

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

Vinícius Pieta Perez

**Padronização de ensaio qPCR em
tempo real para identificação de
Streptococcus pneumoniae em
derrame pleural**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2014**

Vinícius Pieta Perez

Padronização de ensaio qPCR em tempo real para identificação de *Streptococcus pneumoniae* em derrame pleural

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

Orientador: Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Coorientador: Dr. Cícero A. Gomes Dias

Porto Alegre

2014

Catalogação na Publicação

Perez, Vinícius Pieta

Padronização de ensaio qPCR em tempo real para identificação de *Streptococcus pneumoniae* em derrame pleural / Vinícius Pieta Perez. -- 2014.

135 p. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Alves d' Azevedo ;
coorientador(a): Cícero Armídio Gomes Dias.

1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Derrame pleural. 3. Pneumonia. 4. PCR em tempo real. 5. Meningite. I. Título.

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

AGRADECIMENTOS

À família, essência do que sou, fundações das minhas conquistas e por muitas vezes o porto de descanso e reflexão.

Ao professor Pedro Alves d'Azevedo pelas oportunidades e compreensão.

Ao professor Cícero Armídio Gomes Dias por toda a contribuição desde a concepção inicial até as últimas etapas deste trabalho. Sou muito grato ao seu comprometimento e ao aprendizado que me proporcionou.

A todos os colegas e amigos do Centro Universitário Metodista – IPA pela compreensão e apoio permanente na concretização deste objetivo.

Aos amigos do Laboratório de Cocos Gram-Positivos pelas acolhidas calorosas e cessão de materiais e trabalho de vocês. Os momentos que estivemos juntos foram grandes bônus na realização deste trabalho

A Grasiela Agnes pela paciência de me instruir na ciência das técnicas moleculares e auxílio nos momentos de dificuldade.

A toda equipe da pneumologia pediátrica e cirurgia do Hospital da Criança Santo Antônio, especialmente ao Dr. Gilberto Bueno Fischer, que se comprometeram em fornecer subsídios para a realização deste trabalho.

Muitos incentivaram e contribuíram, e a todos sou imensamente grato pelo aporte físico, intelectual e sentimental.

Este trabalho é dedicado a todos que compartilharam deste objetivo comigo.

EPÍGRAFE

“Estude que vencerás.”

