

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Josiane Trevisol Leal

**Comparação do Perfil de Virulência
de *Streptococcus pneumoniae*
Pertencentes ao Sorotipo “Não-
Vacinal” 19A Isolados de Portadores
e de Doença Pneumocócica Invasiva**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2021

Josiane Trevisol Leal

**Comparação do Perfil de Virulência de
Streptococcus pneumoniae
pertencentes ao Sorotipo “Não-
Vacinal” 19A Isolados de Portadores e
de Doença Pneumocócica Invasiva**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Cícero Armídio Gomes Dias
Coorientadoras: Dra. Danielle da Silva Trentin
Dra. Muriel Primon de Barros

**Porto Alegre
2021**

Catálogo na Publicação

Trevisol Leal, Josiane

Comparação do Perfil de Virulência de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes ao Sorotipo "Não-Vacinal" 19A Isolados de Portadores e de Doença Pneumocócica Invasiva / Josiane Trevisol Leal. -- 2021.

97 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.

Orientador(a): Cícero Armídio Gomes Dias ;
coorientador(a): Danielle da Silva Trentin , Muriel
Primon de Barros.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Sorotipo 19A. 3. Virulência. 4. *Galleria mellonella*. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Josiane Trevisol Leal

**Comparação do Perfil de Virulência de *Streptococcus pneumoniae*
pertencentes ao Sorotipo “Não-Vacinal” 19A Isolados de Portadores e de
Doença Pneumocócica Invasiva**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Porto Alegre, ____ de _____ de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Adriana Seixas (UFCSPA/PPG-CS)

Laura Maria Andrade de Oliveira (UFRJ)

Karine Rigon Zimmer (UFCSPA)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), sendo financiado pelos seguintes órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq / Brasil - Bolsa Universal 443150 / 2014-1 e Bolsa individual – processo 88887.597507/2021-00), pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS / Brasil - Bolsa PRONEM 1871- 25511 / 13-4 e Edital FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017 – PPSUS – processo 17/1453-7), e também pelo programa de desenvolvimento para realização de projetos de pesquisa da UFCSPA (Edital nº 07/2020 / PROPPG).

DEDICATÓRIA

*Às mulheres mais especiais da minha vida:
mãe, vó e dinda (in memoriam).
Minhas maiores incentivadoras, cada uma a
seu jeito me moldaram e me fizeram acreditar
nos meus sonhos, fazendo tudo isso ser
possível.
O amor de vocês me faz grande.*

AGRADECIMENTOS

A minha caminhada como mestranda na UFCSPA foi incrível! O que eu cresci e aprendi dentro desse lugar superaram toda e qualquer expectativa minha. No entanto, tiveram algumas peças essenciais que contribuíram com o brilho nos meus olhos ao contar do meu projeto e me apaixonar um pouquinho mais pelo mundo da microbiologia. Por isso meu agradecimento especial são a essas pessoas:

Começando pelo professor Cícero, que aceitou fazer reunião com uma desconhecida que enviou e-mail para ele querendo ser aluna especial de mestrado.

Professor Cícero, muito obrigada por ter aceitado esse desafio junto comigo e ter confiado no meu trabalho, foste a peça principal do início dessa parceria e admiração pela UFCSPA. A porta que você abriu para mim foi consequência da abertura de várias outras que eu nem imaginava que poderiam ser abertas, como a realização do sonho de fazer um intercâmbio no exterior e, como se já não bastasse, também ganhamos um prêmio que vai me levar para os Estados Unidos. Além disso tudo, do início ao fim me passou paz e confiança, me fazendo acreditar que eu daria conta sim.

Dani, o que tu me fizeste crescer foi incrível! Tu nasceste para ser pesquisadora e professora, tu sabes fazer a gente pensar, sair fora da caixinha, sabe abrir espaços que dão oportunidade a nossa criatividade. O Bacmea é um presente que tu me deste, mesmo sendo “apenas” minha co-orientadora tu me adotaste para fazer parte do grupo e eu acolhi com todo amor do mundo, porque dentro dele, além de ter tido as experiências acadêmicas, eu conheci pessoas maravilhosas e com elas eu criei um laço que possivelmente vai ser para a vida inteira. O amor que tu colocas em cima das coisas que tu fazes muda o mundo!

E falando em Bacmea... Andressa, Thayna e Helber, que quarteto nós formamos hein?! Tantas risadas, tanto conhecimento compartilhado, tanto carinho. O stress que as vezes toma conta foi mais leve porque seguramos uma a mão do outro. Obrigada por terem feito parte dessa caminhada comigo!

Muri, eu já falei mil vezes que tu foste meu anjo e eu vou continuar repetindo, porque sério o que tu fizeste por mim não tem preço. Tu sentaste comigo e pensou em cada detalhe dos protocolos, dos experimentos, de material que precisava, foi minha parceira de almoço, foi pra UFCSPA em finais de semana que eu não podia. Tu pegaste na minha mão do início ao fim e não soltou! E, além disso tudo, também virou minha amiga, me influenciou a ter um novo hobbie (patinar), me lembra sempre de não desistir dos meus sonhos e tem um coração lindo. Eu sou muito, muito por grata por ter te conhecido.

Amandinha, a tua mãozinha nos experimentos foi essencial! Eu desfrutei do momento de te ensinar e de aprender contigo também. Eu tenho certeza que a tua dedicação nesse início de caminhada na pesquisa ainda vai gerar bons frutos.

Kauana, talvez tu não lembres, mas tu foste a primeira pessoa que eu tive contato na UFCSPA, enquanto eu estava fazendo minha matrícula ainda, nem sabíamos ainda que ambas eram alunas do professor Cícero, e nem que tu me ajudarias tanto no desenho e compra de primers, comitê de ética. Além claro, de ter feito um trabalho imenso de coleta das amostras. Muito obrigada!

Um agradecimento especial também à Mari, por todo suporte com a extração de DNA e sorotipagem das amostras e à Grasi pelo sequenciamento. Vocês também fazem parte desses resultados!

E claro, por último, mas, não menos importante, minha família, os amores da minha vida. Pessoas essas que não entram em cena, mas estão por trás da cortina dando todo suporte, incentivando e cuidando. Ao mesmo tempo, que também estão na plateia, parabenizando, aplaudindo e nos dando força o suficiente para continuar. Minha mãe não mede esforços para me amar, tem amor nas minhas roupas que ela lava, para eu poder ter um pouco mais de tempo para estudar, ou na marmita que eu sempre levo para casa com cheiro de lar e aconchego. Minha vó é uma fortaleza, ela pode não entender muito de ciência, mas dá uma aula de força e resiliência que é de se admirar, com ela aprendi tanta coisa que universidade nenhuma poderia ensinar. O Lu, biologicamente é meu primo, mas de coração e criação é meu irmão, estar com ele é risada na certa, toda vez que olho para ele lembro que a maior forma de ensinar alguém é através do exemplo e é por ele que também me dedico todos os dias. E a Fran, minha parceira de vida e melhor amiga, muito obrigada por ter aguentado e acalmado todos os meus “surtos”, pelos chazinhos antes de dormir, pelo aconchego e por me ajudar a me desenvolver de todas as formas possíveis, pessoalmente, academicamente e profissionalmente, eu tenho muita sorte de ter!

*“Para cada célula humana em nosso organismo, há outras nove impostoras, pegando carona. Você não é formado apenas de carne e osso, sangue e músculo, mas também de bactérias e fungos. Não é um indivíduo, mas uma colônia – um ecossistema. Somos apenas 10% humano”.
Alanna Collen.*

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno respiratório, responsável por cerca de meio milhão de mortes por ano em crianças menores de 5 anos. Pode pertencer a microbiota da nasofaringe humana sem causar doença, mas também pode se tornar um agente infeccioso ao alcançar sítios normalmente estéreis. As vacinas disponíveis atualmente têm como alvo a cápsula do pneumococo. No entanto, com a existência de pelo menos 100 sorotipos capsulares distintos, estão limitadas a um baixo número de sorotipos, levando ao aumento da doença causada por sorotipos não vacinais. Muitas proteínas, que estão alocadas na superfície de *S. pneumoniae*, desempenham um papel importante na virulência e estão sendo consideradas como futuros alvos de vacinas. Neste estudo, selecionamos 14 genes que codificam para proteínas de virulência de *S. pneumoniae*, candidatos a vacinas de próxima geração, e comparamos a prevalência entre 11 isolados portadores saudáveis (P) e 11 de doença pneumocócica invasiva (DPI). Ambos com foco particular no sorotipo 19A - emergente em várias partes do mundo e associado à resistência aos antimicrobianos. A análise individual dos isolados mostrou-se com perfil de virulência distinto, genes presentes em alguns isolados estavam ausentes em outros. No entanto, a proporção total dos genes de virulência foi semelhante entre estes dois grupos ($p > 0,05$), com uma presença de 100% dos genes *lytA*, *nanB*, *pavA*, *pcpA*, *phtA*, *phtB*, *phtE*, pilus-1 e pilus-2 em todos isolados, sugeridos como bons candidatos a vacina de próxima geração, indicando que a inibição destes alvos poderia impactar de forma abrangente no controle de pneumococos. Já os genes *nanA* (9%), *phtD* (95,4%), *pspA* (86,3%), *pspA-fam1* (86,3%) e *pspC* (59%), apresentaram uma menor prevalência. Para que pudéssemos estudar as diferenças de virulência entre estes isolados clínicos, utilizamos um modelo animal alternativo de infecção: Larvas de *Galleria mellonella*. No geral, isolados de DPI mostraram-se mais virulentos que de P (Média DL_{50} : $9,8 \times 10^4$ UFC/larva versus $3,2 \times 10^5$ UFC/larva = $p < 0,01$), no modelo *in vivo*, mesmo quando seu perfil de virulência era igual a algum isolado de P ou quando apresentavam ausência de *nanA*, *pspA*, *pspA-fam 1* e *pspC*. Isto, além de validar o modelo, sugere que os genes de virulência possam ser expressos de maneira diferencial em relação aos isolados de P e/ou que outros genes de virulência, não avaliados neste estudo, possam ter papel fundamental na patogenicidade dos pneumococos. Até o momento, este é o primeiro relato utilizando isolados clínicos de *S. pneumoniae* e ensaios de virulência utilizando o modelo *in vivo* de *G. mellonella*. O valor de LD50 dos isolados invasivos é substancialmente inferior ao dos isolados colonizadores, significando que o modelo de *G. mellonella* para avaliação preliminar de isolados de pneumococos é uma ferramenta crucial.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, sorotipo 19A, virulência, *Galleria mellonella*

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is an important respiratory pathogen, responsible for about half a million deaths per year in children under 5 years of age. It may belong to the human nasopharyngeal microbiota without causing disease, but it can also become an infectious agent when reaching normally sterile sites. Currently available vaccines target the pneumococcus capsule. However, with the existence of at least 100 distinct capsular serotypes, they are limited to a low number of serotypes, leading to an increase in disease caused by non-vaccine serotypes. Many proteins, which are located on the surface of *S. pneumoniae*, play an important role in virulence and are being considered as future vaccine targets. In this study, we selected 14 genes encoding virulence proteins from *S. pneumoniae*, candidates for next-generation vaccines, and compared the prevalence between 11 healthy carriers (HC) and 11 invasive pneumococcal disease (IPD) isolates. Both with particular focus on serotype 19A - emerging in various parts of the world and associated with antimicrobial resistance. The individual analysis of the isolates showed a distinct virulence profile, genes present in some isolates were absent in others. However, the total proportion of virulence genes was similar between these two groups (p value > 0.05), with a presence of 100% of the genes *lytA*, *nanB*, *pavA*, *pcpA*, *phtA*, *phtB*, *phtE*, pilus-1 and pilus-2 in all isolates, suggested as good candidates for next-generation vaccine, indicating that inhibition of these targets could have a comprehensive impact on pneumococcal control. The *nanA* (9%), *phtD* (95.4%), *pspA* (86.3%), *pspA-fam1* (86.3%) and *pspC* (59%) genes had a lower prevalence. In order to study the differences in virulence between these clinical isolates, we used an alternative animal model of infection: *Galleria mellonella* larvae. In general, DPI isolates were more virulent than HC (Mean LD₅₀ 9.8×10^4 CFU/larva versus 3.2×10^5 CFU/larva = p value < 0.01), in the *in vivo* model, even when their virulence profile was the same as any HC isolate or when they lacked *nanA*, *pspA*, *pspA-fam 1* and *pspC*. This, in addition to validating the model, suggests that virulence genes may be differentially expressed in relation to P isolates and/or that other virulence genes, not evaluated in this study, may have a fundamental role in the pathogenicity of pneumococci. To date, this is the first report using clinical isolates of *S. pneumoniae* and virulence assays using the *in vivo* model of *G. mellonella*. The LD50 value of invasive isolates is substantially lower than that of colonizing isolates, meaning that the *G. mellonella* model for preliminary evaluation of pneumococcal isolates is a crucial tool.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, serotype 19A, virulence, *Galleria mellonella*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1 - Representação esquemática da superfície celular pneumocócica	22
FIGURA 2 - Ciclo biológico de <i>Galleria mellonella</i>	35

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1 – <i>In vivo</i> <i>S. pneumoniae</i> virulence assay.....	56
FIGURE 2 – Kaplan-Meier survival curves of <i>G. mellonella</i> larvae infected with clinical isolates and laboratory strains of <i>S. pneumoniae</i> isolates at different concentrations or vehicle (PBS).....	59

MATERIAL SUPLEMENTAR DO ARTIGO CIENTÍFICO

Figura S1 - Bacterial burden in the <i>G. mellonella</i> during infection with <i>S. pneumoniae</i> strain R6.....	69
--	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

TABELA 1 - Resumo das vacinas licenciadas e grupos aptos a receber o imunizante.....	24
TABELA 2 - Função das proteínas de superfície de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31

ARTIGO CIENTÍFICO

TABLE 1 - Virulence genes profile in serotype 19A <i>S. pneumoniae</i> isolates.....	57
TABLE 2 – The distribution of virulence genes among HC and IPD groups. Each group is composed by 11 pneumococcal isolates.....	58
TABLE 3 – <i>In vivo</i> virulence determined through LD ₅₀ values from <i>Galleria mellonella</i> larvae assays.....	60
TABLE 4 - General comparison of LD50 (CFU / larva) between the group of HC and IPC isolates.....	60
TABLE 5 - Comparison between presence of virulence genes in <i>S. pneumoniae</i> isolates and the <i>in vivo</i> virulence determined through LD50 values from <i>Galleria mellonella</i> larvae assays.....	60

MATERIAL SUPLEMENTAR DO ARTIGO CIENTÍFICO

TABLE S1 - Details of PCR conditions for each pneumococcal virulence gene.....	70
TABLE S2 - Comparative analysis about studies that evaluated the prevalence of genes coding surface proteins.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CRIE	Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBD	<i>Global Burden Disease</i>
HIV / AIDS	Vírus da Imunodeficiência Humana / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
LCR	Líquor
LP	Líquido Pleural
<i>lytA</i>	Autolisina N-acetilmuramoil-L-alanina amidase
CIM	Concentração Inibitória Mínima
<i>nanA</i>	Neuraminidase A
<i>nanB</i>	Neuraminidase B
OM	Otite Média
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
<i>pavA</i>	Proteína A de adesão e virulência pneumocócica
<i>pcpA</i>	Proteína A de ligação à colina pneumocócica
PCR	Reação em cadeia polimerase
PCV	Vacina pneumocócica conjugada
<i>phts</i>	Proteínas da tríade histidina
<i>pilus</i>	Proteínas de pontas
PLY	Pneumolisina
PNI	Programa Nacional de Imunização
PPV	Vacina de polissacarídeos
<i>psaA</i>	Antígeno de superfície pneumocócica A
<i>PspC</i>	Proteína C de superfície pneumocócica
RT-PCR	PCR em Tempo Real
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2

SBPT Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia

SIREVA II Sistema Regional de Vacinas

TRS Trato Respiratório Superior

VPCI Vacina Pneumocócica de Célula Inteira

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Classificação, transmissão, colonização e invasão)	17
1.2 Epidemiologia das doenças pneumocócicas	19
1.3 Identificação laboratorial de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
1.4 Importância da cápsula de polissacarídeo de pneumococo	21
1.4.1 Sorotipos capsulares	23
1.5 Prevenção de doenças pneumocócicas	24
1.5.1 Vacina polissacarídica	25
1.5.2 Vacinas conjugadas	25
1.6 Emergência do sorotipo “não-vacinal” 19A no brasil	27
1.7 Novas estratégias de imunização contra <i>Streptococcus pneumoniae</i>	28
1.8 Proteínas de superfície como alvos de novas vacinas: Para além da cápsula do pneumococo	29
1.9 Identificação de fatores de virulência de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	34
1.10 Modelo experimental in vivo alternativo de <i>Galleria mellonella</i>	34
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
3 JUSTIFICATIVA	50
4. OBJETIVO	51
4.1 Objetivo geral	51
4.2 Objetivos específicos	51
5. ARTIGO CIENTÍFICO	52
5.1 Manuscrito	52
6. CONCLUSÕES	74
7. ANEXOS	75
7.1 Parecer consubstanciado do comitê de ética	75
7.2 Certificado de mobilidade acadêmica	84
7.3 Certificado de premiação do “Prêmio Jovem Pesquisador Promega”	85
7.4 Produção científica complementar	86
7.5 Normas para publicação	87

1. REVISÃO DA LITERATURA

Diversas pesquisas vêm demonstrando que muitos microrganismos vivem em perfeita simbiose com as células humanas, sendo até mesmo essenciais para saúde e bem-estar. No entanto, outras são inimigas, fazendo com que as infecções bacterianas sejam uma das principais causas de morte ao redor do mundo (Collen 2016; Gierke et al. 2021).

Como exemplo, temos patógenos respiratórios, alguns existem como membros comensais da microbiota das vias aéreas superiores, vivendo de forma harmônica no hospedeiro humano, causando doenças apenas sob condições específicas (Swiatlo and McDaniel 2019). Este é o caso de *Streptococcus pneumoniae*, ou conhecido popularmente como pneumococo, uma bactéria Gram-positiva, que está entre as mais patogênicas para o ser humano.

Embora comumente seja colonizadora do trato respiratório superior (TRS), está associada a infecções pneumocócicas que variam de casos mais leves, como otite média (OM) e sinusite, a infecções mais graves, incluindo pneumonias. A ocorrência de meningite e bacteremia, configura doença pneumocócica invasiva (DPI) (Mehr and Wood 2012). Apresenta uma carga global significativa entre as doenças infecciosas mais comuns no mundo, responsável por cerca de 60% das infecções adquiridas na comunidade (SBPT 2021). Qualquer pessoa pode ser afetada pela doença pneumocócica, entretanto alguns grupos estão mais vulneráveis, como crianças, idosos e indivíduos em algum estado de imunocomprometimento (Brooks and Mias 2018; Gierke et al. 2021).

1.1 *Streptococcus pneumoniae* (Classificação, transmissão, colonização e invasão)

Sua classificação científica pertence ao Filo Firmicutes, Classe Bacili, Ordem Lactobacillales, Família Streptococcaceae, Género *Streptococcus* e Espécie: *Streptococcus pneumoniae* (NCBI 2021).

Possui forma de cocos, com cerca de um micrómetro, sendo um anaeróbio facultativo. No microscópio são observados normalmente em pares (diplococos), mas também podem se apresentar de maneira singular ou em cadeias curtas e envolta por uma cápsula de polissacarídeo (Gierke et al. 2021).

A transmissão, colonização e invasão dependem da notável capacidade de *S. pneumoniae* fugir das respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro, através dos seus fatores virulência (Gierke et al. 2021).

A colonização do pneumococo ocorre na nasofaringe humana e geralmente é assintomática e transitória em indivíduos saudáveis. Crianças pequenas (<5 anos) são mais propensas a serem colonizadas comparadas a crianças mais velhas (>5 anos) ou adultos (Loughran et al. 2019). A maioria dos artigos publicados estima que entre 27-65% das crianças e <10% dos adultos são portadores de *S. pneumoniae* (Weiser et al. 2018). No entanto, há outros estudos que discordam do percentual relatado para adultos e apontam que o número possa estar subestimado devido a inadequada coleta realizada na maioria das pesquisas publicadas, que visa apenas um sítio de isolamento (Arguedas et al. 2020; Almeida et al. 2021). O estado de portador é um primeiro passo para que *S. pneumoniae* consiga se espalhar para outros tecidos do corpo humano. A mudança da colonização assintomática para a doença pneumocócica não é totalmente compreendida, mas geralmente ocorre quando há uma interrupção nas defesas. A capacidade de adesão do pneumococo nas células e tecidos do TRS do portador é uma das principais características que facilitam a colonização, permitindo posterior transmissão e invasão (Gierke et al. 2021).

A transmissão ocorre, principalmente, através de portadores que eliminam *S. pneumoniae* das secreções nasais por meio de tosse, espirro e potencialmente pela contaminação de objetos com secreções da mucosa, se a bactéria estiver vivendo dentro de um biofilme (Weiser et al. 2018), logo, é dependente da circulação de pessoas, do contato umas com as outras. Foi possível evidenciar isto com as medidas de contenção implantadas devido a pandemia da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-COV-2), causador da COVID-19, a incidência de pneumococo também diminuiu, levando a uma redução significativa de doenças relatadas como DPI no mundo inteiro (Brueggemann et al. 2021; Kadambari et al. 2021).

