

Tabela 1: Caracterização de *Streptococcus pneumoniae* isolados simultaneamente de líquido, sangue e nasofaringe de crianças com meningites pneumocócicas: suscetibilidade, sorotipos, famílias e clados de PspA

Caso (paciente)	Origem de <i>S. pneumoniae</i>	Suscetibilidade Penicilina	Sorotipos capsulares	Família PspA	Clado
M11	LCR	S	9V	2	3
	Sangue	S	9V		
	NF	S	9V	2	3
M12	LCR		6B	1	1
	Sangue		6B		
	NF		6B		
M21	LCR	S	14	2	3
	NF	S	14	2	3
M23	LCR		14	1	
	Sangue		14	1	
M36	LCR		6B	1	
	NF		6B	1	
M98	LCR	R	23F	1	1
	Sangue	R	23B	2	5

LCR: líquido céfalo raquidiano, NF: nasofaringe, S: suscetibilidade, R: não suscetível

Referências

Beall B, Gherardi G, Facklam RR, Hollingshead SK. Pneumococcal pspA sequence types of the prevalent multi-resistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones. *J Clin Microbiol* 2000;38:3663–9.

Brandileone M.C., Andrade A.L.S.S., DiFabio J.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* 2003;187:1206-12.

Brandileone , M.C.C., Andrade, A.L.S.S., Teles, E.M., Zanella, R.C., Yara, T.I., DiFabio, J.D., Hollingshead, S.K. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. *Vaccine* (in press)

Briles, D. E., J. D. King, M. A. Gray, L. S. McDaniel, E. Swiatlo, and K. A. Benton. 1996. PspA, a protection-eliciting protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine* 14:858–867.

Briles, D. E., S. K. Hollingshead, J. King, A. Swift, P. A. Braun, M. K. Park, L. M. Ferguson, M.

H. Nahm, and G. S. Nabors. 2000. Immunizations of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J. Infect. Dis.* 182:1694–1701.

Crain, M. J., W. D. Waltman II, J. S. Turner, J. Yother, D. F. Talkington, L. S. McDaniel, B. M. Gray, and D. E. Briles. 1990. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 58:3293–3299.

Di Fabio J.L., Castaneda E., Agudelo C.I., et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:959-67.

Dicuonzo G, Gherardi G, Gertz RE, et al. Genotypes of invasive pneumococcal isolates recently recovered from Italian patients. *J Clin Microbiol* 2002;40(10):3660–5.

Hammerschmidt, S., G. Bethe, P. H. Remane, and G. S. Chhatwal. 1999. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 67:1683–1687.

Hausdorff W. Haemophilus, meningococcus and pneumococcus: Comparative epidemiologic patterns of disease. *Int J Clin Pract Suppl* 2001;(118):2-4.

Hollingshead, S. K., R. Becker, and D. E. Briles. 2000. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68:5889–5900.

Jedrzejewski M. Pneumococcal virulence factors: structure and functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65(2):187–207.

Laval, C.A.B., Pimenta, F.C., Andrade, J.G., Andrade, S.S., Andrade, A.L.S.S. Progress Towards Meningitis Prevention in the Conjugate Vaccines Era. *Br J Infect Dis* 2003;7(5):315-324.

McDaniel, L. S., J. S. Sheffield, P. Delucchi, and D. E. Briles. 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect. Immun.* 59:222–228.

Miyaji, E.N., Dias, W.O., Gamberini, M., Gebara, V.C.B.C., Schenkman, R.P.F., Wild, J., Riedl, P., Reimann, J., Schirmbeck, R., Leite, L.C.C. PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccines induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 2002a, 20: 805–812

Miyaji, E.N., Ferreira, D.M., Lopes, A.P.Y., Brandileone, M.C.C., Dias, W.O., Leite, L.C.C. Analysis of Serum Cross-Reactivity and Cross-Protection Elicited by Immunization with DNA Vaccines against *Streptococcus pneumoniae* Expressing PspA Fragments from Different Clades.

Infect. Immun.70:5086-5090, 2002b.

Mollerach, M., Regueira, M., Bonofiglio, L., Callejo, R., pace, J., Di Fabio, J.L., Hollingshead, S., Briles, D. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. Epidemiol. Infect. 2004, 132, 177–184.

Morrison KE, Lake D, Crook J, Carlone GM, Ades E, Faccklam R, et al. Confirmation of psaA in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. J Clin Microbiol 2000;38:434–7.

Mulholland K, Levine O, Nohynek H, Greenwood BM. Evaluation of vaccines for the prevention of pneumonia in children in developing countries. Epidemiol Rev 1999; 21:43–55.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Methods for dilution, antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

Tu, A. T., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles, and A. J. Szalai. 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 67:4720–4724.

Vela Coral MC, Fonseca N, Castaneda E, Di Fabio JL, Hollingshead SK, Briles DE. Pneumococcal surface protein A of invasive isolates from Colombian children. Emerg Infect Dis 2001; 7: 832–836.

World Health Organization. 1999. Pneumococcal vaccines. Wkly. Epidemiol. Rec. 74:177–184.

World Health Organization. 1994. Manual for the national surveillance of antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* and *H. influenzae*: epidemiological and microbiological methods. Programme for the Control of Acute Respiratory Infections. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga. [Online.]. http://www.who.int/child-adolescent-health/New_Publications/CHILD_HEALTH/bact.htm.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq

Bolsista de pós-graduação em Medicina Tropical. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP - Laboratório de Bacteriologia, luciannacruz@ig.com.br

Orientador/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG, pimenta@hotmail.com