Domingos Danny Rogina Perez

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é importante patógeno oportunista humano de pneumonias e meningites, sendo também colonizador da mucosa da nasofaringe. A colonização ocorre principalmente em crianças e se eleva novamente em idosos. A evolução do estado portador para infecção depende da associação de elementos do patógeno e hospedeiro. Vacinas direcionadas para polissacarídeos capsulares são empregadas em grupos de risco, com importante redução no impacto das doenças pneumocócicas. Contudo, são relatadas elevações no número de casos complicados em crianças pós era vacinal, e estes frequentemente estão associados com identificação negativa pelos métodos tradicionais de cultura. O objetivo deste trabalho é padronizar ensaios para identificação de *S. pneumoniae* através de métodos independentes de cultura, e caracterização de isolados invasivos por meio de análise do gene *zmpB*. Líquidos pleurais negativos por cultura de 37 crianças com derrames parapneumônicos foram submetidos à pesquisa por qPCR para *lytA* e pesquisa de antígeno C por teste imunocromatográfico. Em 30/37 (81%) e 24/38 (63%) dos líquidos foram obtidos resultados positivos por qPCR e pesquisa de antígeno, respectivamente. A maioria das incongruências entre os testes foram resultados positivos por qPCR e teste de antígeno negativo em amostras com baixas cargas de DNA bacteriano, indicando uma relação imperfeita entre os dois métodos. A análise do gene *zmpB* foi conduzida por amplificação e sequenciamento parcial do gene em isolados de meningites, os quais apresentaram elevada identidade entre si (>97%) e com a cepa TIGR4. Os isolados pertenciam aos sorotipos 7F (n=2), 14 (n=2), 9V (n=1), 12F (n=1), 20 (n=1), 23F (n=1), e 34 (n=1), e um ao sorotipo 20 com baixa identidade (84%). Estes dados indicam uma baixa diversidade da sequência analisada entre pneumococos obtidos de meningites. Nossos resultados confirmam a participação do *S. pneumoniae* como principal causa de derrames parapneumônicos em crianças e sugere a utilização cautelosa de ferramentas independentes de cultura. Foi também caracterizada a presença de um potencial fator de virulência bacteriano em condições de infecções pneumocócicas invasivas.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Doenças pneumocócicas. PCR em tempo-real. Derrame pleural. Meningite. Antígeno C. *ZmpB*.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a pathogen associated with pneumonia and meningitis that colonizes the mucosal surfaces of the host nasopharynx. This carrier state occurs mostly in children and increase in the elderly. During colonization, bacterial strategies and defects in host defenses can alter host-pathogen interaction. Polysaccharides based vaccines are in use, and the burden of *S. pneumoniae* disease decreased over last years. However, complicated pneumococcal diseases increased in children in the post vaccine era, and are frequently associated with negative culture. The aim of this study is to standardize assays for identification of *S. pneumoniae* and analyze of *zmpB* gene of invasive isolates. Culture-negative pleural fluid specimens from 37 children with parapneumonic effusion were examined for pneumococcal *lytA* by qPCR and soluble antigen (C-polysaccharide) by an immunochromatographic test. In 30/37 (81%) and 24/38 (63%) specimens a positive result was obtained by qPCR and antigen detection, respectively. Most mismatches were observed in specimens with low levels of pneumococcal DNA and a negative antigens test. Our results indicate an imperfect relationship between the two methods described. The *zmpB* analysis was performed by partial amplification and sequencing of meningitis isolates. Among the nine pneumococcal isolates, serotype distribution was as follows: 7F (n=2), 9V (n=1), 12F (n=1), 14 (n=2), 20 (n=1), 23F (n=1), and 34 (n=1). Eight isolates presented 97-100% of identity with the *zmpB* sequence of TIGR4; while one isolate, belonging to serotype 20, presented a lower level (84%) of identity. Our results indicate that there is a low degree of diversity in the sequence of *zmpB* analyzed among pneumococci obtained from meningitis. Our results confirm *S. pneumoniae* as a primary cause of parapneumonic effusion in children and suggests caution with the use of culture independent tools. It was also shown the presence of a potential virulence factor in isolates of invasive pneumococcal disease.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*. Pneumococcal disease. Real-time PCR. Pleural effusion. Meningitis. C antigen. ZmpB.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	— Fatores de virulência do pneumococo.....	16
Figura 2	— Representação esquemática das metodologias SYBRGreen® e TagMan MGB®	31
Figura B1	— Curvas de dissociação por HRM.....	86
Figura C1	— Alinhamento dos produtos amplificados com <i>zmpb</i> de TIGR4...	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	—	Outras estruturas com potencial de virulência no pneumococo..	21
Tabela 2	—	Descrição das metodologias de amplificação do locus <i>cps</i> para sorotipagem de <i>S. pneumoniae</i>	35
Tabela A1	—	Results of qPCR for <i>lytA</i> , immunochromatography for C-antigen among 37 pleural fluids from children with negative culture for <i>Streptococcus pneumoniae</i>	55
Tabela B1	—	<i>Primers</i> de oligonucleotídeos utilizados.....	84
Tabela B2	—	Resultados obtidos nos ensaios de qPCR.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	— <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC	— <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Ct	— <i>Cycle threshold</i>
DNA	— Ácido desoxirribonucleico
DPI	— Doença pneumocócica invasiva
DPP	— Derrame parapneumônico
HRM	— <i>High-Resolution Melting</i>
IgA	— Imunoglobulina A
IgG	— Imunoglobulina G
LCR	— Líquido cefalorraquidiano
LDH	— Lactato desidrogenase
LP	— Líquido pleural
LytA	— Autolisina A
<i>lytA</i>	— Gene da autolisina A
MALDI-TOF	— Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MMP-9	— <i>Matrix metalloproteinase 9</i>
NanA	— Neuraminidase A
NanB	— Neuraminidase B
PAC	— Pneumonia adquirida na comunidade
PavA	— <i>Pneumococcal adhesion and virulence</i>
pb	— Pares de bases
PCR	— Reação em cadeia da polimerase
PCV-7	— Vacina pneumocócica conjugada 7-valente
PCV-10	— Vacina pneumocócica conjugada 10-valente
PCV-13	— Vacina pneumocócica conjugada 13-valente
PF	— <i>Pleural fluid</i>
PiaA	— <i>Pneumococcal iron acquisition A</i>
PiuA	— <i>Pneumococcal iron uptake A</i>