A patogênese da doença pneumocócica começa pela colonização da mucosa do TRS de seu hospedeiro humano obrigatório. No entanto, a notável capacidade de invasão desta bactéria a uma variedade de locais anatômicos ainda é um campo escuro, mas sabe-se que este microrganismo produz diversos fatores de virulência que o auxiliam a causar uma série de doenças, algumas resultando em mortalidade (van der Poll and Opal 2009).

1.2 Epidemiologia das doenças pneumocócicas

Historicamente, *S. pneumoniae* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infecciosa no mundo inteiro. Estima-se que ao redor do mundo 14,5 milhões de episódios de doenças pneumocócicas graves ocorram a cada ano entre crianças menores de 5 anos de idade, resultando em aproximadamente meio milhão de mortes. A preocupação das infecções pneumocócicas é maior em locais com poucos recursos, em países de baixa e média renda, onde a falta de nutrição, antibióticos e vacinas torna a população particularmente suscetível à doença (CDC 2021).

Um artigo publicado pela *Global Burden of Disease* (GBD), um programa que conta com a colaboração de mais de 1.800 pesquisadores de 127 países e tem como objetivo informar sobre as doenças com maior incidência em escala global, relata que em 2016 *S. pneumoniae*, entre outros quatro microrganismos que também causam infecção respiratória inferior, foi a principal causa de morbimortalidade em todo o mundo, contribuindo para mais de um milhão de mortes entre crianças <5 anos e adultos idosos >70 anos (GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators* et al. 2018).

Também é possível observar os números expressivos através do projeto Sistema Regional de Vacinas (SIREVA II), criado pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) (OPAS 2021) com o objetivo de monitorar o padrão de resistência aos antimicrobianos e o perfil de sorotipos de pneumococo na América Latina, bem como informações epidemiológicas para a estimativa da carga de outras bactérias, que também causam pneumonia e meningite. Em 2018, o SIREVA II, assim como o GDB, relatou que em todos os países da América Latina (inclusos no programa) pneumococo foi a bactéria que mais causou pneumonia e meningite em crianças <5 anos. No Brasil, os fluidos corporais invadidos com maior frequência foram: corrente sanguínea (51,7%), líquido cefalorraquidiano (LCR) (40,4%) e líquido pleural (LP) (5,8%).

Segundo os dados epidemiológicos do Brasil, entre 2010 e 2018 foi a bactéria responsável pela maior parte de meningites correspondendo também ao maior percentual de mortalidade. Ao todo foram 9.441 casos notificados, destes, 2.763 foram letais, ou seja, quase 30% dos casos resultam em óbito (MS 2019a).

No Rio Grande do sul o informe epidemiológico de meningites demonstra que entre 2010-2018 o pneumococo também esteve entre os agentes que mais causou meningite e maior letalidade quando comparado a outras bactérias (CEVS 2021).

Apesar da pneumonia ser a apresentação clínica mais comum de *S. pneumoniae*, também é o principal causador de OM, chegando a 40-50% dos casos relatos (Ramakrishnan et al. 2007). No entanto, entre as doenças pneumocócicas é a menos agressiva, com bom prognóstico na maioria dos casos e com mortalidade extremamente rara, mas ainda sim existem casos que podem levar a complicações serias e irreversíveis, tais como: perda auditiva, colesteatoma, timpanosclerose, otosite, labirintite, paralisia facial, dermatite eczematóide infecciosa (Danishyar and Ashurst 2021).

Infelizmente não há um número preciso das outras doenças pneumocócicas, principalmente as não-DPI, visto que não são relatadas nos dados epidemiológicos por não serem de notificação compulsória.

1.3 Identificação laboratorial de *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae faz parte do grupo mitis de estreptococos, junto com cerca de outras 20 espécies que possuem menor patogenicidade. Na prática clínica, alguns representantes dessas espécies, especialmente *Streptococcus pseudopneumoniae* e *Streptococcus mitis*, às vezes são confundidos com pneumococo com base nos resultados de métodos microbiológicos clássicos, como susceptibilidade à optoquina e solubilidade biliar (Sadowy and Hryniewicz 2020).

O diagnóstico definitivo depende do isolamento do organismo, mas no geral o processo de identificação em um laboratório clínico é relativamente fácil de processar através de cultura bacteriana, coloração de Gram, testes bioquímicos e de sensibilidade (Gámez et al. 2018).

A identificação a partir da cultura depende da observação de características morfológicas das bactérias e das colônias (Ramirez 2014). Os estreptococos podem ser diferenciados de acordo com sua aparência na placa de ágar sangue após incubação a 35°C em presença de 5% de CO₂, podendo apresentar: hemólise total (beta), parcial (alfa-hemolítico, de cor esverdeada) ou nenhuma (gama). *S. pneumoniae* apresenta crescimento alfa-hemolítico (Gierke et al. 2021).

A suscetibilidade à optoquina é um dos pilares da identificação de pneumococo devido à facilidade de realização do teste. Uma zona de inibição de 14 mm ou mais a volta de um disco de 6 mm significa sensibilidade e o identifica, uma característica que geralmente não é compartilhada por outros estreptococos. No entanto, o surgimento de variantes resistentes à optoquina questionou a validade do uso desse teste para a identificação presuntiva de pneumococos (Pinto et al. 2013). A especificidade do teste da solubilidade em bile também auxilia na identificação de *S. pneumoniae*, do qual pode ser executado em placa ou em caldo (ANVISA 2013).

A espectrometria de massa do tempo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) trouxe uma mudança fundamental na identificação rotineira de patógenos microbianos em laboratórios de microbiologia clínica. Todavia, o perfil de massa dos sistemas MALDI-TOF é gerado principalmente por proteínas ribossômicas, facilitando o alinhamento com as classificações taxonômicas atuais, mas como o pneumococo possui proteínas ribossômicas semelhantes aos outros membros do seu grupo, faz com que a distinção entre *S. pneumoniae* e os outros membros menos patogênicos do grupo mitis dificulte o processo de identificação (Marín et al. 2017).

1.4 Importância da cápsula de polissacarídeo de pneumococo

As bactérias Gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicano mais espessa comparada à dos organismos Gram-negativos (Gierke et al. 2021). *Streptococcus pneumoniae*, particularmente, apresenta três camadas principais de superfície que podem ser distinguidas de dentro para fora: membrana plasmática, parede celular e cápsula (figura 1) (Safari et al. 2012). Variantes não encapsuladas, que apresentam outros fatores de virulência, podem também causar doença, ainda que com menor frequência e gravidade (Feldman and Anderson 2016).

1.4.1 Sorotipos capsulares

Até o momento, foram identificados em torno de 100 sorotipos capsulares distintos, cuja distribuição varia tanto temporal quanto geograficamente (Ganaie et al.). A classificação é baseada em suas propriedades bioquímicas e antigênicas, que cercam e protegem as bactérias do sistema imune do hospedeiro (Azarian et al. 2018). Devido à transformabilidade natural de pneumococo, a recombinação horizontal permite que um sorotipo possa pertencer a diferentes genótipos e um único genótipo possa expressar diversos genes capsulares, isto é, sorotipos distintos. Sorotipos antigenicamente semelhantes são categorizados em sorogrupos, por exemplo, os sorotipos 19A, 19B, 19C, 19F, estão dentro do sorogrupo 19, devido suas semelhanças (van Tonder et al. 2016; Morais et al. 2019; Paton and Trappetti 2019).

A maioria dos sorotipos de *S. pneumoniae* demonstrou causar doenças graves, mas alguns são mais prevalentes que outros, embora o cenário tenha mudado onde foi implantado a rotina de vacinação (Brooks and Mias 2018).

Para avaliar presença do polissacarídeo capsular, pode-se geralmente detectá-la usando soros específicos. O *Statens Serum Institut* (Copenhague, Dinamarca) é a fonte mais frequente de soros para identificar cápsulas pneumocócicas. Eles fornecem um "omni-soro" que reage com todas as cápsulas pneumocócicas conhecidas e que podem ser úteis na identificação de pneumococos, bem como soros específicos que reagem apenas com polissacarídeos ou grupos de polissacarídeos específicos (Ramirez 2014). O método Quellung, usando soro de coelho específicos, é padrão ouro, tem sido usada desde os primeiros dias da sorotipagem pneumocócica, permitindo uma identificação específica e confiável (Gámez et al. 2018). Para simplificar ainda mais esse processo, vários esquemas de "sorotipagem genética" foram desenvolvidos para identificar características particulares dos *locus* capsular. Apesar da multiplicidade de abordagens, as mais utilizadas são baseadas na amplificação pela técnica de Reação em Cadeira Polimerase (PCR) de genes específicos para sorogrupos ou sorotipos (Ramirez 2014).

É importante a caracterização da epidemiologia referente as distinções que a cápsula possui, pois além de grande parte da virulência do pneumococo ser atribuída a ela, seu polissacarídeo capsular estrutural e antigenicamente diverso é o alvo das vacinas pneumocócicas atualmente licenciadas (Geno et al. 2015).

1.5 Prevenção de doenças pneumocócicas

A vacinação é uma maneira de treinar o sistema imunológico contra um patógeno específico, atingindo a memória imunológica sem uma infecção real, de modo que o corpo esteja preparado quando a bactéria atacar (NIH 2021).

As tentativas de terapia imunológica da doença pneumocócica iniciaram em 1886 quando Albert Fränkel demonstrou que o soro sanguíneo de coelhos já infectados, mas que tinham se recuperado, eram imunes à reinfecção. Mas, o primeiro registro que se tem sobre vacinas, de fato, datam o ano de 1909, com a Pneumo-Bacterin, nos Estados Unidos da América (EUA). Eram vacinas de células inteiras não específicas para sorotipos, imitavam empiricamente as vacinas contra febre tifóide, cólera e peste. Estas foram distribuídas até a décadas de 1930 com algum grau de sucesso (Grabenstein and Klugman 2012).

Atualmente, existem dois tipos de vacinas disponíveis: A vacina de polissacarídeos (PPSV) e a vacina pneumocócica conjugada (PCV). Ambas contendo antígeno específicos de polissacarídeo capsular (Masomian et. al., 2020) e disponíveis no Brasil. Os sorotipos contidos nas vacinas, bem como os grupos aptos a receber o imunizante no Brasil estão resumidos na tabela 1 (Ministério da Saúde 2020).

Tabela 1: Resumo das vacinas licenciadas e grupos aptos a receber o imunizante.

Vacina (Nome comercial)	Sorotipos contidos na vacina	Ano de aprovação pela FDA	Esquema de vacinação brasileiro (rede pública)
PPSV23 (Pneumo 23/ Pnu-Immune 23)	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F	1983	Pessoas com 60 anos ou mais em condições especiais; Povos indígenas a partir de 5 anos de idade sem comprovação vacinal com as vacinas pneumocócicas conjugadas; Pacientes de CRIE ^a
PCV7 (Prevnar)	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	2000	Não está mais disponível no Brasil (era disponibilizada apenas para pacientes de alto risco)
PCV10 (Synflorix)	PCV7+1, 5, 7F	2008	Incluída no PNI ^b Crianças <2 anos
PCV13 (Prevnar)	PCV10 + 3, 6A, 19A	2010	Apenas pacientes de CRIE

^a Centros de Referência para imunobiológicos especiais (CRIE), nestes estão incluídos pacientes com HIV/aids, pacientes oncológicos, transplantados de órgãos sólidos, transplantados de células-tronco hematopoiéticas.

^b PNI= Plano nacional de imunização.

1.5.1 Vacina polissacarídica

A vacina pneumocócica polissacarídica é composta de preparações purificadas de polissacarídeo capsular pneumocócico, incluindo 23 sorotipos que são responsáveis por cerca 72–95% de DPI (Gierke et al. 2021). No entanto, não são eficazes na imunização infantil, principalmente em crianças <2 anos, pois gera respostas imunes que são independentes das células T e, portanto, mal suportadas pelo sistema imunológico imaturo de crianças menores, por isso é recomendada apenas para crianças maiores (>2 anos) e adultos, para controlar no caso de eventuais surtos (Lee et al. 2021).

No Brasil, é recomendada para pessoas com 60 anos ou mais em condições especiais, como: indivíduos vivendo acamados e/ou em instituições fechadas, como casas geriátricas, hospitais, unidades de acolhimento/asilos e casas de repouso. Também está incluída na rotina de vacinação dos povos indígenas em crianças a partir de 5 anos de idade sem comprovação vacinal com as vacinas pneumocócicas conjugadas e a partir dos 60 anos de idade (Ministério da Saúde 2020). Também é recomendado para pacientes de Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE), nestes estão inclusos pacientes com HIV/aids, pacientes oncológicos, transplantados de órgãos sólidos, transplantados de células-tronco hematopoiéticas (MS 2019a).

No geral, a vacina é 60% a 70% eficaz na prevenção de doenças invasivas causadas pelos sorotipos incluídos na vacina. Apesar da eficácia reduzida da vacina entre pessoas imunocomprometidas, o PPSV23 ainda é recomendado para este grupo, porque elas correm alto risco de desenvolver doenças graves (Gierke et al. 2021).

1.5.2 Vacinas conjugadas

Para resolver o problema da resposta imune reduzida de crianças e de pacientes imunocomprometidos, as vacinas conjugadas foram desenvolvidas. Por meio da ligação covalente de polissacarídeos capsulares do pneumococo a proteínas carreadoras são capazes de induzir resposta imunológica T-dependente, memória imunológica e proteção de longa duração, diferente do que é visto na PPSV23 (WHO 1999).

A primeira vacina conjugada pneumocócica 7-valente (PCV7) foi licenciada em 2000, incluindo o polissacarídeo capsular purificado de sete sorotipos de S.

pneumoniae conjugados a uma variante não tóxica da toxina da difteria conhecida como CRM197 (Matanock et al. 2019).

Em 2008, foi licenciado uma nova vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) constituída por dez sorotipos de pneumococos, sendo oito sorotipos conjugados com a proteína D de *Haemophilus influenzae* não tipáveis, um sorotipo conjugado ao toxóide diftérico e um sorotipo conjugado ao toxóide tetânico (Kim et.al., 2017). No Brasil, foi implantada em março de 2010 no esquema de rotina do Programa Nacional de Imunização (PNI) para todas as crianças <2 anos (MS 2019a). Atualmente é administrada em duas doses aos dois e quatro meses de idade, com intervalo de 60 dias entre as doses, mínimo de 30 dias e mais um reforço que deve ser administrado entre os 12 meses e <5 anos (MS 2020).

No Rio Grande do Sul, foi possível observar que no decorrer dos anos entre 2010 e 2017 houve uma diferença na incidência de casos de meningite por faixa etária, a incidência para os menores de 1 ano passou de 9,4/100.000 habitantes em 2010 para zero em 2017. Esta redução, justifica-se provavelmente, pela implantação da PCV10. No entanto, curiosamente, algumas faixas etárias começaram apresentar um aumento da incidência sendo a maior variação deste indicador nos >60 anos (CEVS 2021).

Em 2010, a vacina pneumocócica conjugada 13-valente (PCV13) foi licenciada pela Food and Drug administration (FDA), para crianças a partir de dois meses de idade, contendo o sorotipo da PCV-10 +3, 6A, 19A, conjugados à proteína CRM197 (Gierke et al. 2021). No Brasil, ela não faz parte do Plano Nacional de Imunização (PNI), é disponibilizada apenas pela rede privada de saúde, amplamente e oferecida gratuitamente, de forma restrita, apenas para os pacientes de CRIE, com idade superior a 5 anos, pois foi considerado haver eficácia para o grupo de risco gravíssimo às doenças pneumocócicas, a partir de uma longa análise crítica de evidências científicas relatadas (MS 2019b).

As PCVs foram capazes de conferir melhor imunogenicidade em crianças, devido à sua capacidade de induzir a resposta das células T de memória. Em muitos países, reduziu significativamente a incidência de DPI e não-DPI de sorotipos inclusos na vacina, até mesmo em faixas etárias não contempladas pela vacinação (proteção de rebanho), pois com a vacinação o carreamento de pneumococo também é diminuído, o que subsequentemente diminui os casos de DPI e não-DPI do tipo vacinal em indivíduos vacinados e não vacinados (Masomian et al. 2020).

Embora as vacinas conjugadas forneçam fortes respostas imunológicas em todas as faixas etárias e memória imunológica, elas podem levar a uma substituição de sorotipo por tipos não vacinais em indivíduos vacinados, o que pode resultar em um aumento da incidência de doença causada por esses outros sorotipos (Htar et.al., 2015). Infelizmente, o número de sorotipos que poderiam ser incluídos em uma formulação de PCV não poderia ser aumentado facilmente, devido a complexidade de produção e o alto custo envolvido (Kim et al. 2017).

1.6 Emergência do sorotipo “não-vacinal” 19A no Brasil

O sorotipo 19A não integra a vacina PCV-10, levando-se em conta que a imensa maioria das crianças recebe esta vacina no Brasil, consideramos apropriado caracterizar este sorotipo como “não vacinal” (MS 2020).

É inegável que a implantação de vacinas ao redor do mundo reduziu significativamente a doença invasiva. No entanto, como a vacina não cobre extensivamente todos os sorotipos capsulares, acaba ocorrendo o fenômeno de substituição de sorotipos, abrindo oportunidade para a circulação de sorotipos não-vacinais (Mehr and Wood 2012). Este é o caso do sorotipo 19A, sorotipo emergente não só no Brasil (Morais et al. 2019), mas também em várias partes do mundo (Balsells et al. 2017; Isturiz et al. 2017). Há dados indicando que em 2008, no EUA antes do PCV-13 substituir o PCV-7 para uso rotineiro em crianças, o sorotipo 19A foi responsável por 43% dos casos incidentes na época (Gierke et al. 2021).

Nos últimos anos também ocorreu um aumento na resistência a antibióticos deste sorotipo apresentando concentração inibitória mínima (CIM) mais altas para β -lactâmicos, macrólídeos, lincosamidas, tetraciclina e co-trimoxazol, com potencial aumentado de causar doença invasiva em relação a outros sorotipos (Azevedo et al. 2016; Isturiz et al. 2017; Cassiolato et al. 2018).

O relatório de 2018 do SIREVA II (OPS 2021) relata que a distribuição dos sorotipos mais frequentes no Brasil é o 19A em praticamente todas as idades, exceto na faixa etária >50 anos, em que o sorotipo 3 é o mais frequente. Neste mesmo relatório também é possível observar que as taxas de resistência a penicilina neste sorotipo também são maiores, quando comparado a outros sorotipos.

No que tange o Rio Grande do sul no informe epidemiológico das meninges o 19A é um dos que mais causa meningite no estado (CEVS 2021). Mott e colaboradores (Mott et al. 2019), demonstra que em Porto Alegre a prevalência do

sorotipo 19A aumentou após a vacinação com PCV-10, principalmente de doença invasiva.

O sorotipo 19A também está entre os sorotipos mais comuns em causar OM, além de ser responsável pelos casos recorrentes e persistentes (Ramakrishnan et al. 2007).

Vigilâncias mundiais têm demonstrado preocupação, pois mesmo após anos de vacinação segue ocorrendo mudança na distribuição de sorotipos não incluídos na vacina, uma vez que podem ser substituídas por cepas mais virulentas e resistentes a antibióticos (Balsells et al. 2017). Há relatos no mundo inteiro sobre a frequência com que sorotipos não-vacinais estão aumentando, tanto no carreamento como na doença invasiva (Kotler et al. 2021; Salsabila et al. 2021; Watkins et al. 2021). Isto afirma o fato de que, historicamente, é possível evidenciar que vacinas tendo como alvo apenas a cápsula não é eficaz a longo prazo, sendo necessário mudar o alvo contido nas vacinas contra *S. pneumoniae*.

1.7 Novas estratégias de imunização contra *Streptococcus pneumoniae*

Existe uma preocupação de que as vacinas pneumocócicas sigam selecionando sorotipos não-vacinais. Com mais de 100 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*, essa é uma preocupação importante e por isso estão em andamento estudos para resolver esse problema (Gierke et al. 2021). Uma atenção maior tem se dado também à imunidade da mucosa, com objetivo de atingir o primeiro contato que o pneumococo tem com o hospedeiro: a colonização do TRS. No entanto, não há uma ideia clara do impacto que a remoção seletiva de pneumococos terá nas comunidades microbianas respiratórias (Kim et al. 2017; Swiatlo and McDaniel 2019).

Outras estratégias, também já em desenvolvimento, incluem as vacinas de células inteiras (vacina de célula inteira morta, vacinas vivas atenuadas de células inteiras) e as vacinas baseadas em proteínas (Masomian et al. 2020).

A vacina pneumocócica de célula inteira (VPCI), tem se mostrado bastante promissora, baseada em um sorotipo não encapsulado, que permite a expressão de muitos antígenos proteicos bacterianos, sem exigir a purificação de proteínas individuais, podendo servir como uma alternativa econômica às vacinas baseadas em polissacarídeos atuais nos países em desenvolvimento. Atualmente estão na fase de testes em humanos (Morais et al. 2019).

Os estudos que têm seus esforços focados nas proteínas de superfície do pneumococo, visam proteínas comuns a todos os sorotipos e que estão envolvidos na virulência da bactéria, como por exemplo a pneumolisina (PLY), proteína de superfície pneumocócica (*pspA*), proteína de superfície pneumocócica (*pspC*), antígeno de superfície pneumocócica A (*psaA*), enzimas neuraminidase e proteínas da tríade histidina (*phts*), com o objetivo de induzir proteção sorotípica cruzada mais ampla do que os PCVs atuais (Kim et al. 2017).

1.8 Proteínas de superfície como alvos de novas vacinas: Para além da cápsula do pneumococo

Sempre foi dada muita importância a cápsula do pneumococo, porém, para que esta bactéria consiga colonizar a nasofaringe humana e posteriormente causar doença, ele necessita produzir uma série de fatores de virulência. As proteínas existentes na superfície do pneumococo já demonstraram ter um papel importante na patogênese, pois mantêm a viabilidade bacteriana, são altamente conservadas, medeiam o contato com componentes de tecidos e secreções do hospedeiro, estando envolvidas em interações diretas com os tecidos do hospedeiro ou na ocultação dos mecanismos de defesa deste (Jedrzejewski 2001; Mitchell and Mitchell 2010).

As proteínas estão ancoradas na parede celular, expostas à superfície do pneumococo e agrupadas em quatro famílias: proteínas de ligação à colina (16 proteínas), lipoproteínas (50 proteínas), proteínas de superfície ancoradas ao LPXTG (18 proteínas) e a família de proteínas de superfície não clássica (6 proteínas). Alguns já tem suas funções bem descritas, enquanto outros permanecem pouco caracterizadas (Mitchell and Mitchell 2010; Galán-Bartual et al. 2015). Algumas, inclusive, já estão sendo avaliadas como candidatas a vacinas em modelos de infecção animal ou em estágio em fase clínica com resultados encorajadores. Proteínas de virulência pneumocócica que têm sequências bem conservadas, entre todos os sorotipos de pneumococo, podem conferir ampla cobertura de imunização (Moraes et al. 2019).

As proteínas de ligação a colina grupo ficam acopladas na fosforilcolina da parede celular (Loughran et al. 2019). Os membros deste grupo compartilham uma organização modular que consiste em um módulo biologicamente ativo e um módulo de ligação à colina, colocado no terminal N ou C, que ancora essas proteínas no

envelope celular por meio de uma interação não covalente com resíduos de colina (Galán-Bartual et al. 2015).

As lipoproteínas desempenham funções como adesão, invasão e evasão imunológica. São proteínas de ligação a substratos, algumas estão envolvidas na ligação e transformação de substratos, essenciais para manter a aptidão de *S. pneumoniae*, outras estão envolvidas no dobramento de proteínas ou na ativação de moléculas da superfície celular e a maioria delas são transportadoras de ABC (realizam o transporte de substratos através da membrana) responsáveis pela aquisição de vários nutrientes, incluindo aminoácidos e peptídeos curtos, açúcares, poliaminas e vários íons metálicos. Representam aproximadamente 2–3% do proteoma pneumocócico e cerca de 40% das proteínas de superfície pneumocócicas indicadas e previstas. Também desencadeiam a ativação de respostas imunes inatas do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento de respostas imunes adaptativas humorais e celulares. Por isso, as lipoproteínas surgiram como candidatas promissoras para o desenvolvimento de novas vacinas e terapêuticas contra infecções pneumocócicas graves (Galán-Bartual et al. 2015; Kohler et al. 2016).

As proteínas de superfície ancoradas ao LPXTG estão covalentemente incorporadas ao polímero de peptidoglicano da parede celular em um dependente de sortase. Possuem funções enzimáticas ou de adesinas, ou seja, ajudam o patógeno se ligar às células e tecidos hospedeiros, reconhecendo as moléculas deste, em uma etapa crítica para estabelecer com sucesso uma infecção (Galán-Bartual et al. 2015).

E a família de proteínas de superfície não clássica estão associadas à superfície, mas não possui ancoragem convencional ou sinais secretores, são menos caracterizadas e descritas principalmente como proteínas citoplasmáticas com funções intracelulares que não estão envolvidos nas interações do patógeno com o hospedeiro. No entanto, frequentemente atuam como adesinas, desempenhando um papel relevante na subversão da função fisiológica das proteínas derivadas do hospedeiro (Kohler et al. 2016).

Vários estudos já vêm investigando as diferentes funções dessas proteínas de superfície na patogênese, com intuito de avaliar potenciais candidatos a vacinas de próxima geração. Resumimos as que foram utilizadas neste estudo na tabela 2:

TABELA 2: Função das proteínas de superfície de *Streptococcus pneumoniae*.

Proteína de virulência (gene)	Família	Função e/ou papel na patogênese	Estudos avaliando produção de anticorpos	Referências
Autolisina A (<i>lytA</i>)	Proteína de ligação à colina	Adesina; principal amidase da parede celular, envolvida na digestão e autólise; facilita a liberação de pneumolisina.	Sim	(Kadioglu et al. 2008; Corsini et al. 2021; UniProt 2021)
Neuraminidase A (<i>NanA</i>)	Proteína ancorada a LPXTG	Enzima hidrolítica; expõe os receptores do hospedeiro para a adesão pneumocócica; Pode interferir com a deposição de C3 na superfície pneumocócica e reduzir a opsonofagocitose por neutrófilos humanos; Remove ácidos siálicos de células e plaquetas; Degradação de muco.	Sim	(Kadioglu et al. 2008; Reglinski et al. 2018; Subramanian et al. 2019; Syed et al. 2019; Xiao et al. 2019)
Neuraminidase B (<i>NanB</i>)	Proteína ancorada a LPXTG	Enzima hidrolítica; revela receptores para aderência, modificando as superfícies de bactérias concorrentes que estão dentro do mesmo nicho e / ou modificando a função das glicoproteínas de depuração do hospedeiro; clivam o ácido siálico terminal de estruturas de glicano que decoram as superfícies das células hospedeiras.	Sim	(Kadioglu et al. 2008; Janapatla et al. 2018; Xiao et al. 2019; UniProt 2021)
Aderência pneumocócica e fator de virulência A (<i>pavA</i>)	Proteína de superfície não clássica	Adesina; faz o primeiro contato com o epitélio; importante durante sepse e meningite; liga-se às proteínas da matriz extracelular, fibronectina e plasminogênio.	Não	(Kadioglu et al. 2008; Pérez-Dorado et al. 2012; Subramanian et al. 2019; UniProt 2021)
Proteína de ligação à colina PcpA (<i>pcpA</i>)	Proteína de ligação à colina	Medeia a adesão às células epiteliais da nasofaringe e do pulmão.	Sim	(Visan et al. 2018)
Proteína A da tríade de histidina pneumocócica (<i>phtA</i>)	Proteínas da tríade de histadina	Adesina; interage com sistema complemento degradando C3; Facilita a aquisição de zinco.	Sim	(Zhang et al. 2001; Anderson et al. 2016; Visan et al. 2018; Subramanian et al. 2019; André et al. 2020; Marquart 2021)
Proteína B da tríade de histidina pneumocócica (<i>phtB</i>)				

Proteína D da tríade de histidina pneumocócica (<i>phtD</i>)				
Proteína E da tríade de histidina pneumocócica (<i>phtE</i>)				
pilus-1 (<i>rrgA</i>)	Proteína ancorada a LPXTG	Adesina; faz o primeiro contato com o epitélio/ endotélio; tem capacidade de iniciar dano, reconhecendo a matriz extracelular e desencadeando a inflamação da mucosa.	Sim	(Moschioni et al. 2010; Shaik et al. 2015; Subramanian et al. 2019)
pilus-2 (<i>sipA</i>)			Não	(Moschioni et al. 2010; Shaik et al. 2015; Subramanian et al. 2019; Virulence factors of pathogenic bacteria (VFDB) 2021)
Proteína A de superfície pneumocócica (<i>pspA</i>)	Proteína de ligação à colina	Auxilia na aderência; protege as bactérias dos efeitos tóxicos da lactoferrina, bloqueia a proteína C reativa (PCR); Inibe a ativação do sistema complemento; Metabolismo celular.	Sim	(Kadioglu et al. 2008; Subramanian et al. 2019; Nakahashi-Ouchida et al. 2021)
<i>pspA</i> -fam1	Proteína de ligação à colina	Interação com sistema complemento.	Sim	(Hotomi et al. 2013; Kothari et al. 2015)
Proteína A de ligação à colina (<i>pspC</i> ou <i>CbpA</i>)	Proteína de ligação à colina	Facilita a adesão e invasão do epitélio respiratório e barreira hematoencefálica; Interação com sistema complemento	Sim	(Lebon et al. 2011; Miyaji et al. 2015; Subramanian et al. 2019)

Esta lista de fatores de virulência não é exaustiva, assim como suas funções e papel na patogênese, apenas exemplos selecionados são mostrados.

Há vários estudos que investigam a ação de vacinas com base em proteínas pneumocócicas. Serão apresentados aqui apenas alguns dos estudos que mais avançaram neste campo. A PnuBioVax, é uma vacina que está sendo proposta composta por *pspA*, PlyD6 geneticamente modificado, Pilus-1 e outros fatores de virulência obtidos de uma cultura da cepa ATCC TIGR4 modificada. Os testes pré-clínicos de imunogenicidade já mostraram resultados promissores com altos níveis de anticorpos IgG contra essas proteínas em coelhos imunizados (Cecchini et al. 2015).

Há a formulação de uma vacina composta por 10 polissacarídeos conjugados específicos combinados com o toxóide de Ply e a *phtD*, que também provocou respostas imunes a proteínas pneumocócicas, foi bem tolerada em crianças, mas não tiveram impacto na prevalência de carregamento pneumocócico nasofaríngeo (Odutola et al. 2017).

Outro estudo desenvolvido para explorar a segurança e a tolerabilidade de uma outra vacina contendo *pcpA*, *phtD* e PlyD1 recombinantes em adultos, crianças e bebês, concluiu que a formulação desta é segura e imunogênico nos três grupos avaliados e que a adição de adjuvante de alumínio melhorou a imunogenicidade em lactentes sem alterar o perfil de segurança (Brooks et al. 2015; ClinicalTrials.gov 2021b).

A vacina com antígenos dPly e *phtD* da GlaxoSmithKline, atualmente está na Fase 2, com o objetivo de demonstrar a eficácia protetora desta vacina contra a OM, estão avaliando a segurança em bebês nativos americanos com menos de 24 meses de idade e investigando o impacto nas infecções agudas do trato respiratório inferior até o segundo ano de vida. Até o momento estão com resultados positivos (ClinicalTrials.gov 2021a).

O emprego de proteínas como antígenos vacinais tem como suposição promover proteção em todas as faixas etárias contra todos ou quase todos os sorotipos pneumocócicos, visto que muitas delas estão presentes em diversas cepas, ampliando então a gama de proteção. Além disso, a combinação de proteínas pode desencadear respostas imunes mais amplas e eficazes em comparação com o uso de um antígeno isolado (Andre et al. 2017; Moraes et al. 2019).

1.9 Identificação de fatores de virulência de *Streptococcus pneumoniae*

Identificar os genes que codificam estruturas ou moléculas envolvidas na virulência de *S. pneumoniae* tem importante valia, visto que a presença ou ausência destas pode levar a um perfil entre os diferentes isolados, assim como identificar quais impactam na sobrevivência do pneumococo no hospedeiro. A prevalência de determinados genes pode trazer respostas, como: quais genes promovem a expansão e a invasão de uma cepa notavelmente virulento em comparação a cepas menos invasivas (Blumental et al. 2015; Mills et al. 2020).

A PCR em Tempo Real (RT-PCR) é uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida, levando de duas a três horas para emitir o resultado. Esta técnica é bem útil para identificar genes alvo, pois quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo uma detecção rápida, precisa e confiável (Mackay 2004).

Este método detecta sequências de ácidos nucleicos dos patógenos, genes/ proteínas de virulência também podem ser identificados através deste método (Tavares et al. 2019). Blumental e colegas (Blumental et al. 2015) identificaram 16 genes principais envolvidos na virulência do pneumococo, através deste método, para comparar sua distribuição geográfica, avaliar sua associação com o local da infecção e seu potencial interesse como novos candidatos à vacina.

1.10 Modelo experimental *in vivo* alternativo de *Galleria mellonella*

Utilizar modelos animais alternativos reflete em economia muito real de números de animais mamíferos (substituição e redução) e melhoria do bem-estar (refinamento), pois maior parte do trabalho de avaliação de segurança pode ser realizada em animais invertebrados, e os resultados desses modelos permitem aos cientistas fazerem previsões confiáveis do que aconteceria antes de utilizar inúmeros animais mamíferos, de alto custo e mais trabalhosos (Brannen et al. 2016).

Larvas de *Galleria mellonella* estão sendo propostas como modelos experimentais *in vivo* alternativos, pois assim como outros modelos que utilizam insetos, são mais baratos, geralmente menos trabalhosos e eticamente mais aceitáveis (Kamal et al. 2019) em comparação com modelos que utilizam

mamíferos. Considera-se também a perspectiva de mudanças no cenário científico mundial e o *princípio Três Rs* (*Reduction, Replacement e Refinement*) têm incentivado o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de mamíferos (Ferreira et al. 2005; Dieb Miziara et al. 2012).

Galleria mellonella (traça do favo de mel ou traça grande da cera) é um inseto holometabólico típico, ou seja, seu ciclo biológico é composto por 4 estágios (ovo, larva, pupa e mariposa) (figura 2). A fase do ciclo biológico de *G. mellonella* mais utilizada em estudos relativos à virulência de patógenos é o último estágio larval (cerca de 20 mm e 220-260 mg) (Junqueira et al. 2021).

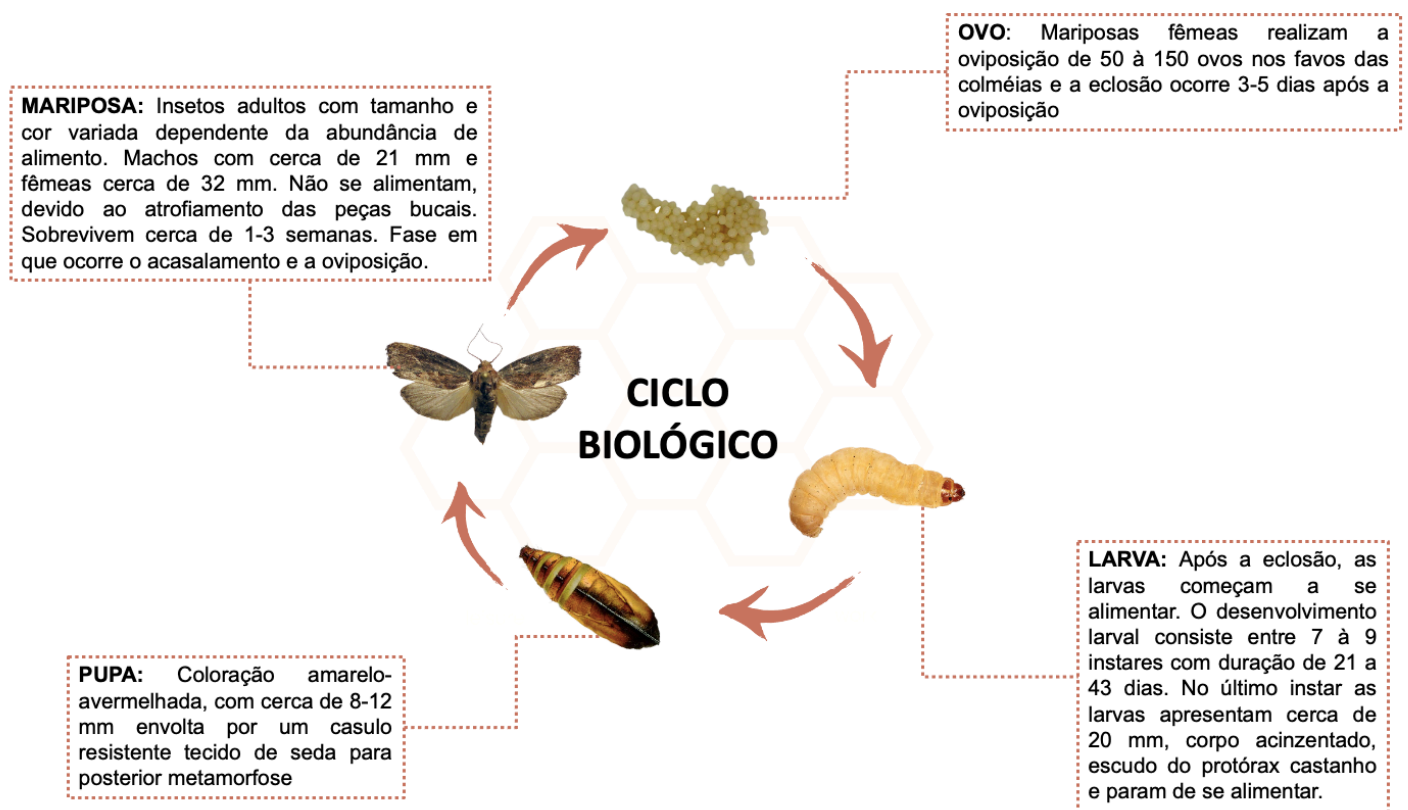


Figura 2: Ciclo biológico de *Galleria mellonella* (Imagem autoral)

Esse inseto é considerado uma praga na apicultura, pois alimenta-se do favo das abelhas melíferas nas colmeias, causando perdas significativas. São distribuídas em todo o mundo, exceto em clima muito frio e em grandes altitudes e os danos causados por são graves, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais, contribuindo para o declínio nas populações de abelhas, sendo

uma ameaça para a segurança alimentar e nutricional global (Kwadha et al. 2017).

Em contrapartida, isto fez com que este inseto recebesse uma atenção maior, por parte de cientistas, apicultores e público em geral, começando a ser utilizada como modelo para estudos de microrganismos infecciosos, na avaliação da patogênese, mecanismos de virulência, resposta imune e avaliação do potencial de compostos antimicrobianos (Cutuli et al. 2019), como uma alternativa aos modelos em mamíferos (Junqueira 2012; Ramarao et al. 2012).

Entre as vantagens de usar este modelo animal estão: a capacidade de sobrevivência das larvas a 37°C, mimetizando a temperatura fisiológica dos humanos, a fácil inoculação de uma quantidade precisa do patógeno (Glavis-Bloom et al. 2012), baixo custo, demanda de espaço pequeno (Kaito et al. 2020). Outra vantagem na utilização de larvas de *G. mellonella* para estudo de infecções é que este modelo permite a inoculação por diferentes vias, tais como: Injeção intra-hemocoelica, subcutânea e/ ou oral, todas estas permitem inoculações definidas de bactérias, resultando em taxas consistentes de sobrevivência/mortalidade. Nos métodos por injeção normalmente são utilizados grupos com 10-20 larvas para cada condição experimental, além de um grupo controle, com objetivo de controlar possíveis traumas físicos devido à injeção (Junqueira 2012; Tsai et al. 2016).

A virulência microbiana no modelo de infecção em *G. mellonella*, a virulência microbiana pode ser avaliada por 5 dias e diferentes formas, como a formação de casulo (Champion et al. 2018), melanização, proliferação do microrganismo dentro das larvas durante a infecção e a sobrevivência. Esta última é a forma mais utilizada, na avalia-se a taxa de sobrevivência, após a inoculação microbiana, através da resposta ao estímulo de toque com uma pinça, em intervalos de 12 ou 24 horas. Quando uma variedade de doses microbianas é inoculada nas larvas, os resultados permitem o cálculo de uma dose letal metade máxima (DL₅₀) (Tsai et al. 2016).

Alguns estudos já validaram o uso das larvas de *G. mellonella* como um bom modelo para estudar a atividade de bactérias Gram-positivas (Luther et al. 2014; Sheehan et al. 2019), inclusive em nosso grupo de pesquisa (Silva et al. 2017; Pinto et al. 2020). Várias espécies de estreptococos também já foram avaliadas neste modelo animal, como *Streptococcus suis* (Velikova et al. 2016),

Streptococcus do Grupo A (Olsen et al. 2011), *Streptococcus agalactiae* (Crespo-Ortiz et al. 2020), *Streptococcus mitis*, *Streptococcus palmarum sanguinis* (Palma et al. 2019). No entanto, para o estudo de *S. pneumoniae* ainda é um modelo pouco explorado (Evans and Rozen 2012; Cools et al. 2019).

Evans e Rozen (Evans and Rozen 2012) foram os primeiros a relatar uso de *G. mellonella* para estudo de *S. pneumoniae*, propuseram o uso desta como um modelo de infecção para estudar infecções e tratamento pneumocócicos, determinando a patogenicidade de vários sorotipos e, assim, confirmaram a adequação desse modelo de infecção.

Em estudo prévio apresentado por nosso grupo de pesquisa no ASM Microbe 2018 (Atlanta, EUA) comparando dois isolados de *S. pneumoniae* sorotipo 19A, verificou-se maior virulência do isolado oriundo de doença pneumocócica invasiva (genes *pht* - relacionados com adesão - presentes), em relação ao isolado oriundo de nasofaringe de portador saudável (genes *pht* ausentes), utilizando *G. mellonella* como modelo *in vivo* (dados não publicados).