PPE	— <i>Parapneumonic effusion</i>
PsaA	— <i>Pneumococcal surface antigen A</i>
PspA	— <i>Pneumococcal surface protein A</i>
PspC	— <i>Pneumococcal surface protein C</i>
PsrP	— <i>Pneumococcal serine-rich repeat protein</i>
qPCR	— Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNAr	— Ácido ribonucleico ribossomal
rPAF	— Receptor do fator de agregação plaquetária
SNC	— Sistema nervoso central
TIGR4	— <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 (<i>virulent serotype 4</i>)
TLR2	— Receptor do tipo toll 2
TNF-alfa	— Fator de necrose tumoral - alfa
ZmpB	— Zinco metaloprotease B
<i>zmpB</i>	— Gene da zinco metaloprotease B
ZmpC	— Zinco metaloprotease C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
1.2. Fatores de virulência do <i>S. pneumoniae</i>	17
1.2.1. Cápsula polissacarídica	18
1.2.2. Pneumolisina	19
1.2.3. Proteínas de adesão.....	20
1.2.4. Enzimas de superfície	21
1.2.5. Outros mecanismos	22
1.3. Doenças pneumocócicas	23
1.3.1. Pneumonia e suas complicações.....	23
1.3.2. Meningites	26
1.4. Técnicas laboratoriais de identificação do <i>S. pneumoniae</i>	28
1.4.1. Métodos convencionais de cultura e identificação	28
1.4.2. Métodos de amplificação de ácidos nucleicos	30
1.4.3. Métodos de detecção de antígenos	33
1.4.4. Métodos de ionização e dessorção a laser assistida por matriz.....	34
1.4.5. Métodos de sorotipagem	34
2. Objetivos.....	37
2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. ARTIGO - Rapid identification of pneumococcus among children with negative culture of pleural effusion	38
4. CARTA AO EDITOR – ZmpB gene in <i>Streptococcus pneumoniae</i> causing meningitis.....	57
5. Discussão	61

6. Conclusões	69
7. Perspectivas	70
Referências.....	71
APÊNDICE A – PERSPECTIVAS FUTURAS: Padronização de ensaio qPCR com análise <i>High-Resolution Melting</i> para sorotipagem de <i>Streptococcus pneumoniae</i> ..	80
APÊNDICE B – PERSPECTIVAS FUTURAS: Avaliação de alelo do gene <i>zmpB</i> de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em líquidos pleurais	91
ANEXO A – Apresentações de trabalhos em Congressos	100
ANEXO B – Regras de submissão do periódico <i>Diagnostic Microbiology Infectious Disease</i>	105
ANEXO C – Regras de submissão do periódico <i>Journal of Medical Microbiology</i> ..	113
ANEXO D – Parecer de aprovação do CEP ISCMPA	127
ANEXO E – Parecer de aprovação do CEP UFCSPA.....	130
ANEXO F – Parecer de aprovação do CEP GHC	132
ANEXO G – Termo de Consentimento Livre Esclarecido	134

1. INTRODUÇÃO

Anualmente 3,9 milhões de óbitos no mundo são atribuídos às doenças do trato respiratório inferior, sendo a terceira causa mundial de morte por doenças logo atrás das isquêmicas cardiovasculares (7,2 milhões) e acidentes vasculares cerebrais (5,5 milhões), as infecções do trato respiratório também são associadas a 6,7% das morbidades (Lopez e Mathers 2006). Doenças do trato respiratório inferior são reconhecidas como as principais causas de morte em crianças antes dos 5 anos de idade, de fato, crianças são desproporcionalmente afetadas por pneumonias de etiologia comunitária, merecendo destaque para as pneumonias causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* (O'Brien et al. 2009).

As doenças pneumocócicas acometem principalmente indivíduos nos extremos de idade, crianças e adultos maiores de 65 anos de idade, assim como imunodebilitados. A manifestação mais frequente da doença pneumocócica é a pneumonia e suas complicações, podendo também ocorrer condições severas como meningites ou mais brandas como conjuntivites e otites (de Quadros 2009). *S. pneumoniae* encontra-se entre os principais agentes de infecções em humanos devido a uma combinação de fatores bacterianos, associados à frequência e gravidade.