Cools et.al (Cools et al. 2019) avaliaram o efeito de uma mutação na síntese da cápsula de *S. pneumoniae* nas larvas. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa otimizou e caracterizou este modelo *in vivo* para estudos de virulência e avaliação de terapêutica contra *S. pneumoniae* (Cools et al. 2019). Até o presente momento este é o primeiro relato utilizando isolados clínicos de *S. pneumoniae* e modelo de infecção de *G. mellonella*.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à saúde. 1ª. Vol. 1. Brasília: ANVISA; 2013.
- Almeida ST, Paulo AC, Froes F, de Lencastre H, Sá-Leão R. Dynamics of Pneumococcal Carriage in Adults: A New Look at an Old Paradigm. *The Journal of infectious diseases*. 2021 May 20;223(9):1590–600.
- Anderson RJ, Guru S, Weeratna R, Makinen S, Falconer DJ, Sheppard NC, et al. In vivo screen of genetically conserved *Streptococcus pneumoniae* proteins for protective immunogenicity. *Vaccine*. 2016 Dec 7;34(50):6292–300.
- André GO, Assoni L, Rodriguez D, Leite LCC, dos Santos TEP, Ferraz LFC, et al. Immunization with PhtD truncated fragments reduces nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*. 2020 May 27;38(26):4146–53.
- Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LFC, Ribeiro ML, Leite LCC, et al. Role of *Streptococcus Pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. Vol. 8, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
- Arguedas A, Trzciński K, O'Brien KL, Ferreira DM, Wyllie AL, Weinberger D, et al. Upper respiratory tract colonization with *Streptococcus pneumoniae* in adults. Vol. 19, *Expert Review of Vaccines*. Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 353–66.
- Azarian T, Mitchell PK, Georgieva M, Thompson CM, Ghouila A, Pollard AJ, et al. Global emergence and population dynamics of divergent serotype 3 CC180 pneumococci. *PLoS Pathogens*. 2018 Nov 1;14(11).
- Azevedo J, dos Anjos ES, Cordeiro SM, dos Santos MS, Escobar EC, Lobo PR, et al. Genetic profiles and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* non-PCV10 serotype isolates recovered from meningitis cases in Salvador, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. 2016 Oct 1;65(10):1164–70.
- Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2017 May 1;12(5).

- Blumental S, Granger-Farbos A, Moïsi JC, Soullié B, Leroy P, Njanpop-Lafourcade BM, et al. Virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. Comparison between African and French invasive isolates and implication for future vaccines. *PLoS ONE*. 2015 Jul 27;10(7).
- Brannen KC, Chapin RE, Jacobs AC, Green ML. Alternative models of developmental and reproductive toxicity in pharmaceutical risk assessment and the 3Rs. *ILAR Journal*. 2016 Dec 1;57(2):144–56.
- Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
- Brooks WA, Chang LJ, Sheng X, Hopfer R, de Bruyn G, Bologna M, et al. Safety and immunogenicity of a trivalent recombinant PcpA, PhtD, and PlyD1 pneumococcal protein vaccine in adults, toddlers, and infants: A phase I randomized controlled study. *Vaccine*. 2015 Aug 26;33(36):4610–7.
- Brueggemann AB, Jansen van Rensburg MJ, Shaw D, McCarthy ND, Jolley KA, Maiden MCJ, et al. Changes in the incidence of invasive disease due to *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* during the COVID-19 pandemic in 26 countries and territories in the Invasive Respiratory Infection Surveillance Initiative: a prospective analysis of surveillance data. *The Lancet Digital Health*. 2021 Jun 1;3(6):e360–70.
- Cassiolato AP, Grassi Almeida SC, Andrade AL, Minamisava R, Cristina de Cunto Brandileone M. Expansion of the multidrug-resistant clonal complex 320 among invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A after the introduction of a ten-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *PLoS ONE*. 2018 Nov 1;13(11).
- Cecchini P, Entwisle C, Joachim M, Pang Y, Dalton K, Hill S, et al. Next Generation Vaccines: Development of a Novel *Streptococcus pneumoniae* Multivalent Protein Vaccine. *BioProcessing Journal*. 2015 Oct 9;14(3).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Global Pneumococcal Disease and Vaccine [Internet]. 2021 [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/global.html>

- Centro Estadual de Vigilância em Saúde RS (CEVS). Informe epidemiológico das meningites 2010-2017 [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://cevs.rs.gov.br/informativos-meningite>
- Champion OL, Titball RW, Bates S. Standardization of *G. mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. Vol. 4, Journal of Fungi. MDPI AG; 2018.
- ClinicalTrials.gov. Evaluation of a Vaccine for Reducing Ear and Lung Infections in Children [Internet]. 2021a [cited 2021 Oct 13]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01545375>
- ClinicalTrials.gov. Study of Investigational Pneumococcal Vaccine in Healthy Adults, Toddlers and Infants [Internet]. 2021b [cited 2021 Oct 13]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01446926?view=results>
- Collen A. 10% humano. 1ª. Rio de Janeiro: Sextante; 2016.
- Cools F, Torfs E, Aizawa J, Vanhoutte B, Maes L, Caljon G, et al. Optimization and characterization of a *Galleria mellonella* larval infection model for virulence studies and the evaluation of therapeutics against *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(FEB).
- Corsini B, Aguinalalde L, Ruiz S, Domenech M, Yuste J. Vaccination with lyta, lytc, or pce of *Streptococcus pneumoniae* protects against sepsis by inducing iggs that activate the complement system. *Vaccines*. 2021;9(2):1–15.
- Crespo-Ortiz M del P, Burbano ME, Barreto M. Pathogenesis and in vivo interactions of human *Streptococcus agalactiae* isolates in the *Galleria mellonella* invertebrate model. *Microbial Pathogenesis*. 2020 Oct 1;147.
- Cutuli MA, Petronio G, Vergalito F, Magnifico I, Pietrangelo L, Venditti N, et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. Vol. 10, Virulence. Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 527–41.
- Danishyar A, Ashurst J v. Acute Otitis Media. In 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470332/>
- Dieb Miziara I, Tereza de Matos Magalhães A, Santos A, Ferreira Gomes É, Ayer de Oliveira R. Research ethics in animal models [Internet]. Vol. 78, Brazilian Journal of otorhinolaryngology. 2012. Available from: <http://www.bjorl.org.br/>

- Evans BA, Rozen DE. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012 Oct;31(10):2653–60.
- Feldman C, Anderson R. Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus [version 1; referees: 2 approved]. Vol. 5, F1000Research. Faculty of 1000 Ltd; 2016.
- Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Experimental models in research. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20(SUPPL. 2):28–34.
- Galán-Bartual S, Pérez-Dorado I, García P, Hermoso JA. Structure and Function of Choline-Binding Proteins. In: *Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions*. Elsevier Inc.; 2015. p. 207–30.
- Gámez G, Castro A, Gómez-Mejía A, Gallego M, Bedoya A, Camargo M, et al. The variome of pneumococcal virulence factors and regulators. *BMC Genomics*. 2018;19(1).
- Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral *Streptococcus*. Available from: <https://doi.org/10.1128/mBio>
- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators*, Troeger C, Blacker B, Khalil IA, Rao PC, Cao J, et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Nov 1;18(11):1191–210.
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal capsules and their types: Past, present, and future. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):871–99.
- Gierke R, Wodi AP, Kobayashi M. Pneumococcal Disease. In: *Centers for Disease Control and Prevention (CDC), editor. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases [Internet]*. 14th ed. Washington, D.C.: Public Health Foundation; 2021. p. 255–74. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>
- Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E. Of model hosts and man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella*

- as model hosts for infectious disease research. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012;710:11–7.
- Grabenstein JD, Klugman KP. A century of pneumococcal vaccination research in humans. Vol. 18, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2012. p. 15–24.
- Hotomi M, Togawa A, Kono M, Ikeda Y, Takei S, Hollingshead SK, et al. PspA Family Distribution, Antimicrobial Resistance and Serotype of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Upper Respiratory Tract Infections in Japan. *PLoS ONE*. 2013 Mar 6;8(3).
- Isturiz R, Sings HL, Hilton B, Arguedas A, Reinert RR, Jodar L. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide epidemiology. Vol. 16, *Expert Review of Vaccines*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 1007–27.
- Janapatla RP, Chen CL, Hsu MH, Liao WT, Chiu CH. Immunization with pneumococcal neuraminidases NanA, NanB and NanC to generate neutralizing antibodies and to increase survival in mice. *Journal of Medical Microbiology*. 2018 May 1;67(5):709–23.
- Jedrzejewski MJ. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001 Jun;65(2):187–207.
- Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: Recent studies and new perspectives. *Virulence*. 2012;3(6).
- Junqueira JC, Mylonakis E, Borghi E. *Galleria mellonella* experimental model: Advances and future directions. Vol. 79, *Pathogens and Disease*. Oxford University Press; 2021.
- Kadambari S, Goldacre R, Morris E, Goldacre MJ, Pollard AJ, Affiliations A. Indirect effects of the COVID-19 pandemic on childhood infection in England: a population based observational study [Internet]. 2021. Available from: <https://ssrn.com/abstract=3864079>
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Vol. 6, *Nature Reviews Microbiology*. 2008. p. 288–301.
- Kaito C, Murakami K, Imai L, Furuta K. Animal infection models using non-mammals. Vol. 64, *Microbiology and Immunology*. Blackwell Publishing Asia; 2020. p. 585–92.

- Kamal F, Peters DL, McCutcheon JG, Dunphy GB, Dennis JJ. Use of Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella*) as an Alternative Animal Infection Model for Analysis of Bacterial Pathogenesis. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 163–71.
- Kim GL, Seon SH, Rhee DK. Pneumonia and *Streptococcus pneumoniae* vaccine. Vol. 40, *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea; 2017. p. 885–93.
- Kohler S, Voß F, Gómez Mejia A, Brown JS, Hammerschmidt S. Pneumococcal lipoproteins involved in bacterial fitness, virulence, and immune evasion. Vol. 590, *FEBS Letters*. Wiley Blackwell; 2016. p. 3820–39.
- Kothari N, Kothari S, Choi YJ, Dey A, Briles DE, Rhee DK, et al. A bivalent conjugate vaccine containing PspA families 1 and 2 has the potential to protect against a wide range of *Streptococcus pneumoniae* strains and *Salmonella Typhi*. *Vaccine*. 2015 Feb 4;33(6):783–8.
- Kotler L, Greenberg D, Givon-Lavi N, van der Beek BA, Dagan R, Ben-Shimol S. Decline in pneumococcal nasopharyngeal carriage in children 6–23 months with respiratory illnesses following pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Vaccine*. 2021 Sep 24;39(40):5757–61.
- Kwadha CA, Ong'Amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Vol. 8, *Insects*. MDPI AG; 2017.
- Lebon A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Hooijkaas H, Verbrugh HA, van Wamel WJB, et al. The inverse correlation between *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* colonization in infants is not explained by differences in serum antibody levels in the generation R study. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011 Jan;18(1):180–3.
- Lee J, Yoon Y, Kim EJ, Lee D, Baek Y, Takano C, et al. 23-valent polysaccharide vaccine (PPSV23) targeted serotype-specific identification of *Streptococcus pneumoniae* using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *PLoS ONE*. 2021 Feb 1;16(2 February).
- Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiology Spectrum*. 2019 Apr 12;7(2).
- Luther MK, Arvanitis M, Mylonakis E, LaPlante KL. Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming

- Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(8):4612–20.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Vol. 10, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2004. p. 190–212.
- Marín M, Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, González ÁG, Rodríguez-Sánchez B, et al. Accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other species within the *Streptococcus mitis* group by peak analysis using MALDI-TOF MS. *Frontiers in Microbiology*. 2017 Apr 25;8(APR).
- Marquart ME. Pathogenicity and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Cutting to the chase on proteases. Vol. 12, *Virulence*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 766–87.
- Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, Poh CL. Development of next generation streptococcus pneumoniae vaccines conferring broad protection. Vol. 8, *Vaccines*. MDPI AG; 2020.
- Matanock A, Lee G, Gierke R, Kobayashi M, Leidner A, Pilishvili T. Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Among Adults Aged ≥65 Years: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices [Internet]. 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/imz/advisory-committee/13-valent-pneumococcal-conjugate-vaccine-and-23-valent-pneumococcal-polysaccharide-vaccine-among-adults-aged-65-years.html>.
- Mehr S, Wood N. *Streptococcus pneumoniae* - a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. Vol. 13, *Paediatric Respiratory Reviews*. 2012. p. 258–64.
- Mills RO, Abdullah MR, Akwetey SA, Sappor DC, Cole I, Baffuor-Asare M, et al. Post-vaccination streptococcus pneumoniae carriage and virulence gene distribution among children less than five years of age, cape coast, Ghana. *Microorganisms*. 2020 Dec 1;8(12):1–18.
- Ministério da Saúde (MS). Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais [Internet]. 5ª. 2019a. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_centros_imunobiologicos_2019.pdf.

- Ministério da Saúde (MS). Vacina pneumocócica conjugada 13-valente contra doenças pneumocócicas em pacientes de risco [Internet]. 2019b. Available from: <http://conitec.gov.br/>
- Ministério da Saúde (MS). Instrução normativa referente ao calendário nacional de vacinação 2020. In: Programa Nacional de Imunizações/Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis/Secretaria de Vigilância em Saúde [Internet]. 2020. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/11/manual-centros->
- Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors and variation. Vol. 16, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 411–8.
- Miyaji EN, Vadesilho CFM, Oliveira MLS, Zelanis A, David EB, Ho PL. Evaluation of a vaccine formulation against *streptococcus pneumoniae* based on choline-binding proteins. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015 Feb 1;22(2):213–20.
- Morais V, Texeira E, Suarez N. Next-generation whole-cell pneumococcal vaccine. Vol. 7, *Vaccines*. MDPI AG; 2019.
- Moschioni M, Emolo C, Biagini M, Maccari S, Pansegrau W, Donati C, et al. The two variants of the *Streptococcus pneumoniae* pilus 1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo. *Infection and Immunity*. 2010 Dec;78(12):5033–42.
- Mott MP, Caierão J, Cunha GR, del Maschi MM, Pizzutti K, d'Azevedo P, et al. Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2019;147.
- Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). NCBI, 2021 [Internet]. *Streptococcus pneumoniae*. 2021 [cited 2021 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1313&mode=info>
- Nakahashi-Ouchida R, Uchida Y, Yuki Y, Katakai Y, Yamanoue T, Ogawa H, et al. A nanogel-based trivalent PspA nasal vaccine protects macaques from intratracheal challenge with pneumococci. *Vaccine*. 2021 Jun 8;39(25):3353–64.

- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH). Features of an Immune Response [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 19]. Available from: <https://www.niaid.nih.gov/research/immune-response-features>
- Odutola A, Ota MOC, Antonio M, Ogundare EO, Saidu Y, Foster-Nyarko E, et al. Efficacy of a novel, protein-based pneumococcal vaccine against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants: A phase 2, randomized, controlled, observer-blind study. *Vaccine*. 2017 May 2;35(19):2531–42.
- Olsen RJ, Ebru Watkins M, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. Virulence of serotype M3 group a streptococcus strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence*. 2011;2(2).
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Informe regional de SIREVA II, 2018. 2021.
- Paton JC, Trappetti C. *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide . *Microbiology Spectrum*. 2019 Apr 12;7(2).
- Pérez-Dorado I, Galan-Bartual S, Hermoso JA. Pneumococcal surface proteins: When the whole is greater than the sum of its parts. *Molecular Oral Microbiology*. 2012 Aug;27(4):221–45.
- Pinto HB, Brust FR, Macedo AJ, Trentin DS. The antivirulence compound myricetin possesses remarkable synergistic effect with antibacterials upon multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*. 2020 Dec 1;149.
- Pinto TCA, Souza ARV, de Pina SECM, Costa NS, Neto AAB, Neves FPG, et al. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Oct;51(10):3242–9.
- Van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Vol. 374, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2009. p. 1543–56.
- Ramakrishnan K, Sparks RA, Berryhill WE. Diagnosis and Treatment of Otitis Media [Internet]. Vol. 76. 2007. Available from: www.aafp.org/afp.

- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012;(70).
- Ramirez M. *Streptococcus pneumoniae*. In: *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Elsevier Ltd; 2014. p. 1529–46.
- Reglinski M, Ercoli G, Plumptre C, Kay E, Petersen FC, Paton JC, et al. A recombinant conjugated pneumococcal vaccine that protects against murine infections with a similar efficacy to Prevnar-13. *npj Vaccines*. 2018 Dec 1;3(1).
- Palma ALR, Domingues N, de Barros PP, Brito GNB, Jorge AOC. Influence of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguinis* on virulence of *Candida albicans*: in vitro and in vivo studies. *Folia Microbiologica*. 2019 Mar 15;64(2):215–22.
- Sadowy E, Hryniewicz W. Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other *Mitis streptococci*: importance of molecular methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [Internet]. 2020;39:2247–56. Available from: <https://orcid.org/0000-0003-0284-6440>
- Safari D, Rijkers G, Snippe H. The Future of Synthetic Carbohydrate Vaccines: Immunological Studies on *Streptococcus pneumoniae* Type 14. In: *The Complex World of Polysaccharides*. InTech; 2012.
- Salsabila K, Paramaiswari WT, Amalia H, Ruyani A, Tafroji W, Winarti Y, et al. Nasopharyngeal carriage rate, serotype distribution, and antimicrobial susceptibility profile of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children under five years old in Kotabaru, South Kalimantan, Indonesia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2021;
- Shaik MM, Lombardi C, Trindade DM, Fenel D, Schoehn G, di Guilmi AM, et al. A structural snapshot of type II pilus formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Sep 11;290(37):22581–92.
- Sheehan G, Dixon A, Kavanagh K. Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology (United Kingdom)*. 2019;165(8):863–75.
- Silva LN, da Hora GCA, Soares TA, Bojer MS, Ingmer H, Macedo AJ, et al. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus*

- infection and inhibits multiple virulence factors. *Scientific Reports*. 2017 Dec 1;7(1).
- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT). Dia Mundial da Pneumonia: 12 de novembro [Internet]. 2021 [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://sbpt.org.br/portal/pneumonia-2020/>
- Subramanian K, Henriques-Normark B, Normark S. Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. Vol. 21, *Cellular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019.
- Swiatlo E, McDaniel LS. Mucosal vaccines for streptococcus pneumoniae. In: *Mucosal Vaccines: Innovation for Preventing Infectious Diseases*. Elsevier; 2019. p. 597–609.
- Syed S, Hakala P, Singh AK, Lapatto HAK, King SJ, Meri S, et al. Role of pneumococcal nanA neuraminidase activity in peripheral blood. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019;9(JUN).
- Tavares DA, Handem S, Carvalho RJ, Paulo AC, de Lencastre H, Hinds J, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* by a real-time PCR assay targeting SP2020. *Scientific Reports*. 2019 Dec 1;9(1).
- van Tonder AJ, Bray JE, Quirk SJ, Haraldsson G, Jolley KA, Maiden MCJ, et al. Putatively novel serotypes and the potential for reduced vaccine effectiveness: capsular locus diversity revealed among 5405 pneumococcal genomes. *Microbial genomics*. 2016 Oct 1;2(10):000090.
- Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. Vol. 7, *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 214–29.
- UniProt. UniProt [Internet]. 2021 [cited 2021 Oct 13]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
- Velikova N, Kavanagh K, Wells JM. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Streptococcus suis*. *BMC Microbiology*. 2016 Dec 15;16(1):1–9.
- Virulence factors of pathogenic bacteria (VFDB). rlrA islet - *Streptococcus*. 2021.
- Visan L, Rouleau N, Proust E, Peyrot L, Donadieu A, Ochs M. Antibodies to PcpA and PhtD protect mice against *Streptococcus pneumoniae* by a

- macrophage- and complement-dependent mechanism. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2018 Feb 1;14(2):489–94.
- Watkins LKF, Milucky JL, McGee L, Siné St-Surin F, Liu P, Tran T, et al. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* Among Young Children in Haiti Before Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction. *The Journal of infectious diseases*. 2021 Sep 1;224(3):S248–57.
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: Transmission, colonization and invasion. Vol. 16, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 355–67.
- World Health Organization (WHO). Pneumococcal Vaccines. *Wkly Epidemiol Re*. 1999;74:177–83.
- Xiao K, Wang X, Yu H. Comparative studies of catalytic pathways for *Streptococcus pneumoniae* sialidases NanA, NanB and NanC. *Scientific Reports*. 2019 Dec 1;9(1).
- Zhang Y, Masi AW, Barniak V, Mountzouros K, Hostetter MK, Green BA. Recombinant PhpA protein, a unique histidine motif-containing protein from *Streptococcus pneumoniae*, protects mice against intranasal pneumococcal challenge. *Infection and Immunity*. 2001;69(6):3827–36.

3 JUSTIFICATIVA

Visto a necessidade de desenvolvimento de uma vacina que cubra de forma universal todos os sorotipos de *S. pneumoniae* existentes, avaliar e comparar a prevalência de genes que codificam proteínas de superfície entre isolados de pneumococo obtidos de portadores e de doença invasiva, pode abrir portas a novas oportunidades, pois o conhecimento sobre o papel de cada um desses fatores de virulência é ainda insuficiente, pouco se sabe por que apenas uma pequena parte dos portadores desta bactéria desenvolve a doença.

Embora exista uma necessidade urgente de novas terapias para combater ou prevenir infecções pneumocócicas, esse processo é muito demorado e caro. Uma das etapas desse processo é testar novas metodologias em modelos *in vivo*. *G. mellonella* é um modelo alternativo animal invertebrado, barato, com imunidade inata similar a dos humanos, podendo ser mantido a temperatura de 37°C, isento do comitê de ética e não existem muitos estudos relacionando *S. pneumoniae* e *G. mellonella*, demonstrando ser um campo aberto a ser explorado, com potencial de inovação e originalidade.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar e comparar a presença de genes relacionados a proteínas de superfície entre isolados de *S. pneumoniae* de portadores saudáveis (P) e doença pneumocócica invasiva (DPI) com foco particular no sorotipo 19A, sorotipo associado à doença pneumocócica invasiva e multirresistência, surgindo em várias partes do mundo. Além disso, empregamos o modelo de infecção por *G. mellonella* para estudar a virulência de isolados distintos de P e DPI *in vivo* e avaliar o papel de genes putativos de virulência pneumocócica na sobrevivência de *G. mellonella*.

4.2 Objetivos específicos

1. Realizar painel comparativo de análise de genes de virulência entre os pneumococos (P e DPI);
2. Determinar a virulência das amostras positivas para pneumococos (P e DPI) no modelo alternativo de larvas de *Galleria mellonella*.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 Manuscrito

“*Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from carriers and invasive diseases: virulence gene profile and pathogenicity in a *Galleria mellonella* model”

Artigo submetido à revista European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (<https://www.springer.com/journal/10096>), cujo as normas para a publicação estão disponibilizadas em anexos deste documento, no item 7.5.

Fator de Impacto: 5.103 (2021)

ISSN: 09349723

Qualis: Estrato A3



Streptococcus pneumoniae serotype 19A from carriers and invasive disease: virulence gene profile and pathogenicity in a *Galleria mellonella* model

Josiane Trevisol Leal^{1,2} · Muriel Primon-Barros¹ · Amanda de Carvalho Robaina¹ · Kauana Pizzutti¹ · Mariana Preussler Mott¹ · Danielle Silva Trentin² · Cícero Armídio Gomes Dias¹

Received: 26 July 2022 / Accepted: 27 January 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Purpose This study aimed to evaluate and compare the presence of genes related to surface proteins between isolates of *Streptococcus pneumoniae* from healthy carriers (HC) and invasive pneumococcal disease (IPD) with a particular focus on serotype 19A.

Methods The presence of these genes was identified by real-time PCR. Subsequently, we employed the *Galleria mellonella* larval infection model to study their effect on pathogenicity in vivo.

Results The percentage of selected virulence genes was similar between the HC and IPD groups ($p > 0.05$), and the genes *lytA*, *nanB*, *pavA*, *pcpA*, *phtA*, *phtB*, *phtE*, *rrgA*, and *sipA* were all present in both groups. However, the virulence profile of the isolates differed individually between HC and IPD groups. The highest lethality in *G. mellonella* was for IPD isolates ($p < 0.01$), even when the virulence profile was the same as compared to the HC isolates or when the *nanA*, *pspA*, *pspA-famI*, and *pspC* genes were not present.

Conclusions The occurrence of the investigated virulence genes was similar between HC and IPD *S. pneumoniae* serotype 19A groups. However, the IPD isolates showed a higher lethality in the alternative *G. mellonella* model than the HC isolates, regardless of the virulence gene composition, indicating that other virulence factors may play a decisive role in virulence. Currently, this is the first report using the in vivo *G. mellonella* model to study the virulence of clinical isolates of *S. pneumoniae*.

Keywords *Streptococcus pneumoniae* · Serotype 19A · Virulence · *Galleria mellonella*

Introduction

Streptococcus pneumoniae, also known as the pneumococcus, is one of the pathogens posing the greatest threat to human health [1, 2]. In 2016, it was the leading cause of morbidity and mortality worldwide, contributing to over one million deaths among children younger than 5 years and elderly adults aged over 70 years [3]. It commonly colonizes the upper respiratory tract and is associated with mild infections from otitis media and sinusitis to more severe ones, including pneumonia. Lung empyema, meningitis, and bacteremia occur in invasive pneumococcal disease (IPD) [4, 5].

The 23-valent pneumococcal polysaccharide (PPV23) and the pneumococcal conjugate vaccines (PCV10 and 13) prevent pneumococcal diseases by targeting the pneumococcal polysaccharide capsule [6]. However, over 100 different capsular types have been documented, and vaccines cover

✉ Danielle Silva Trentin
daniellest@ufcspa.edu.br

¹ Laboratório de Microbiologia Molecular, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil

² Laboratório de Bacteriologia & Modelos Experimentais Alternativos, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPGBIO), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil

only a limited number of serotypes [7]. Serotype 19A is not included in PCV10 and has emerged as a prevalent serotype among children and adults in several countries using this vaccine, including Brazil [8, 9]. The broad use of pneumococcal conjugate vaccines (PCV) has successfully reduced pneumococcal disease associated with serotypes included in the vaccines [10]. As a result, IPD epidemiology has changed, and non-vaccine types have increased in different countries [11–13].

Pneumococci produce polysaccharide capsules and several proteins that play a primary role in the colonization and development of infectious processes [14, 15]. Virulence-associated surface proteins primarily act by mediating adhesion to human epithelial cells and are considered potential targets for the prevention of pneumococcal infections [16]. Promising vaccine candidates that target virulence-associated proteins have been reported, including (i) the autolysin *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidase (*lytA* gene) [17], a primary cell wall amidase facilitating the release of the pneumolysin toxin (a toxin inducing cell death through pore formation and toxin-induced apoptosis) [17–19]; (ii) proteins involved in the interaction with the complement system, such as neuraminidases A and B (*nanA*, *nanB* genes) [20, 21]; the *triad* A, B, D, and E from pneumococcal histidine (*phtA*, *phtB*, *phtD*, and *phtE* genes) [22–24]; the protein A of the pneumococcal surface (*pspA* and *pspA-famI* genes) [25]; and the choline-binding protein A (*pspC* or *cbpA* gene); and (iii) proteins that mediate bacterial adhesion to epithelial cells, such as the pneumococcal choline-binding protein A (*pcpA* gene) [26], and pilus-1 and pilus-2 (*rrgA* and *sipA* genes, respectively) [27]. Note that the functions of the above proteins were not described exhaustively.

Pathogenesis investigation traditionally requires the use of animal models. Mammalian models are often used for infection studies. However, it is an expensive model, which requires a larger structure for its maintenance and a qualified and trained workforce. In addition, there is also a very strong movement involving ethical issues, as most in vivo tests have lethality as a cut-off point, so many rules and acts must be followed, aiming at animal well-being [28, 29]. The use of alternative models contributes to reducing the number of mammals in experimentation, and it also reinforces the importance of applying the “3Rs” principles (replacement, reduction, and refinement) in animal experimentation [30]. In this sense, insects have proved beneficial in the preliminary steps of experimental research as they are ethically more acceptable when compared to mammals, are cheaper, and are generally less labor-intensive [31, 32]. *Galleria mellonella* larvae have been broadly used to study microbial pathogenesis, virulence mechanisms, immune responses, and antimicrobial activities [33–37]. Many advantages exist to using the *G. mellonella* model for infectious diseases, including the positive correlation between the virulence of

different microorganisms in *G. mellonella* and murine models, the possibility of conducting experiments at 37 °C, and the easy inoculation of defined concentrations of microorganisms or chemical agents [38, 39]. Few studies have used the *G. mellonella* model to investigate pneumococci [see 40–44].

This study aimed to evaluate and compare the occurrence of genes related to surface proteins between isolates of *S. pneumoniae* from healthy carriers (HC) and patients with invasive pneumococcal disease (IPD) with a particular focus on serotype 19A, a serotype associated with invasive pneumococcal disease and multidrug resistance, emerging in several parts of the world [12]. Furthermore, we employed the *G. mellonella* infection model to study the virulence of these HC and IPD isolates in vivo and to evaluate the role of putative pneumococcal virulence genes in *G. mellonella* survival experiments.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Serotype 19A *S. pneumoniae* was isolated from 11 HC and 11 patients with IPD. The HC isolates were obtained from nasopharyngeal (NP) swabs of volunteers (adults aged ≥ 65 years or from children between 18 and 59 months) in 2018 and 2019, in the Rio Grande do Sul, Brazil, as part of a surveillance study. IPD isolates were obtained from patients from three different hospitals located in the south of Brazil. All isolates had previously been serotyped, genotyped, and stored in an ultra-freezer (– 80 °C), in the Pneumococcus Collection of the Molecular Microbiology Laboratory of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre. *S. pneumoniae* ATCC BAA-255 (R6), a non-encapsulated strain derived from the capsular type 2 clinical isolate strain D39, and ATCC BAA-334 (TIGR4), a serotype 4 capsulated strain, were specified as controls in all experiments. Both strains have in their genomes genes that encode surface proteins, which can be used as a positive control in molecular analysis and to compare an encapsulated versus a non-encapsulated strain. All strains were grown on 5% sheep blood agar (Laborclin Ltda, Brazil) during incubation (37 °C, 18–24 h) at a 5% CO₂ atmosphere.

Virulence genes selection and detection

Genes for *S. pneumoniae* virulence-associated proteins were selected based on a literature review [45, 46]. Among them, 14 genes (*lytA*, *nanA*, *nanB*, *pavA*, *pcpA*, *phtA*, *phtB*, *phtD*, *phtE*, *rrgA*, *sipA*, *pspA*, *pspA-famI*, *pspC*) were related to pneumococcal virulence, based on pathophysiological arguments supported by animal models. These genes were

chosen mainly for their potential in studies evaluating them as the next-generation vaccine candidates [17–27]. The primers were designed using Primer3web version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>). The specificity of primer sequences was determined by comparing available sequences using the BLAST database search program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The RT-PCR reaction conditions optimization was performed by testing primer concentrations between 0.25 and 0.60 μM (Table S1). For molecular analysis of pneumococcal virulence genes, the DNA was extracted using Chelex® 100 resin solution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and Proteinase K (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) [8]. To prepare the Chelex® plus Proteinase K, it was necessary to add 0.5 g of Chelex reagent plus 100 μL of Proteinase K at a concentration of 200 mg/ml for a final volume of 10 mL. Two hundred microliters of this solution (5% Chelex + proteinase K) was distributed in microcentrifuge tubes. Colonies of *S. pneumoniae* cultivated on sheep blood agar (according to item 2.1) were transferred to microcentrifuge tubes containing the solution; a vortex was applied for 10–20 s. Tubes were incubated in a water bath at 56 °C for 1 h; vortexed for 10 s. In the next step, tubes were incubated in a dry bath at 95 °C for 10 min and vortexed for 10 s. Tubes were centrifuged at 12,000 RPM for 3 min, and the supernatants were used for further steps. The extracted DNA was quantified using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA).

Real-time PCR was performed on an Applied Biosystems® 7500 (Thermo Fisher Scientific, USA) instrument. PCR reactions were conducted in a 10- μL final volume containing 5 μL of GoTaq DNA polymerase (Promega, USA), DNA of 20 ng/ μL for each reaction, varying concentrations of primers, and ultrapure water (Promega, USA). The PCR mixture without a DNA template was used as the negative control. The assays were conducted at least in duplicate. Strains R6 and TIGR4 were used as positive controls for target genes [45].

Amplified reaction products were sequenced for validating the used primers. An ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 kit and POP-7® polymer on an ABI PRISM®3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) were used based on the manufacturer's recommendations. All amplicons presented expected sequences with more than 90% identity with NCBI-published data on target genes.

***Galleria mellonella* laboratory housing conditions**

The entire life cycle of *G. mellonella* was maintained in our laboratory in a controlled environment at temperatures ranging from 28 to 32 °C. The larvae were fed a diet containing a mixture of honey and various flours. This mixture is carried out by our own research group. To prepare the diet, all components were weighed, mixed well, autoclaved, and

then dispensed into pots where the larvae were maintained. Only healthy-looking larvae without signs of melanization were used. Groups of ten *G. mellonella* larvae, weighing 220–260 mg, were utilized for in vivo assays. At the end of the experiment, the larvae that were used are frozen, autoclaved, and then properly discarded. No approval by the institution's animal welfare committee is needed.

***In vivo S. pneumoniae* virulence**

Five isolates from HC and five isolates from IPD groups were selected to have their virulence evaluated in vivo based on the characteristics of their virulence gene profiles. The criteria used were the following: (i) virulence gene identified in few isolates (e.g., CRI-040 and 25–14 were the only ones possessing *nanA* gene), (ii) isolates presenting the lowest (e.g., CRI-052, 49–14) and highest (e.g., CRI-066, 112–13) percentage of virulence genes, and (iii) isolates exhibiting a very distinct virulence gene profile from others (e.g., sample 14–14, the only isolate without *phtD* gene and ADU-012, CRI-54, and 60–14, the three only isolates not possessing *pspA* gene).

Bacterial suspensions in sterile PBS (optical density in 620 nm of 1.5) and serial dilutions were prepared as inoculum for each strain/isolate tested. Fifty microliters of bacterial inoculum was added to a tube containing 450 μL of PBS and tenfold serial dilutions (ranging from 10^{-1} to 10^{-10}) were applied (Fig. 1A). The inoculum was administrated to larvae into the hemocoel using a 10 μL Hamilton syringe at the last right proleg (Fig. 1B). The inoculum concentration was determined by counting the number of colony-forming units (CFU) on 5% sheep blood agar after 18–24 h incubation at 37 °C + 5% CO_2 (Fig. 1C). Survival curves with *S. pneumoniae* concentration ranging from 10^3 to 10^7 CFU/larva were plotted. The non-infected control groups received only 10 μL of sterile PBS (vehicle). Subsequently, all larvae were incubated at 37 °C in a sterilized Petri dish and assessed for survival every 24 h up to 120 h post-infection. Larvae were considered dead when they displayed no movement responding to touch. Experiments were repeated at least three times (ten larvae per group). R6 and TIGR4 were control strains.

Statistical analysis

Qualitative variables were represented by absolute and relative frequencies. Differences between these variables were verified using Fisher's exact tests. Quantitative variables were obtained using the Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors correction and the Shapiro–Wilk test. Moreover, the homogeneities of variances were confirmed by Levene's test. Pearson's linear correlation coefficient was determined. Means and standard deviations were estimated for each variable. The ANOVA test was used to reveal significant

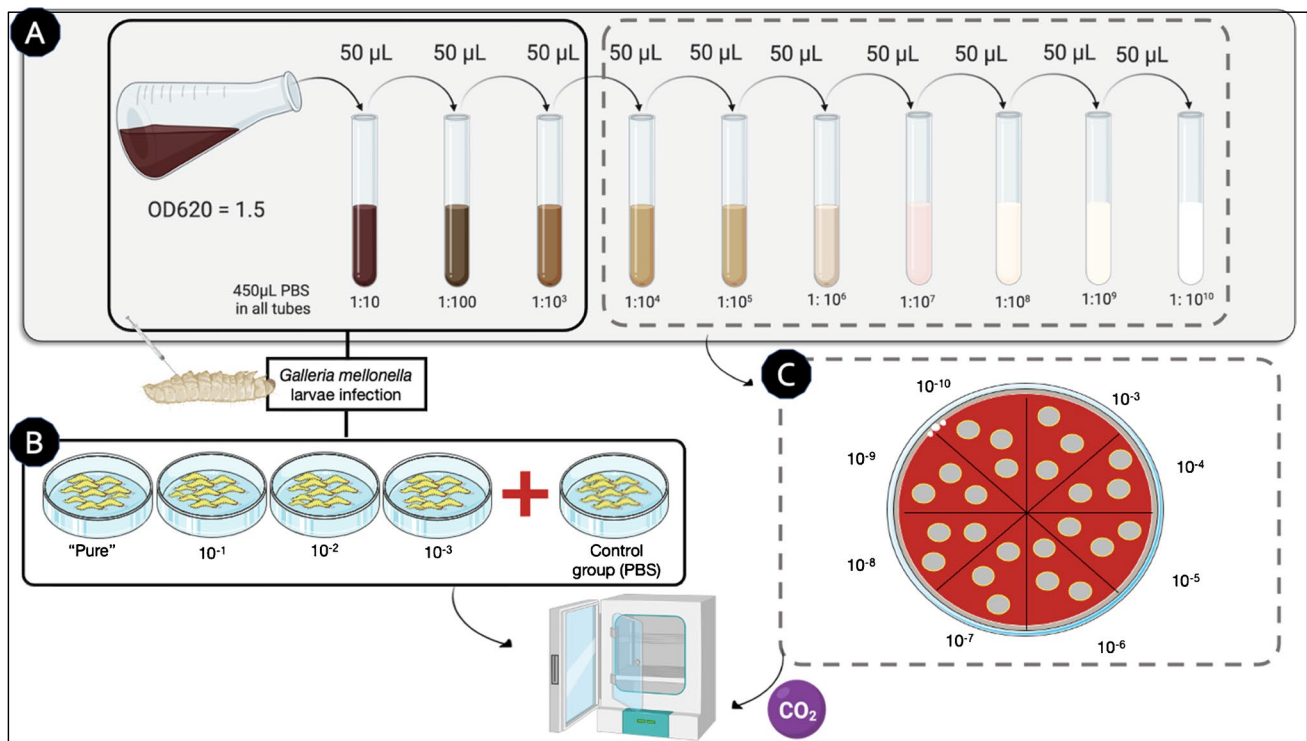


Fig. 1 In vivo *S. pneumoniae* virulence assay. **A** Bacterial suspensions were prepared in sterile PBS measured at an optical density of 620 nm of 1.5. Then, serial dilutions were prepared as inoculum for each strain/isolate tested. **B** Bacterial inocula were injected into groups of 10 larvae using a 10 µL Hamilton syringe into the last

right proleg. These groups were then incubated at 37 °C in sterile Petri dishes and assessed daily for survival every 24 h until 120 h post-infection after touch stimulation. **C** Inoculum concentration was determined by counting the number of colony-forming units (CFU) on 5% sheep blood agar after 18–24 h incubation at 37 °C + 5% CO₂

differences among quantitative variables. Tukey's post hoc test separated the means for the HC and IPD groups. Type I error rate (alpha) was 5% ($p \leq 0.05$). SPSS Software (version 23.0, Chicago, IL Statistical Package for Social Sciences) analyzed the data. In vivo *Galleria mellonella* survival analysis was accomplished using Kaplan–Meier survival curves (GraphPad Prism 9.0.0). LD₅₀ is the bacterial concentration that causes the death of 50% (one-half) of a group of test animals. The 95% confidence interval (CI) was determined for each strain/isolate utilizing the percentage data of larvae survival on the fifth day of infection with different bacterial inoculum through a nonlinear regression model (GraphPad Prism 9.0.0).

Results

Clinical characteristics and presence of virulence genes among isolates

Ten clinical isolates of HC were from children aged between 17 and 43 months, and only one was from an adult aged 77 years. Two clinical isolates from patients with IPD were from children, one aged 12 months and the other aged

24 months. The other nine IPD isolates were from adult patients who ranged between 30 and 72 years. None of the isolates (11 HC and 11 IPD) exhibited all the selected virulence genes in this study (Table 1). The highest coverage of tested genes (92.8%) was for isolates CRI-040 (HC), CRI-066 (HC), 112–13 (IPD), 115–13 (IPD), 001–14 (IPD), and 25–14 (IPD), while the lowest percentage (71.4%) was for isolates ADU-012 (HC), 014–14 (IPD), and 060–14 (IPD).

The same profile was observed for CRI-040 (HC) and 25–14 (IPD) isolates, the only isolates positive for the *nanA* gene. The 14–14 (IPD) was the only isolate where the *phdD* gene was not detected. The absence of the *pspA* gene was discernable in the ADU-012 (HC), CRI-054 (HC), and 60–14 (IPD) isolates. The *pspA-fam1* gene was detected in the CRI-066 (HC), 112–13 (IPD), 115–13 (IPD), and 001–14 (IPD) isolates, which were also the ones with the highest percentage of genes (92.8%) along with CRI-040 (HC) and 25–14 (IPD).

Distribution of selected virulence genes among HC and IPD groups

When isolates were compared between HC and IPD groups, a similar presence of selected virulence genes in the two

Table 1 Virulence gene profile in serotype 19A *S. pneumoniae* isolates

Isolate	Specimen	Age	Presence of genes							Genes presence (%)						
			lytA	nanA	nanB	phxA	phxB	phuD	phxE	pspA	pspA-famI	pspC	pavA	pcpA	rrgA	sipA
HC																
ADU—012	NP	77 y	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	10 (71.4)
CRI—015	NP	26 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12 (85.7)
CRI—035	NP	17 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12 (85.7)
CRI—038	NP	39 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	11 (78.5)
CRI—040	NP	27 m	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	13 (92.8)
CRI—051	NP	43 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	11 (78.5)
CRI—052	NP	43 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	11 (78.5)
CRI—054	NP	28 m	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	11 (78.5)
CRI—066	NP	23 m	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13 (92.8)
CRI—072	NP	29 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12 (85.7)
CRI—086	NP	25 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	11 (78.5)
IPD																
042-09	Blood	37 y	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12 (85.7)
055-11	Blood	38 y	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	11 (78.5)
112-13	Pleural	24 m	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13 (92.8)
115-13	Blood	47 y	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13 (92.8)
001-14	Blood	33 y	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13 (92.8)
014-14	Blood	72 y	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	10 (71.4)
016-14	Blood	50 y	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12 (85.7)
025-14	Blood	30 y	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	13 (92.8)
049-14	Blood	61 y	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	11 (78.5)
060-14	Blood	69 y	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	10 (71.4)
065-14	Blood	12 m	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12 (85.7)
Controls																
ATCC R6	Control		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14 (100.0)
ATCC TIGR4	Control		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14 (100.0)

The present table shows the absence (-) or presence (+) of virulence factor genes for each isolate

Strains R6 and TIGR4 were used as positive controls for target genes

Abbreviation: HC healthy carriers, IPD invasive pneumococcus disease, NP nasopharynx, y years, m months

groups existed. Regardless of where they belonged, all isolates carried the genes *lytA*, *nanB*, *pavA*, *pcpA*, *phtA*, *phtB*, *phtE*, *rrgA*, and *sipA*. No statistical difference existed for each gene (Table 2). On the contrary, the *nanA* gene was the least frequent in both groups and was only present in 9% of isolates (1 isolate from each group). The *pspA-famI* gene also exhibited a low percentage between HC (9%) and IPD (27.3%) isolates, while the *pspA* gene was detected in almost all HC (81.8%) and IPD (90.9%) isolates. The *phtD* gene was present in all HC isolates and most IPD isolates (90.9%). Finally, the *pspC* gene was more variable between the groups; it was present in 54.6% of HC and 63.6% of IPD isolates.