Vacinas voltadas para componentes capsulares estão disponíveis desde o final da década de 70 e são recomendadas para indivíduos integrantes dos grupos de risco. A vacina 23-valente compreende os principais sorotipos infecciosos, no entanto não é recomendada para menores de 18 anos de idade. No início da década passada a introdução de vacinas conjugadas com proteínas possibilitou o início das imunoprofilaxias em crianças. Atualmente vacinas conjugadas com 10 e 13 sorotipos estão disponíveis (Mehr e Wood 2012), sendo que no ano de 2010 a vacina 10-valente passou a integrar o calendário oficial de vacinação do Sistema Único de Saúde no Brasil.

O emprego das vacinas demonstrou um decréscimo significativo das doenças pneumocócicas. Países onde as imunizações ocorrem em larga escala demonstram uma redução impactante, contudo modificações nos sorotipos de pneumococos associados a processos infecciosos e uma elevação nas taxas de condições

complicadas é conjuntamente relatada (Byington et al. 2006; Gupta e Crowley 2006; Hendrickson et al. 2008). A compreensão de quais elementos bacterianos e do hospedeiro contribui para estas observações ainda merece ser elucidada.

As complicações da doença pneumocócica parecem ser mais frequentes em indivíduos expostos a situações de vulnerabilidade (Burton et al. 2010). E apesar da frequência das doenças pneumocócicas em nosso meio, ainda poucos estudos estão disponíveis e os resultados obtidos em outros países não podem ser automaticamente transpostos para a realidade brasileira. O que reforça a necessidade de produzirmos informações a cerca das doenças pneumocócicas e caracterização do *S. pneumoniae* em nosso meio.

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

O gênero *Streptococcus*, pertencente à família Streptococcaceae, compreendendo um grupo de bactérias Gram-positivas com morfologia de cocos, sem a presença da enzima catalase e anaeróbios facultativos. Os integrantes deste gênero, com relevância médica, podem ser classificados de acordo com os antígenos (polissacarídeos) da parede celular em grupos de Lancefield (A, B, C, D, F, G), apesar disso alguns grupos de *Streptococcus*, como o grupo *viridans* e a espécie *Streptococcus pneumoniae*, não possuem estes antígenos de superfície e assim não são classificados (Winn et al. 2012).

A utilização de métodos taxonômicos moleculares, como a análise de sequências da subunidade menor do RNAr (16S), agrupa as espécies de *Streptococcus* em grupos: I, grupo piogênico; II, grupo *sanguis*; III, grupo *mitis*; IV, grupo *mutans*; V, grupo *salivarius*; VI, grupo *anginosus*; VII, grupo *bovis*; VIII, outros. E apesar das evoluções técnicas e reorganizações taxonômicas o sequenciamento do gene 16S é uma ferramenta limitada para diferenciação de *S. pneumoniae*, uma vez que a homologia com outras espécies relacionadas no grupo *mitis*, tais como *S. mitis*, *S. oralis*, é superior a 99% (Kawamura et al. 1995; Kawamura et al. 1999). A espécie *S. pseudopneumoniae*, descrita mais recentemente, apresenta diversas características genéticas e fenotípicas comuns com o *S. pneumoniae* (Arbique et al. 2004; El Aila et al. 2010; Zbinden et al. 2011).

S. pneumoniae, conhecido informalmente como pneumococo, apresenta-se na microscopia de Gram com arranjo de diplococos lanceolados (cocos alongados que lembram a ponta de uma lança), com diâmetro de 0,5 μm a 1,25 μm , e encapsulados. Colônias desenvolvidas em ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro apresentam diversidade morfológica, dependente do grau de encapsulamento. Em geral essas colônias são circundadas por uma área de alfa-hemólise (lise parcial dos eritrócitos no meio de cultura de coloração cinza-esverdeada), e seu aspecto é de colônias brilhosas e pequenas, com pigmentação cinza escura e uma leve depressão central após incubações prolongadas. Já em isolados com denso encapsulamento as colônias podem apresentar-se maiores e mucóides, lembrando gotas de óleo. A diferenciação do *S. pneumoniae* para os

integrantes do grupo *viridans*, que inclui diversas espécies de estreptococos alfa-hemolíticos, pode se dar pela verificação da suscetibilidade do pneumococo a Optoquina ou pela presença de solubilidade em bile (Winn et al. 2012).