***S. pneumoniae* 19A isolates and dose-dependent mortality in *G. mellonella* larvae**

Five isolates from HC and five isolates from IPD groups were selected, based on what has been described in the methods Sect. 2.4, to study their virulence in vivo. Larvae inoculated with PBS buffer (non-infected control larvae group) were alive throughout the experiment. In contrast, *S. pneumoniae* infection led to dose-dependent mortality in *G. mellonella* larvae (Fig. 2A–E for HC isolates; F, J for IDP isolates; and K and L for control strains). All larvae infected with the higher *S. pneumoniae* bacterial concentration (10^7 and 10^6 CFU/larva) died within the first 24 h, except for the 112–13 (IPD) (Fig. 2F) and 25–14 (IPD) (Fig. 2H) isolates, which required an additional 24 h to be lethal to all the larvae. A higher survival was observed with a lower

concentration. The 10^5 CFU/larva concentration resulted in a variable outcome for all groups, while the lowest concentration (10^4 CFU/larva) allowed larval survival at about 80%.

Lethality in the IPD group during in vivo assessment

The lethal dose capable of killing 50% of the group of animals (LD_{50}) was determined using data from the survival curve on the fifth day of experimentation. The isolates from the same group (HC or IPD) also exhibited distinct in vivo virulence ($p=0.02$ for the HC group and <0.01 for the IPD group) (Table 3). In the group of HC isolates, the most virulent strain was the CRI-052 isolate (LD_{50} : 1.5×10^5 CFU/larva—Table 3), and the least virulent was the CRI-054 isolate (LD_{50} : 6.0×10^5 CFU/larva—Table 3). Within the group of IPD isolates, the most virulent strain was 025–14 isolate (LD_{50} : 1.2×10^4 CFU/larva—Table 3), and the least virulent was 60–14 isolate (LD_{50} : 2.9×10^5 CFU/larva—Table 3). Among isolates ADU-012, CRI-040, CRI-052, CRI-066, and 60–14 isolates, no statistical difference in LD_{50} was observed. This was the same between isolates 112–13 and 014–04 isolates; isolates 025–14 and 49–14.

When the LD_{50} averages from the two groups (HC and IPD) were compared, a significantly ($p \leq 0.05$) lower LD_{50} was observed among isolates from the IPD group (Table 4). This suggests that IPD isolates are more virulent than HC isolates.

In vivo virulence is independent of the proportions of virulence genes present in *S. pneumoniae* isolates

When we correlated the percentage of selected virulence genes and the LD_{50} value for each pneumococcal isolate, the in vivo virulence was independent of the presence of virulence genes harbored by the isolate (Table 5). For example, isolates ADU-012, 014–14, and 60–14 presented 71.4% of selected virulence genes. However, isolate 014–14 was more virulent as compared to 014–14 and 60–14, indicated by the statistically different LD_{50} values to ADU-012 and 60–14 isolates (Table 5). Additionally, the isolates CRI-052, CRI-054, and 49–14 presented 78.5% of virulence genes but showed different in vivo virulence, as suggested by the statistical difference ($p \leq 0.05$) in LD_{50} among them (Table 5).

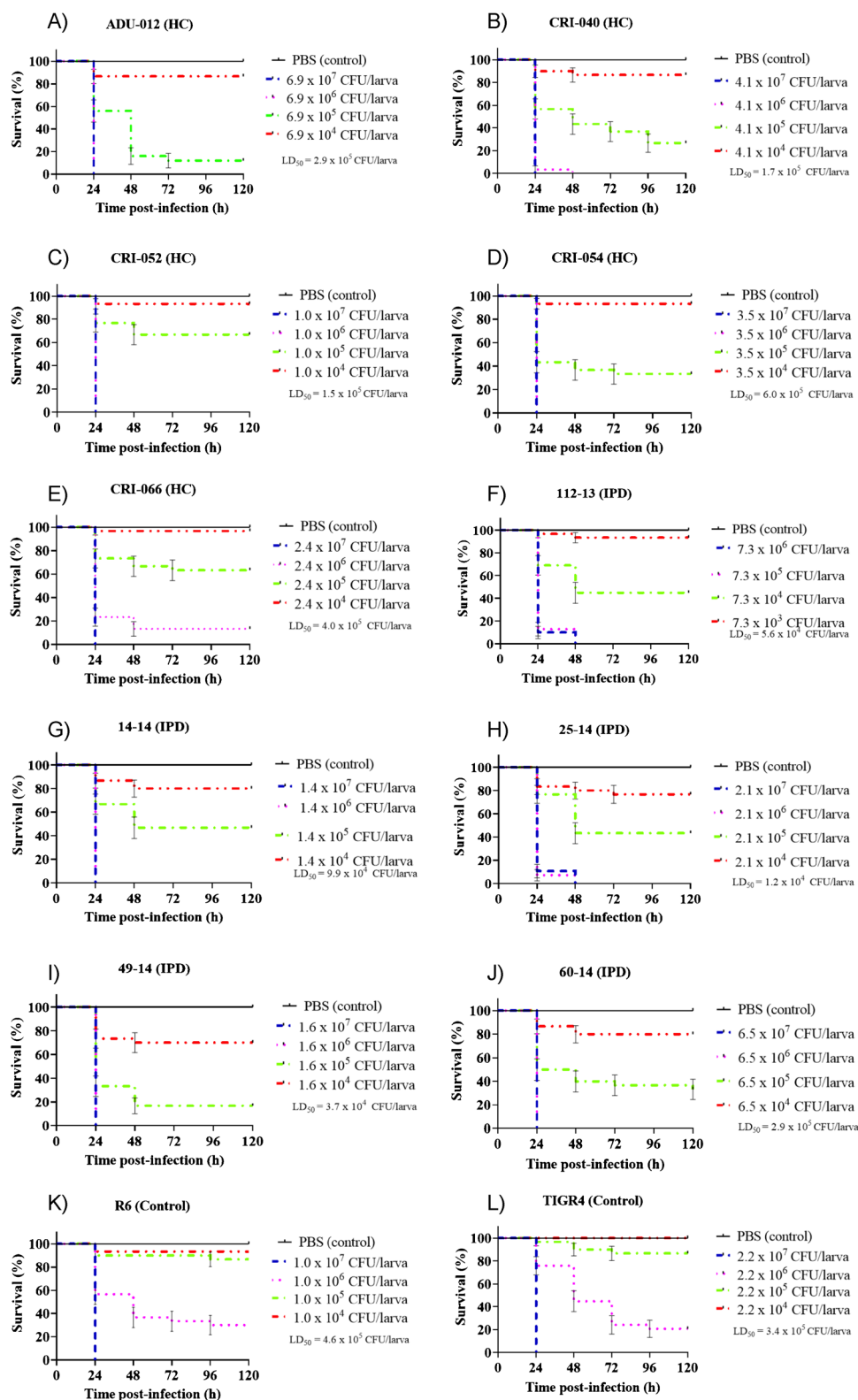
When HC and IPD isolates showed the same percentage of selected virulence genes, the IPD isolates had a lower LD_{50} and were more virulent than HC isolates. It was apparent in (i) ADU-012 (HC) versus 014–104 (IPD) with 71.4% of virulence genes, (ii) CRI-052 and CRI-054 (HC) versus 049–14 (IPD) with 78.5% of virulence genes, and (iii) CRI-040 and CRI-066 (HC) versus 112–13 and 25–14 (IPD). All possessed 92.8% of the virulence genes (Table 5).

Table 2 The distribution of virulence genes among the HC and IPD groups. Each group is composed of 11 pneumococcal isolates

Gene	HC (%)	IPD (%)	<i>p</i> value
<i>lytA</i>	11 (100.0)	11 (100)	>0.99
<i>nanA</i>	1 (9.0)	1 (9.0)	>0.99
<i>nanB</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>pavA</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>pcpA</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>phtA</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>phtB</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>phtD</i>	11 (100.0)	10 (90.9)	0.91
<i>phtE</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>pilus-1 (rrgA)</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>pilus-2 (sipA)</i>	11 (100.0)	11 (100.0)	>0.99
<i>pspA</i>	9 (81.8)	10 (90.9)	0.88
<i>pspA-famI</i>	1 (9.0)	3 (27.3)	0.58
<i>pspC</i>	6 (54.5)	7 (63.6)	0.65

Fisher's exact test was applied as appropriate. The value in parentheses represents the percentage of strains that presented the gene in question. Abbreviations: HC healthy carriers, IPD invasive pneumococcus disease

Fig. 2 Kaplan–Meier survival curves of *G. mellonella* larvae infected with clinical isolates and laboratory strains of *S. pneumoniae* isolates at different concentrations or vehicle (PBS). Kaplan–Meier curves represent the mean survival rates from three independent experiments and showed a dose-dependent response with all strains ($n = 10$ larvae per dose per strain per experiment), and error bars represent standard deviation. Survival was monitored at 24-h intervals over a period of 5 days (120 h). Insects were injected with four different dilutions of *S. pneumoniae* cultures (with the average number of bacteria injected shown in the figure). The highest dose (blue line) of any strain resulted in the mortality of all larvae. While intermediate doses (pink and green line) resulted in different death outcomes for each of the strains. The lowest dose (red line) resulted in less death in all groups. Control insects were injected with sterile PBS (black line) and included in all triplicates. No deaths occurred within this group. **A–E** HC isolates; **F, J** IPD isolates; **K** and **L** ATCC strains; LD_{50} lethal dose



Discussion

This study analyzed the presence of surface proteins virulence genes in *S. pneumoniae* serotype 19A clinical isolates

and assessed in vivo lethality in the *G. mellonella* model. We demonstrated that the IPD isolates were more lethal to *G. mellonella* as compared to HC isolates with similar virulence gene profiles.

Table 3 In vivo virulence determined through LD₅₀ values from *Galleria mellonella* larvae assays

Groups	Isolates	LD ₅₀ (CFU/larva)	95% CI (CFU/larva)	<i>p</i> value among isolates within each group
HC	ADU—012	2.9 × 10 ⁵ ^a	1.5 × 10 ⁵ —5.5 × 10 ⁵	0.02
	CRI—040	1.7 × 10 ⁵ ^a	9.3 × 10 ⁴ —3.2 × 10 ⁵	
	CRI—052	1.5 × 10 ⁵ ^a	1.0 × 10 ⁵ —2.2 × 10 ⁵	
	CRI—054	6.0 × 10 ⁵ ^b	2.8 × 10 ⁵ —1.3 × 10 ⁶	
	CRI—066	4.0 × 10 ⁵ ^a	1.9 × 10 ⁵ —9.0 × 10 ⁵	
IPD	112–13	5.6 × 10 ⁴ ^c	2.8 × 10 ⁴ —1.0 × 10 ⁵	< 0.01
	014–14	9.9 × 10 ⁴ ^c	4.2 × 10 ⁴ —2.1 × 10 ⁵	
	025–14	1.2 × 10 ⁴ ^d	5.2 × 10 ⁴ —2.7 × 10 ⁵	
	049–14	3.7 × 10 ⁴ ^d	1.6 × 10 ⁴ —8.7 × 10 ⁴	
	060–14	2.9 × 10 ⁵ ^a	1.2 × 10 ⁵ —6.7 × 10 ⁵	
Control	ATCC R6	4.6 × 10 ⁵ ^a	2.3 × 10 ⁵ —8.9 × 10 ⁵	0.42
	ATCC TIGR4	3.4 × 10 ⁵ ^a	1.4 × 10 ⁵ —8.9 × 10 ⁵	

Here, we demonstrate the group comparison of all isolates (HC × IPD × controls). The first column indicates to which group the isolates described in column two belong. Column three shows the LD₅₀ values. The fourth column shows the confidence interval for each isolate, and the last column shows whether there was a statistical difference within each group specified in column one, values in bold indicate statistical difference. The Fisher's exact test was applied, as appropriate. The LD values correspond to the mean of the experiment performed in triplicate. For the LD₅₀ (CFU/larva), ANOVA and Tukey post hoc tests were applied. Equal letters indicate no statistical difference ($p > 0.05$), while different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) among isolates

Table 4 General comparison of LD₅₀ (CFU/larva) between the group of HC and IPC isolates tested in vivo

	HC (<i>n</i> = 5)		IPD (<i>n</i> = 5)		<i>p</i> value
	Mean	SD	Mean	SD	
LD ₅₀ (CFU/larva)	3.2 × 10 ⁵	1.8 × 10 ⁵	9.8 × 10 ⁴	1.1 × 10 ⁵	< 0.01

SD standard deviation. Student's *t* test for independent samples was applied

Up to date, only a few studies have reported explicitly on serotype 19A *S. pneumoniae* virulence-related genes. Our study explored fourteen genes encoding pneumococcal surface proteins in isolates 19A, and a comparison of our results with previous studies was discussed below (Table S2). When the percentage of virulence genes in *S. pneumoniae* 19A isolates was analyzed, the *lytA*, *nanB*, and *pavA* genes were present in 100% of isolates tested, as reported in other studies

Table 5 Comparison between the percentage of virulence genes in *S. pneumoniae* isolates and the selected virulence determined through LD₅₀ values from *G. mellonella* larvae assays

Isolates	Group	Virulence genes (%)	LD ₅₀ (CFU/larva)	95% CI (CFU/larva)
ADU—012	HC	10 (71.4)	2.9 × 10 ⁵ ^a	1.5 × 10 ⁵ —5.5 × 10 ⁵
014–14	IPD	10 (71.4)	9.9 × 10 ⁴ ^b	4.2 × 10 ⁴ —2.1 × 10 ⁵
060–14	IPD	10 (71.4)	2.9 × 10 ⁵ ^a	1.2 × 10 ⁵ —6.7 × 10 ⁵
CRI—052	HC	11 (78.5)	1.5 × 10 ⁵ ^a	1.0 × 10 ⁵ —2.2 × 10 ⁵
CRI—054	HC	11 (78.5)	6.0 × 10 ⁵ ^c	2.8 × 10 ⁵ —1.3 × 10 ⁶
049–14	IPD	11 (78.5)	3.7 × 10 ⁴ ^b	1.6 × 10 ⁴ —8.7 × 10 ⁴
CRI—040	HC	13 (92.8)	1.7 × 10 ⁵ ^a	9.3 × 10 ⁴ —3.2 × 10 ⁵
CRI—066	HC	13 (92.8)	4.0 × 10 ⁵ ^a	1.9 × 10 ⁵ —9.0 × 10 ⁵
112–13	IPD	13 (92.8)	5.6 × 10 ⁴ ^b	2.8 × 10 ⁴ —1.0 × 10 ⁵
025–14	IPD	13 (92.8)	1.2 × 10 ⁴ ^b	5.2 × 10 ⁴ —2.7 × 10 ⁵

Here, we demonstrate the comparison between groups of isolates that had the same number of genes selected in this study, regardless of whether it was HC or IPD. The first group of isolates had 10/14 genes present (71.4%). The second group 11/14 genes present (78.5%). The third group 13/14 genes present (92.8%). Then, we evaluated whether within each of these groups, the LD₅₀ could differ statistically. For the LD₅₀ (CFU/larva) the ANOVA and Tukey's post hoc tests were applied. The LD values correspond to the mean of the experiment performed in triplicate. Equal letters indicate no statistical difference ($p > 0.05$), while different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$) among isolates a, b, and c indicate analysis of variance among the isolates considering $p > 0.05$ as significant

[47–51]. The presence of these genes in all isolates suggests that they are likely candidates for the next-generation vaccines as this type of vaccine targets pneumococcal surface proteins [16].

A high frequency of *phtA*, *phtB*, and *phtD* genes showed in this study contrasts with the data found in a Japanese study, which evaluated non-19A serotypes [48]. Yet, the *phtB* gene occurrence in our work was similar to those reported by a Chinese study [52] that studied serotype 19A, suggesting that *phtB* gene occurrence is a characteristic of serotype 19A. Surprisingly, the PhtD protein is cited as the most promising candidate for next-generation vaccines [53, 54]. However, studies by Cornick et al. [55] and Kawaguchiya et al. [48] reported only 28% and 61.4% occurrence of this gene in *S. pneumoniae* isolates, respectively, and serotype 19A was also not included. Otherwise, our results suggested that *phtD* was conserved among isolates of the 19A serotype (95.4%).

Genes encoding pilus proteins (*rrgA* and *sipA*) were present in all isolates, coinciding with most studies that used 19A strains [52, 56]. Contrarily, studies assessing other serotypes and serogroups did not find this high presence [57, 58]. Mills and collaborators [47] suggested a strong association between these proteins and pneumococcal serogroup 19. Nonetheless, the percentage of isolates presenting the *nanA* gene in this study (9.0%) differed from other published studies, usually finding this gene in > 90% of the isolates [48–50, 52]. However, no publication evaluated a geographical region closer to ours, rendering it impossible to assess whether this discrepancy could be due to the clonality of circulating strains.

Most studies have reported a slightly higher percentage than ours for the *pspA* gene [51, 52, 58, 59]. The presence of *pspA-famI* genes was exceedingly variable in isolates from different studies, however, isolates of serotype 19A were not part of these studies [51, 58]. The *pspC* gene percentages were also rather variable [48, 49, 55, 57]. Clonality might explain these differences, as evident in the comparative study by Blumental et al. [45], presenting distinct virulence profiles between French and African isolates, and by Cornick et al. [55], assessing isolates from four continents (Asia, Africa, Europe, and South America). The prevalence of these genes probably varied based on serotypes and circulating clones. Unfortunately, no global distribution mapping of these genes has been performed.

Our study is the first to use the in vivo model of *G. mellonella* in pathogenicity analysis of clinical isolates of *S. pneumoniae*. Additionally, we used two ATCC strains (R6 and TIGR4) as controls. Two other articles applied these standardized strains to study *S. pneumoniae* infection in *G. mellonella* [40, 41]. Evans and collaborators [41] conducted the first study using these larvae as an infection model to explore *S. pneumoniae*-host interactions. Cools and

collaborators [40] optimized and characterized the model for virulence studies and antimicrobial evaluations with *S. pneumoniae*. The larval mortality observed in both studies, after infection with the R6 and TIGR4 strains, was similar to our findings [40, 41]. The LD₅₀ found in our study for the R6 strain was 4.6×10^5 CFU/larva while Evans and Rozen [41] describe an LD₅₀ around 8.75×10^6 CFU/larva. It is possible to observe that despite the R6 strain having its virulence compromised by the absence of a capsule, it is still virulent for *G. mellonella* larvae. In order to confirm that infection with the R6 strain (non-encapsulated strain) is indeed the cause of larvae death, an analysis of the bacterial load during infection was performed (See Supplementary information – Methods and Figure S1). The results demonstrate that the mortality is associated with R6 proliferation in the host. For the TIGR4 strain, the LD₅₀ value found in the present study (LD₅₀ of 3.4×10^5 CFU/larva) was similar to those reported by Evans and Rozen (8.85×10^5 CFU/larva) [41].

Infection of *G. mellonella* larvae with both HC as well as IPD isolates resulted in a dose-dependent mortality (Fig. 2). Similarly, studies with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus suis* revealed dose-dependent results as well [60, 61]. However, we observed that IPD isolates were more virulent than HC ones, showing that virulent isolates in humans were also virulent in *G. mellonella* (Table 4), which evidences the usefulness of *G. mellonella* larvae as a model of infection to clinical isolates of *S. pneumoniae*. To exclude the possibility that relative fitness or growth characteristics may explain differences in virulence among isolates, growth curve analyses were performed for strains tested in vivo (See Supplementary information – Methods). For all strains, OD_{620nm} values increased every 30 min and growth was maximum between 7 and 8 h, demonstrating that the observed differences in virulence among isolates cannot be attributed to their growth characteristics. Otherwise, it may be explained by a difference in expression of the studied virulence genes in IPD isolates compared with HC isolates and/or because of other virulence determinants not evaluated in this study that play a fundamental role in the pathogenicity of pneumococci. Moreover, it is necessary to recognize that, in the human host, the passage of pneumococci from commensal to disease-causing status is a multifactorial phenomenon where host components have a critical role. Our study does not address this context.

Among the invasive isolates, 25–14 (IPD) was the most virulent for the larvae and harbored 92.8% of the selected virulence genes PCR. It was the only one among the invasive isolates with a positive *nanA* gene. Among the isolates from carriers, CRI-040 was the only one with a positive *nanA* gene and the most virulent within this group, suggesting that the *nanA* gene, encoding a pneumococcal adhesin [18, 62], may play a crucial role in virulence. Isolate CRI-054 (HC) was the least lethal among

all isolates, not having *nanA*, *pspA*, and *pspA-fam1* genes. However, the ADU-012 (HC) isolate, without these same genes and *pspC*, was more lethal to larvae. ADU-012 (HC) and 60–14 (IPD) had the same virulence profile and LD₅₀, implying that the invasive disease could manifest itself without *nanA*, *pspA*, *pspA-fam1*, and *pspC* genes. Moreover, 14–14 (IPD) had a similar virulence profile to 60–14 (IPD) and ADU-012 (HC). However, it did not possess the *phtD* gene, had a lower LD₅₀, and was more lethal to larvae. It demonstrated that another virulence factor compensated for *phtD* deficiency, making it questionable if *phtD* might be a good candidate target for the next-generation vaccines, as intensely suggested by Brooks and co-workers [53]. Furthermore, we observed that CRI-066 (HC) and 112–13 (IPD) showed similar virulence profiles and were only negative for the *nanA* gene. Nonetheless, they showed statistically different LD₅₀ values (4.0×10^5 CFU/larva vs 5.6×10^4 CFU/larva). The same was observed for CRI-052 (HC) and 49–14 (IPD) isolates, showing the absence of *nanA*, *pspA-fam1*, and *pspC*, with different LD₅₀ (1.5×10^5 CFU/larva vs 3.7×10^4 CFU/larva). These findings suggest that other virulence genes not included in this research likely play a role in the observed differences in virulence between IPD and HC isolates, such as other choline-binding proteins, lipoproteins, LPXTG-anchored surface proteins, or non-surface family proteins [14, 15].

This research had some limitations. We did not explore the clonality of the isolates and the expression of virulence genes of the isolates. Relatively, we also evaluated a small number of virulence genes and isolates. Moreover, the immune system of *G. mellonella* larvae is structurally and functionally similar to the innate immune response of mammals. However, the lack of an adaptive immune response must be recognized as a limiting factor [63].

Our study showed a high presence of surface protein genes among *S. pneumoniae* serotype 19A HC and IPD isolates. Usually, invasive isolates are more virulent in *G. mellonella* model, even when their virulence profile is the same as isolates from carriers or when they lack *nanA*, *pspA*, *pspA-fam1*, and *pspC*, indicating that other virulence factors may play a decisive role in virulence. Identifying a gene or combination of genes that is more frequent among the invasive isolates or that makes a critical contribution to lethality in the in vivo model would be valuable. In conclusion, this is the first report assessing the virulence of *S. pneumoniae* serotype 19A clinical isolates in the in vivo *G. mellonella* model. Here, we show that invasive isolates are more virulent as compared to isolates from carriers and demonstrate the power of the *G. mellonella* model as an in vivo tool to study the virulence of pneumococcal isolates.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04560-6>.

Acknowledgements We thankfully acknowledge Nicole Hiller Bondarczuk for the technical assistance in *G. mellonella* laboratory housing, Grasiela Agnes for helping us with the amplicon sequencing, and the UFCSPA Research Support Nucleus, especially Cristiane Bündchen from Núcleo de Apoio à Pesquisa e Pós-Graduação (Nupesq) – PROPPG by the statistical assistance.

Author contributions Josiane Trevisol Leal: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, writing—original draft, and writing—review and editing. Amanda de Carvalho Robaina: investigation and visualization. Kauana Pizzutti: investigation, resources, and visualization. Mariana Preussler Mott: investigation, resources, and visualization. Muriel Primon-Barros: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, resources, writing—review and editing, supervision, project administration, and funding acquisition. Danielle Silva Trentin: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, resources, writing—review and editing, supervision, project administration, and funding acquisition. Cícero Armídio Gomes Dias: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, resources, writing—review and editing, supervision, project administration, and funding acquisition.

Funding This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil—Universal grant number 443150/2014–1 and fellowships—process number 88887.597507/2021–00 and grant number 308617/2021–5) and by the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/Brazil—PRONEM process number 1871–25511/13–4 and Public Notice FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017—PPSUS—grant agreement 17/2551–0001453–7) and also to UFCSPA (Programa de fomento a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA—07/2020/PROPPG).

Data availability All relevant data are available in the manuscript.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethical approval This study was approved by the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre. Institutional Ethics Committee: 2.176.785 and 1.115.418.

Consent to participate Informed consent was obtained from all individual participants included in the study or their parents or legal guardian in the case of children under 16.

Consent for publication The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2021) Global pneumococcal disease and vaccine. Last updated: 27 January 2022. Available online: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/global.html>. Accessed 4 Mar 2022
- World Health Organization (2018) Vaccine-preventable diseases surveillance standards. Influenza Last Updated: 5 September 2018. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/surveillance-standards-for-vaccine-preventable-diseases-2nd-edition>. Accessed 4 Mar 2022

3. Troeger C, Blacker B, Khalil IA, Rao PC, Cao J, Zimsen SR, Reiner RC (2018) Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis* 18(11):1191–1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)
4. BOOK, CDC Pink (2015) Pneumococcal disease. Chapter, v. 15, p 217–229. Available online: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>. Accessed 4 Mar 2022
5. Keshava S, Magisetty J, Tucker TA, Kujur W, Mulik S, Esmon CT, aL. (2021) Endothelial cell protein C receptor deficiency attenuates *streptococcus pneumoniae*-induced pleural fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1(64):477–491. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0328OC>
6. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C et al (2015) Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev* 28:871–899. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-15>
7. Ganaie F, Saad JS, Mcgee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW et al (2020) A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral *Streptococcus*. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.10.1128/mBio>
8. Mott MP, Caierão J, Cunha GR, del Maschi MM, Pizzutti K, d'Azevedo P et al (2019) Emergence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* after PCV10 associated with a ST320 in adult population, in Porto Alegre, Brazil. *Epidemiol Infect* 147. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000013>
9. Yahiaoui RY, Bootsma HJ, den Heijer CDJ, Pluister GN, John Paget W, Spreuwenberg P et al (2018) Distribution of serotypes and patterns of antimicrobial resistance among commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. *BMC Infect Dis* 29:18. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3341-0>
10. Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, Poh CL (2020) Development of next generation *streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines (Basel)* 1:8. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010132>
11. Brandileone MCC, Almeida SCG, Minamisava R, Andrade AL (2018) Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine* 3(36):2559–2566. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.010>
12. Isturiz R, Sings HL, Hilton B, Arguedas A, Reinert RR, Jodar L (2017) *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide epidemiology. *Expert Rev Vaccines* 3(16):1007–1027. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1362339>
13. Chamkhaleh MA, Esteghamati A, Sayyahfar S, Gandomi-Mohammadabadi A, Balasi J, Abdiaei H et al (2020) Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among healthy carriers and clinical patients: a systematic review from Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1(39):2257–2267. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03963-z>
14. Mitchell AM, Mitchell TJ (2010) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* 16:411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x>
15. Galán-Bartual S, Pérez-Dorado I, García P, Hermoso JA (2015) Structure and function of choline-binding proteins. In: *Streptococcus pneumoniae*: molecular mechanisms of host-pathogen interactions. Elsevier Inc., pp 207–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410530-0.00011-9>
16. Morais V, Texeira E, Suarez N (2019) Next-generation whole-cell pneumococcal vaccine *Vaccines (Basel)* 1:7. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040151>
17. Corsini B, Aguinalalde L, Ruiz S, Domenech M, Yuste J (2021) Vaccination with lyta, lytc, or pce of *streptococcus pneumoniae* protects against sepsis by inducing iggs that activate the complement system. *Vaccines (Basel)* 9:1–15. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020186>
18. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC (2008) Andrew PW (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 6:288–301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>
19. UniProt (2021) Uniprot [Internet]. Retrieved 2 February 2023, from <https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=streptococcus%20pneumoniae>
20. Reglinski M, Ercoli G, Plumptre C, Kay E, Petersen FC, Paton JC et al (2018) A recombinant conjugated pneumococcal vaccine that protects against murine infections with a similar efficacy to Prevnar-13. *npj Vaccines* 1:3. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0090-4>
21. Janapatla RP, Chen CL, Hsu MH, Liao WT, Chiu CH (2018) Immunization with pneumococcal neuraminidases *NanA*, *NanB* and *NanC* to generate neutralizing antibodies and to increase survival in mice. *J Med Microbiol* 1(67):709–723. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000724>
22. André GO, Assoni L, Rodriguez D, Leite LCC, dos Santos TEP, Ferraz LFC et al (2020) Immunization with PhtD truncated fragments reduces nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 27(38):4146–4153. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.050>
23. Zhang Y, Masi AW, Barniak V, Mountzourous K, Hostetter MK, Green BA (2001) Recombinant PspA protein, a unique histidine motif-containing protein from *Streptococcus pneumoniae*, protects mice against intranasal pneumococcal challenge. *Infect Immun* 69:3827–3836. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3827-3836.2001>
24. Anderson RJ, Guru S, Weeratna R, Makinen S, Falconer DJ, Sheppard NC et al (2016) *In vivo* screen of genetically conserved *Streptococcus pneumoniae* proteins for protective immunogenicity. *Vaccine* 7(34):6292–6300. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.061>
25. Nakahashi-Ouchida R, Uchida Y, Yuki Y, Katakai Y, Yamanoue T, Ogawa H et al (2021) A nanogel-based trivalent PspA nasal vaccine protects macaques from intratracheal challenge with pneumococci. *Vaccine* 8(39):3353–64. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.069>
26. Visan L, Rouleau N, Proust E, Peyrot L, Donadieu A, Ochs M (2018) Antibodies to PcpA and PhtD protect mice against *Streptococcus pneumoniae* by a macrophage- and complement-dependent mechanism. *Hum Vaccin Immunother* 1(14):489–494. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1403698>
27. Moschioni M, Emolo C, Biagini M, Maccari S, Pansegrau W, Donati C et al (2010) The two variants of the *Streptococcus pneumoniae* pilus 1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection *in vivo*. *Infect Immun* 78:5033–5042. <https://doi.org/10.1128/IAI.00601-10>
28. Prieto P, Burton J, Graepel R, Price A, Whelan M, Worth A (2014) EURL ECVAM strategy to replace, reduce and refine the use of animals in the assessment of acute mammalian systemic toxicity. Publications Office of the European Union, Luxembourg
29. Doke SK, Dhawale SC (2015) Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23(3):223–229
30. Singum P, Suwanmanee S, Pumeesat LN (2019) A powerful *in vivo* alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.001>
31. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D (2012) The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/4392>
32. Vilcinskas A (2011) Insects emerge as valuable model hosts to explore virulence. *Virulence* 2:376–378. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.18289>

33. Pinto HB, Brust FR, Macedo AJ, Trentin DS (2020) The anti-virulence compound myricetin possesses remarkable synergistic effect with antibacterials upon multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. Microb Pathog 1:149. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104571>
34. Luther MK, Arvanitis M, Mylonakis E, LaPlante KL (2014) Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an *in vitro* pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an *in vivo* survival assay using *Galleria mellonella* larvae. Antimicrob Agents Chemother 58:4612–4620. <https://doi.org/10.1128/AAC.02790-13>
35. Sheehan G, Dixon A, Kavanagh K (2019) Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. Microbiology (United Kingdom) 165:863–875. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000813>
36. Silva LN, Campos-Silva R, Ramos LS, Trentin DS, Macedo AJ, Branquinho MH et al (2018) Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically relevant non-albicans *Candida* species. FEMS Yeast Res 1:18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy082>
37. Campos-Silva R, Brust FR, Trentin DS, Macedo AJ (2019) Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. Microb Pathog 1:137. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103756>
38. Kaito C, Murakami K, Imai L, Furuta K (2020) Animal infection models using non-mammals. Microbiol Immunol 1(64):585–592. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12834>
39. Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E (2012) Of model hosts and man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. Adv Exp Med Biol 710:11–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5638-5_2
40. Cools F, Torfs E, Aizawa J, Vanhoutte B, Maes L, Caljon G et al (2019) Optimization and characterization of a *Galleria mellonella* larval infection model for virulence studies and the evaluation of therapeutics against *Streptococcus pneumoniae*. Front Microbiol 10:311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00311>
41. Evans BA, Rozen DE (2012) A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:2653–2660. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1609-7>
42. Bárria C, Mil-Homens D, Pinto SN, Fialho AM, Arraiano CM, Domingues S (2022) RNase R, a new virulence determinant of *Streptococcus pneumoniae*. Microorganisms 10(2):317. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020317>
43. Gazioglu O, Kareem BO, Afzal M, Shafeeq S, Kuipers OP, Ulijasz AT, Andrew PW, Yesilkaya H (2021) Glutamate dehydrogenase (GdhA) of *Streptococcus pneumoniae* is required for high temperature adaptation. Infect Immun. 89(12):0040021. <https://doi.org/10.1128/IAI.00400-21>
44. Cools F, Triki D, Geerts N, Delputte P, Fourche Cos D (2020) In vitro and *in vivo* evaluation of in silico predicted pneumococcal UDPG: PP inhibitors. Front Microbiol 11:1596. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01596>
45. Blumental S, Granger-Farbos A, Moïsi JC, Soullié B, Leroy P, Njanpop-Lafourcade BM et al (2015) Virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. Comparison between African and French invasive isolates and implication for future vaccines. PLoS ONE 27:10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133885>
46. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC (2018) *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol 1(16):355–367. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
47. Mills RO, Abdullah MR, Akwetey SA, Sappor DC, Cole I, Baffuor-Asare M et al (2020) Post-vaccination *Streptococcus pneumoniae* carriage and virulence gene distribution among children less than five years of age, cape coast. Ghana Microorganisms 1(8):1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms18121987>
48. Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Shinagawa M, Takahashi S, Kobayashi N (2019) Prevalence of various vaccine candidate proteins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: characterization of the novel pht fusion proteins phta/b and phta/d. Pathogens 1:8. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040162>
49. Zhao W, Pan F, Wang B, Wang C, Sun Y, Zhang T et al (2019) Epidemiology characteristics of *Streptococcus pneumoniae* from children with pneumonia in Shanghai: a retrospective study. Front Cell Infect Microbiol 9:258. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00258>
50. Pettigrew MM, Fennie KP, York MP, Daniels J, Ghaffar F (2006) Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. Infect Immun 74:3360–3365. <https://doi.org/10.1128/IAI.01442-05>
51. Imai S, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Yoshimura K et al (2011) Distribution and clonal relationship of cell surface virulence genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan. Clin Microbiol Infect 17:1409–1414. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03446.x>
52. Yan Z, Cui Y, Zhou W, Li W, Tan X, Chen W et al (2019) Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* in children living in southwest China and assessment of a potential protein vaccine, rPfbA. Vaccine 29(37):721–731. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.021>
53. Brooks WA, Chang LJ, Sheng X, Hopfer R, de Bruyn G, Bologna M et al (2015) Safety and immunogenicity of a trivalent recombinant PcpA, PhtD, and PlyD1 pneumococcal protein vaccine in adults, toddlers, and infants: A phase I randomized controlled study. Vaccine 26(33):4610–4617. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.078>
54. Khan MN, Pichichero ME (2012) Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans. Vaccine 30(18):2900–2907. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.023>
55. Cornick JE, Tastan Bishop Ö, Yalcin F, Kiran AM, Kumwenda B, Chaguza C et al (2017) The global distribution and diversity of protein vaccine candidate antigens in the highly virulent *Streptococcus pneumoniae* serotype 1. Vaccine 7(35):972–980. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.037>
56. Žemličková H, Mališová L, Španělová P, Jakubů V, Kozáková J, Musílek M et al (2018) Molecular characterization of serogroup 19 *Streptococcus pneumoniae* in the Czech Republic in the post-vaccine era. J Med Microbiol 1(67):1003–1011. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000765>
57. Gholamhosseini-Moghaddam T, Rad M, Mousavi SF, Ghazvini K (2015) Detection of *lytA*, *pspC*, and *rrgA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children. Iran J Microbiol 7(3):156–160
58. Pinto TC, Costa NS, Pina SE, Souza AR, Oliveira LM, Moura CA, Teixeira LM (2020) Virulence-associated characteristics of serotype 14 and serogroup 9 *Streptococcus pneumoniae* clones circulating in Brazil: association of penicillin non-susceptibility with transparent colony phenotype variants. Front Microbiol 11:2009
59. Knupp-Pereira PA, Torres N, Marques C, Lúcia & , Teixeira M, Cardoso H, et al (2020) Prevalence of PspA families and pilus islets among *Streptococcus pneumoniae* colonizing children before and after universal use of pneumococcal conjugate vaccines in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology [Internet] 51:419–425. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00179-y10.1007/s42770-019-00179-y/Published>
60. Velikova N, Kavanagh K, Wells JM (2016) Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Streptococcus suis*. BMC Microbiol 15(16):1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0905-2>

61. Six A, Krajangwong S, Crumlish M, Zadoks RN, Walker D (2019) *Galleria mellonella* as an infection model for the multi-host pathogen *Streptococcus agalactiae* reflects hypervirulence of strains associated with human invasive disease. *Virulence* 1(10):600–609. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1631660>
62. Subramanian K, Henriques-Normark B, Normark S (2019) Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: from nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. *Cell Microbiol* 1:21. <https://doi.org/10.1111/cmi.13077>
63. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T (2016) *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7(3):214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
64. Selva L, Ciruela P, Blanchette K, del Amo E, Pallares R, Orihuela CJ, Muñoz-Almagro C (2012) Prevalence and clonal distribution of pcpA, psrP and Pilus-1 among pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 7(7):e41587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041587>
65. Žemličková H, Mališová L, Španělová P, Jakubů V, Kozáková J, Musílek M, Medvecký M (2018) Molecular characterization of serogroup 19 *Streptococcus pneumoniae* in the Czech Republic in the post-vaccine era. *J Med Microbiol* 67(7):1003. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000765>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

SUPPLEMENTARY INFORMATION (SI)

The following is the Supplementary data to this article:

***Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from carriers and invasive disease: virulence gene profile
and pathogenicity in a *Galleria mellonella* model**

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Josiane Trevisol Leal¹; Muriel Primon-Barros¹; Amanda de Carvalho Robaina¹; Kauana Pizzutti¹; Mariana Preussler Mott¹; Danielle Silva Trentin^{2*}; Cícero Armídio Gomes Dias¹

¹Laboratório de Microbiologia Molecular, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Laboratório de Bacteriologia & Modelos Experimentais Alternativos, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPGBIO), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Corresponding author:

Danielle Silva Trentin

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245, 90050-170

Porto Alegre, RS, Brazil

daniellest@ufcspa.edu.br

Phone: +55 51 9 8105-3345

ORCID: 0000-0002-8622-1052

1. Methods:

1.1 Bacterial load in *Galleria mellonella*

To determine bacterial burden during infection, larvae were infected with strain R6 at 8.00×10^7 CFU/mL, with a minimum of 10 larvae per time point. At 1, 2, 4 and 8 h after infection, alive larvae were bled into microtubes and 12.5 μ l of hemolymph was collected from each animal for each time (n=8/time). A serial dilution of hemolymph was made in PBS and the bacterial load was determined through the counting of colonies on chocolate agar plates.

1.2 Growth curve analysis of HC and IPD isolates

The strains were grown in Todd-Hewitt broth supplemented with rabbit serum. Bacterial growth was monitored by measuring light absorption at 620 nm using a microplate spectrophotometer (Biotek Epoch, USA) at 30 minutes intervals for 12 h.

2. Results:

Larval mortality after R6 infection is associated with bacterial proliferation

To confirm that infection with the R6 strains (non-encapsulated strain) is indeed the cause of larvae death, an analysis of the bacterial load during infection was performed (Figure S1). One hour after infection, the larval load of the R6 strain did not increase (8×10^7 CFU/mL). However, from the second hour the number of bacteria increased by one log (7.20×10^8 CFU/mL) and after 4 hours another log (2.00×10^9 CFU/mL). After 8 hours of infection, it was possible to observe a very expressive increase (4.00×10^{13} CFU/mL) and an evident lethargy in the larvae. These results demonstrates that mortality is associated with R6 proliferation in the host.

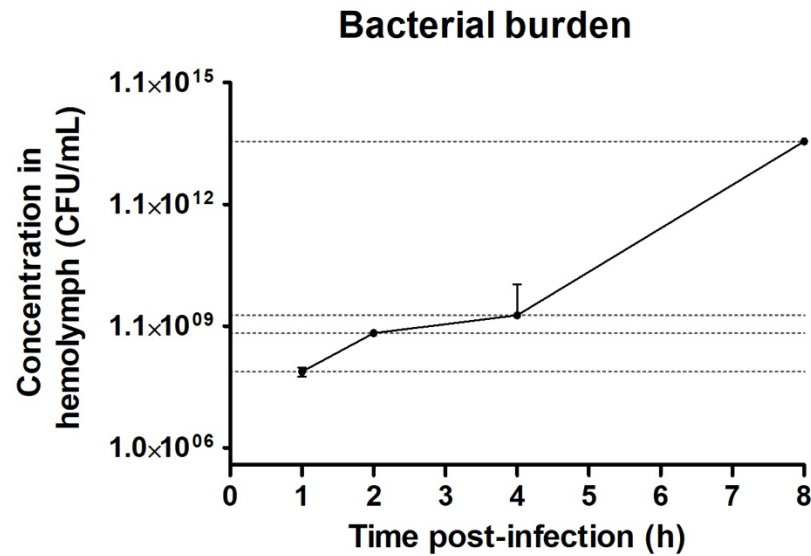


Figure S1: Bacterial burden in the *G. mellonella* during infection with *S. pneumoniae* strain R6. Larvae were systemically infected with 8.00×10^7 CFU/mL and 1h, 2h, 4h and 8h post-infection the bacterial load in larval hemolymph was determined. The curve represents average of bacterial counting in the hemolymph of 3-8 live larvae at each time point and error bars represent standard deviation.

Table S1: Details of PCR conditions for each pneumococcal virulence gene.