As análises filogenéticas demonstraram que *S. pneumoniae* pertence a um grande grupo de estreptococos comensais e intimamente relacionados, sendo o pneumococo a espécie mais virulenta deste grupo. O genoma do pneumococo é altamente variável, possuindo aproximadamente 3.170 genes e uma grande proporção destes são considerados acessórios, podendo contribuir para o potencial patogênico do pneumococo. (Henriques-Normark et al. 2008). O cromossomo bacteriano está disposto em uma dupla fita circular de DNA (ácido desoxirribonucléico), com aproximadamente 2,1 milhões de pares de bases (pb), muitas vezes acompanhado de pequenos plasmídios, seu teor de G+C (guaninas e citosinas) é baixo aproximadamente 39,7% (Hoskins et al. 2001). Frequentemente há transposons carreadores de resistência integrados ao DNA e a variabilidade é elevada entre cepas, ao entorno de 10% (van der Poll e Opal 2009).

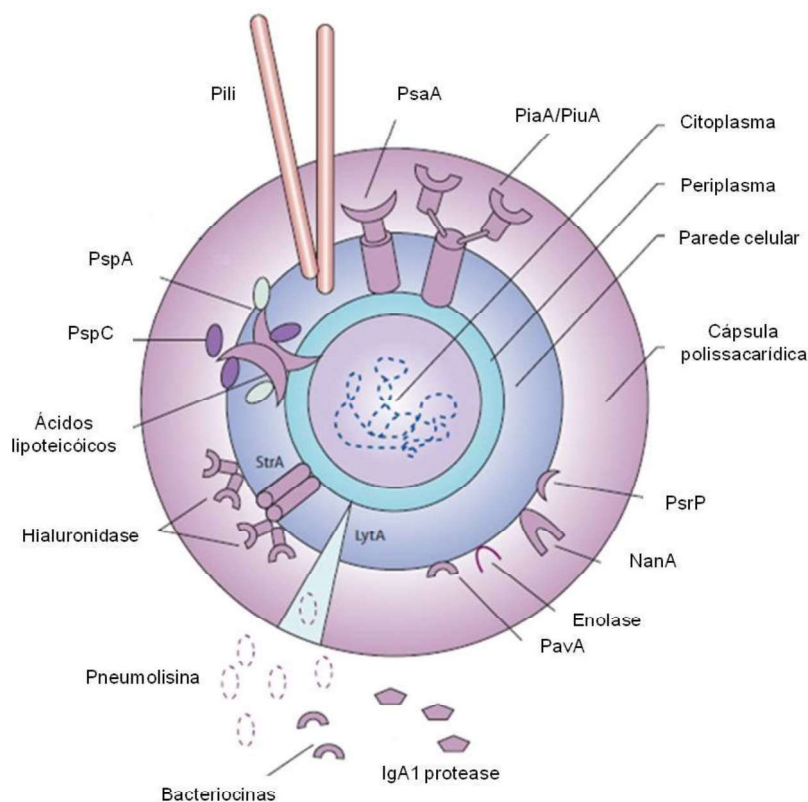
O pneumococo reside na nasofaringe humana colonizando portadores saudáveis, colonização esta que ocorrerá pelo menos uma vez na vida. Em indivíduos suscetíveis o pneumococo pode invadir outros sítios anatômicos causando processos infecciosos como pneumonias, bacteremias, otites e meningites (Hausdorff et al. 2000; Bogaert et al. 2004). A colonização da nasofaringe é vantajosa tanto ao portador quanto ao pneumococo. Para o pneumococo, permite a troca de material genético com aquisições de mecanismos de resistência e virulência. Para o hospedeiro, o contato com o patógeno promove o desenvolvimento de imunidade mediada por células B e anticorpos de memória. Crianças são colonizadas após o nascimento, sendo a prevalência do estado portador elevada aos 2-3 anos de idade, quando as taxas podem atingir 40-60%. Em adultos jovens sua ocorrência é diminuída, inferiores a 10%, e elevações ocorrem em idosos ≥ 65 anos, como consequência ao envelhecimento. O contágio e disseminação do pneumococo se dão pelo contato com secreções respiratórias de indivíduos colonizados, logo as crianças são a principal fonte de transmissão para os adultos e fatores ambientais como meses de inverno e aglomerações contribuem para a disseminação (Mehr e Wood 2012).

1.2. Fatores de virulência do *S. pneumoniae*

O potencial patogênico do *S. pneumoniae* é conhecido desde século XIX, quando primeiramente foi relacionado a casos de pneumonia, enquanto que a compreensão dos seus mecanismos iniciou-se com o reconhecimento da composição e antigenicidade da cápsula polissacarídica nas primeiras décadas do século XX. Nos últimos anos, com o advento de poderosas ferramentas moleculares novos elementos foram incluídos nesta discussão.

Um arsenal de fatores de virulência é relacionado ao pneumococo, e uma ação coordenada entre alguns desses são reconhecidos como um caminho para a progressão de um estado portador para infecção efetiva. Os fatores bacterianos primários são atribuídos à capacidade de resistência a opsonização, fagocitose e morte intracelular, assim como a aderência e colonização (van der Poll e Opal 2009). Diversas estruturas e moléculas, representadas na figura 1, são sugeridas e relacionadas a estes mecanismos. Nos próximos tópicos serão comentadas algumas destas.

Figura 1 – Fatores de virulência do pneumococo.



(van der Poll e Opal 2009)

1.2.1. Cápsula polissacarídica

Primeira estrutura descrita e determinante ao potencial antifagocítico do pneumococo. A cápsula está situada na região mais externa da célula, sendo composta por oligossacarídeos repetitivos consistindo de duas a dez unidades monossacarídicas, algumas vezes complementada por outros componentes, esses monossacarídeos são variados, e suas diferentes formas de combinar entre si permitem várias formas de apresentações dessa estrutura (Kolkman et al. 1997; Bentley et al. 2006).

Embora isolados não encapsulados tenham sido associados com infecções superficiais, como conjuntivites, isolados clínicos de sítios estéreis, são encapsuladas, e mutantes não encapsulados são em grande parte avirulentos. Apesar de ser um fator importante para a invasão, isolados não encapsulados podem ser relatados causando processos infecciosos, logo, fatores adicionais somados devem ser essenciais à patogênese, e estas podem ser peculiares de cada clone (Xu et al. 2011).

De acordo com a composição dos polissacarídeos capsulares os pneumococos podem ser classificados em sorotipos. Até o momento 93 sorotipos distintos são reconhecidos (Yother 2011). A distribuição dos sorotipos nas diferentes populações varia com idade, região e período de tempo. Alguns sorotipos são responsáveis pela maioria das doenças, sendo que os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 23F, 45 e 46 estão entre os mais proeminentes em crianças (Johnson et al. 2010). Na América Latina >85% dos processos infecciosos pelo pneumococo são atribuídas a 13 sorotipos (Dias et al. 2007; Henriques-Normark et al. 2008). No Brasil um estudo com isolados de nasofaringe destacou os sorotipos 6B, 19F, 6A, 14, 15C e 23F (Neves et al. 2013), enquanto outro envolvendo isolados infecciosos invasivos em crianças destacou os sorotipos 14, 6B, 18C e 23F (Andrade et al. 2012), já em adultos outro estudo demonstrou maior heterogeneidade entre sorotipos infecciosos 3, 4, 7F, 12F, 14, 19A, 19F, 20 e 23F (Mott et al. 2014). Dois estudos populacionais avaliaram a capacidade invasiva dos diferentes sorotipos, sendo definida pela frequência relativa com que cada sorotipo foi encontrado na nasofaringe de portadores versus a

frequência de isolados em sítios anatômicos normalmente estéreis. Em ambos os estudos, os sorotipos 1, 4 e 7F foram identificados como aqueles com mais alto grau de invasividade (Brueggemann et al. 2003; Sandgren et al. 2004).

O papel central da cápsula na patogenia do pneumococo fez com que ela seja o alvo principal para intervenção por imunoprofilaxia. Vacinas baseadas nos polissacarídeos capsulares desencadeiam a resposta imune aos polissacarídeos da cápsula, com consequente estímulo de células B para a produção de anticorpos protetores. A vacina 23-valente, compreendendo os 23 sorotipos responsáveis por >85% dos sorotipos causadores de infecções pneumocócicas, é recomendada para indivíduos com >18 anos e riscos para doenças pneumocócicas (ex: imunodeficiências, idosos e doentes crônicos). No entanto apenas 21% das crianças produzem resposta imunológica adequada a esta vacina, na sendo recomendado seu uso em crianças (Mehr e Wood 2012). Esforços para obtenção de vacinas mais imunogênicas para prevenção de doenças pneumocócicas em crianças têm sido dirigidos para produtos conjugados com proteínas. A vacina 7-valente (PCV-7), conjugada com uma proteína contém 7 polissacarídeos (correspondendo aos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) (Zielen et al. 2000), e posteriormente as vacinas 10-valente (PCV-10) (incluindo os sorotipos 1, 5 e 7F) e 13-valente (PCV-13) (incluindo os sorotipos 3, 6A e 19A) (Mehr e Wood 2012). No Brasil, no ano de 2010 a PCV-10 passou a integrar o calendário oficial de vacinação.