		Conditions of amplifications					Positive control		
Target	Primer sequence (5'-3')	Product size	Optimized primer concentrations	Holding stage	N cycles [(denaturation), (hybridation), (elongation)]	Melt Curve Stage	Reference strain	Reference	
<i>lytA</i>	F- CAGCGGTTGAACTGATTGA R- TGGTTGGTTATTCGTGCAA	173	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	[52]	
<i>nanA</i>	F- CTCCTACCGAAGCGAAAGTG R- AATTGCACCTTCTGCCAAAC	221	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	
<i>nanB</i>	F- CGTGGAGTGAGCCAATTTTT R-CGCAGGCATAACATCAGCTA	182	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	
<i>pavA</i>	F- GGTGCGCATCCAGAAAATC R- AGAAAGGAGCAGGCGATG	90	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	[52]	
<i>pcpA</i>	F-TGAATCGTTTGCCTCAGTTG R- GTTTAATCGCATCCGCAAAT	218	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	
<i>phtA</i>	F- GCGGCAGCTTTGATTTTAAG R- CCTTCACGCTTGCTAACCTC	155	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	
<i>phtB</i>	F- CTTATTTTCGACCCAGCGCA R- TTGCGGACTTGGACTIONAGGTT	222	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	
<i>phtD</i>	F- GTATTAGACAAAATGCTGTGGAG R- CTGTATAGGAGTCGGTTGACTTTC	140	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	[62]	
<i>phtE</i>	F - CGTTCCTCATGGAGGTCACT R - GCTGGCTTGCTAGTTGATCC	180	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	
<i>pilus-1 (rrgA)</i>	F- TTGTGACAAATCTTCCTCTTGGA R- GTCACCAGCTGATGATCTACCA	115	0,6	95 °C (5min)	50 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	[52]	
<i>pilus- 2 (sipA)</i>	F- TCTCGTTCTTGCTGTGGATG R- GCTGAAGCCTGAAAACTGG	190	0,5	95 °C (5min)	50 [(95°C - 00:10), (55°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	
<i>pspA</i>	F-ATGCAGCGAAGAAAGATGCT R- AACTGCTGCCACTGCCTTAT	176	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study	

<i>pspA-fam1</i>	F- CTCCGTGCTCCTCTTCAATC R- AGCTTGCTCACCGTCTGAGT	153	0,5	95 °C (5 min)	50 [(95°C - 00:10), (55°C-0:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	This study
<i>pspC</i>	F- AGTTGATTGGCTTGACCTTG R-CTACACTAGCTACTCC	299	0,25	95 °C (5min)	40 [(95°C - 00:10), (60°C-00:30), (72°C-00:30)]	95°C (00:15), 60°C (01:00), 95°C (00:30), 60°C (00:15)	R6/ TIGR4	[63]

Abbreviations: F=forward, R=reverse, N=number, min=minutes, *lytA*=autolysin gene, *nan*=neuraminidase gene, *pavA*=pneumococcal adhesion and virulence A gene, *pcpA*=pneumococcal choline binding protein A gene, *pht*=polyhistidine triad complex genes, *pspA*=pneumococcal surface protein A gene, *pspC*=pneumococcal surface protein C gene.

Table S2: Comparative analysis about studies that evaluated the percentage of genes coding surface proteins.

Reference	Origin of isolates	Serotype studied	n of samples	Facilitates the release of the pneumolysin toxin	Interaction with complement system									Mediate bacterial adhesion to epithelial cells			
				<i>lytA</i>	<i>nanA</i>	<i>nanB</i>	<i>phtA</i>	<i>phtB</i>	<i>phtD</i>	<i>phtE</i>	<i>pspA</i>	<i>pspA-fam1</i>	<i>pspC</i>	<i>pavA</i>	<i>pcpA</i>	<i>rrgA</i> (pilus-1)	<i>sipA</i> (pilus-2)
This study	Brazil	19A	22	100	9.0	100	100	100	95.4	100	86.3	18.1	59	100	100	100	100
Other studies																	
[55]	Several	1	445	-	-	-	-	-	28	-	68	-	76	-	11	-	-
[59]	Brazil	19A	253	-	-	-	-	-	-	-	100	0	-	-	-	-	-
[52]	China	19A	22	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	-	-	100	100
[49]	China	19A	28	100	96.4	-	-	-	-	-	7.1	-	89.3	100	-	-	-
[64]	Spain	19A	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96.8	28	-
[50]	USA	19A	13	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[65]	Czech republic	19A	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100
[47]	Ghana	Several ^a	151	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87	11.9	6.6
[48]	Japan	Several ^a	57	-	100	100	49.1	26.3	61.4	100	-	-	78.9	100	91.2	-	-
[51]	Japan	Several ^a	156	-	-	-	-	-	-	-	100	55.8	-	100	-	-	-
[58]	Brazil	Several ^a	315	-	-	-	-	-	-	-	100	30.8	-	-	-	50	-
[57]	Iran	Uninformed ^b	59	84.74									3.38			28.81	

(-) = not studied . ^a= serotype 19A was not investigated in the present work. ^b= serotype not reported by the researcher. n= number

6. CONCLUSÕES

- Verificamos que os genes *lytA*, *nanB*, *pavA*, *pcpA*, *phtA*, *phtB*, *phtE*, pilus-1 (*rrgA*) e pilus-2 (*sipA*) estão presentes em todos isolados *S. pneumoniae* do sorotipo 19A, tanto entre os provenientes de portadores quanto nos de doença invasiva.
- Não houve, para cada gene de virulência testado, diferença significativa nas proporções entre isolados de carreadores e dos provenientes de doença invasiva.
- O modelo alternativo de *G. mellonella* mostrou-se uma ferramenta valiosa, confirmando seu potencial para estudo de virulência de *S. pneumoniae*.
- Em geral, isolados invasivos apresentaram uma DL50 inferior em comparação aos isolados de portadores, mesmo quando seu perfil de virulência era equivalente a algum isolado colonizador ou quando apresentavam ausência de *nanA*, *pspA*, *pspA-fam 1* e *pspC*. Esta observação sugere que outros fatores de virulência podem ter um papel decisivo no desenvolvimento de doença invasiva.
- Este é o primeiro relato utilizando isolados clínicos de *S. pneumoniae* e ensaios de virulência utilizando o modelo *in vivo* de *G. mellonella*, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de virulência de *S. pneumoniae*.

7. ANEXOS

7.1 Parecer consubstanciado do comitê de ética

7.1.1 Amostras de portadores (2.176.785)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
Elaborado pela Instituição Coparticipante		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Portadores de Streptococcus pneumoniae entre idosos e crianças: avaliação do efeito da vacina conjugada 10-valente		
Pesquisador: EMILIO MORIGUCHI		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 66184117.5.3001.5345		
Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 2.176.785		
Apresentação do Projeto:		
O projeto submetido é uma versão corrigida do projeto apresentado ao CEP da instituição proponente. Conforme verificou-se na carta-resposta, os ajustes solicitados por aquele CEP foram atendidos. No entanto, não se considera necessário que o projeto seja submetido também ao CEP da UFCSPA, instituição co-participante.		
Objetivo da Pesquisa:		
Os objetivos são coerentes ao que o projeto se propõe.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Os riscos e benefícios descritos no projeto e nos termos de apresentação obrigatória estão adequados.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Chama a atenção que o projeto submetido à apreciação deste CEP já foi apresentado à instituição proponente, UFRGS, e inclui resposta ao parecer emitido pelo CEP dessa instituição. Não há necessidade de o projeto passar por dois CEPs; a aprovação do CEP de apenas uma instituição é suficiente.		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
A redação de ambos os TCLs foi ajustada conforme solicitado anteriormente. Contudo, uma		
Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245 Bairro: Sarmiento UF: RS Município: PORTO ALEGRE Telefone: (51)3303-8804 CEP: 90.050-170 E-mail: cep@ufcspa.edu.br		
Página 01 de 04		

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.176.785

revisão textual deve ser feita para evitar eventuais ambiguidades. Por exemplo: O TCLE dirigido aos responsáveis deve ter a redação revisada em "A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o número de adultos e crianças que carregam na garganta e/ou no nariz (nasofaringe/orofaringe) a bactéria *Streptococcus pneumoniae*. Mas as crianças que vão participar desta pesquisa apenas irão coletar material do nariz." (Nesse caso, pode-se dizer de maneira mais objetiva, e em uma sentença, que só se coletará o material do nariz da criança.) Outro caso de necessidade de revisão ocorre em "Se ocorrer sangramento, a coleta será suspensa, apenas uma única tentativa será realizada. Mas se estes sintomas ocorrerem durante a coleta eles são passageiros, mas mesmo assim haverá suporte enquanto os sintomas persistirem." (excluir "MAS SE" no início da segunda frase).

Recomendações:

- Recomenda-se que o projeto seja submetido apenas ao CEP (através de emenda) cujo pesquisador responsável faz parte.
- Ajustar a redação dos TCLEs para evitar ambiguidades.
- Incluir nas informações básicas do projeto o nome do orientador da aluna. O atual pesquisador responsável não faz parte da instituição da qual a aluna está vinculada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como a nova versão do projeto submetido ao CEP da UFRGS atende às solicitações feitas, e verificando-se que não há mais novas alterações a serem realizadas, não há pendências que comprometam o prosseguimento do projeto. No entanto, recomenda-se que os ajustes nos TCLEs, de cunho textual, sejam feitos.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853064.pdf	18/05/2017 12:06:58		Aceito
Outros	CRONOGRAMA_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 12:05:40	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	ORCAMENTO_COM_AJUSTES.pdf	18/05/2017 11:59:26	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_responsavel.pdf	18/05/2017 11:57:51	Mariana Preussler Mott	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.176.785

Outros	TERMO_RELATORIO_PARCIAL_E_FI AL.pdf	18/05/2017 11:57:12	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FLUXOGRAMA_DAS_COLETAS_E_PR OCEDIMENTO_DOS_SWABS.pdf	18/05/2017 11:54:11	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_lista_de_pendencias.pdf	18/05/2017 11:52:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	DOCUMENTO_COLABORACAO_ESTR ANGEIRA.pdf	18/05/2017 11:50:39	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsaveis_Legais.pdf	18/05/2017 11:49:53	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_crianças.pdf	18/05/2017 11:49:31	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_adultos.pdf	18/05/2017 11:46:34	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	Questionario_triagem_adultos.pdf	18/05/2017 11:45:49	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adultos.pdf	18/05/2017 11:44:52	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_PROJETO.pdf	18/05/2017 11:36:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_853064.pdf	23/03/2017 21:09:08		Aceito
Outros	QUESTIONARIO_CRIANCAS.pdf	23/03/2017 21:07:07	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_ADULTOS.pdf	23/03/2017 21:06:32	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_TRIAGEM_ADULTOS .pdf	23/03/2017 21:06:07	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RESPONSAVEIS_LEGAI NCAS.pdf	23/03/2017 21:05:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ADULTOS.pdf	23/03/2017 21:05:23	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_MATERIAL_BIO LOGICO.pdf	23/03/2017 21:05:08	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	TERMO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	23/03/2017 21:04:36	Mariana Preussler Mott	Aceito
Outros	FORMULARIO_DELEGACAO_FUNCO ES.pdf	23/03/2017 21:04:09	Mariana Preussler Mott	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Página 03 de 04

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.176.785

Orçamento	ORCAMENTO.pdf	23/03/2017 21:03:21	Mariana Preussler Mott	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	23/03/2017 21:02:16	Mariana Preussler Mott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	23/03/2017 21:01:58	Mariana Preussler Mott	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_853064.pdf	25/01/2017 17:32:35		Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	12/01/2017 11:10:06	EMILIO MORIGUCHI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Julho de 2017

Assinado por:

Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

7.1.2 Amostras de doença pneumocócica invasiva (1.115.418)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE										
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA										
Título da Pesquisa: Prevalência de resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolados de doença invasiva										
Pesquisador: Cicero Amadio Gomes Dias										
Área Temática:										
Versão: 1										
CAAE: 45435115.7.0000.5345										
Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre										
Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre										
DADOS DO PARECER										
Número do Parecer: 1.115.418										
Data da Relatoria: 18/06/2015										
Apresentação do Projeto:										
Este estudo tem como objetivo verificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de <i>S. pneumoniae</i> isolados de doença invasiva, correlacionando com o sorotipo, bem como avaliar a relação clonal entre os isolados. Assim, para almejar este objetivo será realizada a sorotipagem das amostras por Reação da Cadeia de Polimerase (PCR) por ensaio de Multiplex PCR, o perfil de suscetibilidade será determinado para oito antimicrobianos mais frequentemente utilizados a partir da metodologia de determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), e a tipagem clonal de isolados pré-determinados por sorotipo e perfil de resistência será através das técnicas de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). Este estudo justifica-se, devido ao fato da introdução da imunoprofilaxia direcionada ao pneumococo ter ocorrido recentemente no Brasil, assim o efeito desta na incidência de doença invasiva, na distribuição dos sorotipos e na resistência aos antimicrobianos esta ainda por ser avaliada, sendo essencial verificar as alterações epidemiológicas, genotípicas, além de monitorar e avaliar a ocorrência de resistência antimicrobiana em clones emergentes e que estão atualmente relacionados com o aumento da DPI. Estudos têm mostrado que existe diversidade na distribuição										
<table border="1"><tr><td>Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245</td><td>CEP: 90.050-170</td></tr><tr><td>Bairro:</td><td></td></tr><tr><td>UF: RS</td><td>Município: PORTO ALEGRE</td></tr><tr><td>Telefone: (51)303-8804</td><td>E-mail: cep@ufcspa.edu.br</td></tr></table>			Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245	CEP: 90.050-170	Bairro:		UF: RS	Município: PORTO ALEGRE	Telefone: (51)303-8804	E-mail: cep@ufcspa.edu.br
Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245	CEP: 90.050-170									
Bairro:										
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE									
Telefone: (51)303-8804	E-mail: cep@ufcspa.edu.br									
Página 21 de 05										

Continuação do Parecer: 1.115.418

de sorotipos e na taxa de resistência dos pneumococos nas diferentes regiões do mundo e ao longo do tempo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Determinar a prevalência da resistência de *Streptococcus pneumoniae* aos antimicrobianos em isolados clínicos de Porto Alegre, RS.

Objetivos Específicos

Verificar a prevalência da resistência antimicrobiana de isolados de *S. pneumoniae* em doença pneumocócica invasiva, pós a introdução da vacina conjugada 10-valente.

Correlacionar sorotipos e resistência.

Avaliar, através da utilização de técnicas de tipagem molecular, a relação clonal entre os isolados não suscetíveis.

Comparar a ocorrência de isolados não suscetíveis entre os diferentes sorotipos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esta pesquisa envolve riscos mínimos, como por exemplo, a quebra de sigilo e anonimato por parte de algum pesquisador. Porém, os pesquisadores se comprometem a manter sigilo, garantindo que os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para a execução deste projeto, sem que haja qualquer forma de identificação quando os resultados forem divulgados. Além disso, serão utilizados exclusivamente isolados bacterianos, não havendo contato direto com material biológico humano em nenhuma das etapas deste projeto (espécimes, amostras e alíquotas e material original e seus componentes fracionados), conforme descrito na Resolução nº441 de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde.

Os benefícios gerados atingirão a comunidade como um todo, pois conhecendo melhor a epidemiologia regional de um agente bacteriano, se tem conhecimento, por exemplo, de sua distribuição, prevalência de um determinado sorotipo, podendo este estar relacionado com um perfil suscetibilidade, para assim serem tomadas medidas importantes, como o tratamento rápido e adequado. Sendo um fator importante e impactante em casos, por exemplo, de meningite, para se evitar sequelas graves nos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

METODOLOGIA

Local da Pesquisa: Toda a parte metodológica será realizada nos Laboratórios de Microbiologia

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro:

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.115.416

(Laboratório 201, 202 e 203 – Prédio Principal) e Microbiologia Molecular (Laboratório 004 – Prédio Anexo) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Com ciência e autorização do responsável pelos laboratórios anteriormente citados, Prof.^o ~~Dr.~~ Pedro Alves d'Azevedo.

Delineamento: Estudo transversal.

Origem dos isolados: Os isolados bacterianos de ~~Streptococcus pneumoniae~~ incluídos neste estudo provêm de material que após diagnóstico microbiológico, nos laboratórios de análises clínicas do Hospital Mãe de Deus e Grupo Hospitalar Conceição, iriam ser descartados em lixo branco, para posteriormente sofrerem descontaminação a partir de calor úmido, em autoclave. Ou seja, o isolado bacteriano de pneumococo não representa o paciente, não possui material genético do mesmo.

Critérios de inclusão: Placas de cultura contendo isolados bacterianos de ~~S. pneumoniae~~ recuperados de fluidos normalmente estéreis, como sangue, ~~líquor~~ e líquido pleural, configurando Doença Pneumocócica Invasiva (DPI).

Critérios de exclusão: Isolados bacterianos que não possam ser analisados por problemas técnicos, como a inviabilidade da cepa bacteriana.

Cálculo de tamanho de amostra. Com base na prevalência de resistência observada em outros estudos (em torno de 10%), usando um intervalo de confiança de 95% e 3% de erro, o tamanho da amostra é estimado em 150 isolados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O presente estudo não envolverá seres humanos, termos da Resolução 466/12 no CONEP, assim solicitamos ~~dispensa~~ do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pois os isolados bacterianos de ~~Streptococcus pneumoniae~~ incluídos neste estudo serão provenientes de crescimento bacteriano em meios de cultura que seriam descartados, após a realização do diagnóstico microbiológico, ou seja, analisaremos essas placas de cultura de isolados bacterianos. Não haverá contato com o paciente e nem utilização ou contato direto com a amostra clínica do paciente. Portanto, este isolado não representa mais o paciente, sem que seja possível, por exemplo, ter acesso ao material genético do mesmo.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro:

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.115.418

Como os participantes da pesquisa terão acesso aos prontuários médicos, para que sejam avaliadas as variáveis demográficas como sexo, idade e sítio onde o isolado bacteriano foi recuperado, estes se comprometem a manter sigilo e anonimato dos dados coletados, sem que haja qualquer forma de identificação.

Os isolados serão utilizados unicamente para a realização desta pesquisa, e permanecerão armazenados por cinco anos, findado esse período, todos os formulários serão inutilizados.

Todos os equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto já se encontram disponíveis nos laboratórios de microbiologia e microbiologia molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Este estudo será realizado com verbas de projetos contemplados nos seguintes editais: MCT/CNPQ/Universal 14/2014: ~~Streptococcus pneumoniae e infecções invasivas em indivíduos com mais de 50 anos: sorotipos, resistência aos antimicrobianos e clonalidade~~ e Edital 001/2013 – PQG – FAPERGS: Desfechos de infecções pneumocócicas invasivas: associação com sorotipos capsulares.

Recomendações:

Solicita-se adequar as citações no projeto à a resolução vigente (466/12), pois os pesquisadores citam a 196/96.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e o projeto, tão logo aprovado pelo instituições Coparticipantes, poderá ter seu início.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

~~De~~ acordo com o parecer do Relator.

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.115.418

PORTO ALEGRE, 19 de Junho de 2015

Assinado por:

~~Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima~~
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51) 303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Página 05 de 05

7.2 Certificado de mobilidade acadêmica

Contemplada pelo Programa de Mobilidade AULP como aluna de intercâmbio no curso de Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde, na Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico de Bragança, durante o ano letivo de 2019/2020 de 17/02/2020 a 10/07/2020, ao abrigo de um programa de intercâmbio estabelecido entre o Instituto Politécnico de Bragança, Portugal e a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brasil.

GINA- I-C-Arnes IV-Erasmus+ HE Learning Agreement for students-2015

**Ensino Superior
Acordo de Estudos**

Josiane Trevisol Loai
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)
Ano letivo 2019/2020

Após a mobilidade (instituição de acolhimento)

Certificado de Avaliação no Instituto Politécnico de Bragança

Datas de início e fim do período de estudos: de 17/02/2020 a 10/07/2020

Tabela C Após a mobilidade	Código de unidade curricular (caso se aplique)	Nome da unidade curricular da instituição de acolhimento (conforme indicado no plano de estudos)	A unidade curricular foi concluída com aprovação pelo estudante? (Sim/Não)	Classificação da instituição de acolhimento a)	Classificação ECTS b)	Número de créditos ECTS
	5055-609-1201-00-19	Avaliação da atividade biológica	Sim	16	B	4,5
	5055-609-1202-00-19	Genômica, Metabólica e Proteômica	Sim	18	A	4,5
	5055-609-1203-00-19	Inovação e Empreendedorismo em Saúde	Sim	18	A	3
	5055-609-1206-07-19	Opção I - Inovação em Microbiologia Clínica	Sim	17	A	4,5
	5055-609-1206-11-19	Opção I - Sustentabilidade em Nutrição	Sim	14	C	4,5
						Total: 21

Responsável na instituição de acolhimento	Prof. Luis Pais	Data	29/10/2020	ASSINATURA, CARIMBO	
---	-----------------	------	------------	---------------------	--

7.3 Certificado de premiação do “Prêmio Jovem Pesquisador Promega”



Resumo e vídeo disponíveis em: <https://www.promega.com.br/c/conheca-os-finalistas/#project10>

7.4 Produção Científica Complementar

7.4.1 Certificado do resumo um enviado ao II Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório 2021



Resumo disponível em:

<https://csbbm.com.br/evento/csbbm/trabalhosaprovados/naintegra/8789>

7.4.2 Certificado do resumo dois enviado ao II Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório 2021



Resumo disponível em:

<https://csbbm.com.br/evento/csbbm/trabalhosaprovados/naintegra/8790>

7.4.3 Certificado do evento satélite do V Biosciences Meeting – Crossing Borders do Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre



Vídeo disponível em: <https://www.instagram.com/tv/CIT1mGanLhs/>

7.5 Normas para publicação

Artigo submetido à revista European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (<https://www.springer.com/journal/10096>), cujo as normas para a publicação estão disponibilizadas no link abaixo, por ser um material muito extenso:

<https://www.springer.com/journal/10096/submission-guidelines>