1.2.2. Pneumolisina

Produzida pelo pneumococo é uma toxina hemolítica intracelular liberada em decorrência da lise do microrganismo. A presença do gene *ply* da pneumolisina é relacionada a praticamente todos os pneumococos (Paton et al. 1993). Esta proteína se liga ao colesterol da membrana plasmática eucariótica induzindo a formação de poros com consequente morte celular e resposta inflamatória, contribuindo no agravamento das doenças pneumocócicas (van der Poll e Opal 2009).

Sugere-se que em resposta a ação da pneumolisina há redução da atividade ciliar brônquica, assim reduzindo a limpeza do muco no trato respiratório inferior, e

ativação de células T CD4 (van der Poll e Opal 2009). Aparentemente a pneumolisina possui mais mecanismos de indução da inflamação, pois isolados sorotipo 1 possuem uma proteína sem capacidade citolítica mas com grande potencial de invasão e complicações (Kadioglu et al. 2008).

1.2.3. Proteínas de adesão

A aderência do pneumococo na mucosa respiratória é o fator inicial da colonização e posterior invasão tecidual. Algumas moléculas de superfície são sugeridas como essenciais a esse passo inicial, como as proteínas PsaA (*pneumococal surface antigen A*) e a PspC (*pneumococal surface protein C*), interagindo com moléculas distintas nas células do hospedeiro. Porém o padrão de expressão dessas moléculas durante a aderência celular não é uniforme entre diferentes sorotipos, o que indica diferentes mecanismos de aderência e invasão para isolados distintos (Desa et al. 2008). Apesar de serem considerados genes acessórios essas proteínas são frequentemente encontradas em isolados, e a diversidade alélica pode estar relacionada ao potencial aumentado ou reduzido de invasão (Henriques-Normark et al. 2008).

Outro mecanismo descrito é a apresentação de filamentos protéicos longos que se estende na superfície celular, conhecidos como pili. O pili expresso pelo *S. pneumoniae* é uma estrutura multimérica composto por três subunidades proteicas (RrgA, RrgB e RrgC), onde aparentemente a expressão de ao menos uma delas, a RrgA, é essencial para a capacidade de aderência relacionada ao pili (Nelson et al. 2007).

Além da capacidade de aderência promovida pelas proteínas de superfície, um grupo de proteínas conhecidas como as proteínas de ligação à colina (*choline-binding proteins*) possuem atividades diversas. A PspA (*pneumococal surface protein A*), em alguns sorotipos capsulares, interfere na capacidade de fixação da proteína C3 do complemento inibindo a opsonização e dificultando o reconhecimento imunológico, é uma proteína conservada e com potencial imunogênico, sendo avaliada como alvo proteico para imunizações. A PspC, anteriormente citada,

também se liga a receptores de imunoglobulina responsáveis por transportar a imunoglobulina A secretada (IgA), o que provavelmente é o primeiro passo para a translocação bacteriana. Adicionalmente PspC interage com o fator H do complemento reduzindo a capacidade de ativação da via alternativa e opsonização do pneumococo (Kadioglu et al. 2008).

1.2.4. Enzimas de superfície

A IgA é a principal imunoglobulina presente nas vias aéreas, sendo um dos mecanismos de proteção contra microrganismos invasores das superfícies nas mucosas, inibindo a aderência às células do hospedeiro. Isolados de pneumococo podem expressar uma IgA1 protease a qual cliva a IgA humana (Wani et al. 1996). Em decorrência deste mecanismo a eliminação de uma colonização apenas pode ocorrer após a produção de quantidades significativas de outras classes de imunoglobulinas, como as imunoglobulinas G (IgG), que não são hidrolisadas pela IgA1 protease (Kadioglu et al. 2008).

A enzima LytA é uma autolisina extremamente conservada que cliva as ligações peptídicas da parede bacteriana. Seu papel não está claro quanto à virulência, entretanto sugere-se que a ação autolítica proporciona a liberação da pneumolisina, peptideoglicanos e ácidos teicóicos, o que resulta em amplificação da inflamação (Obregon et al. 2002). Já as Neuraminidases, clivam resíduos glicídicos de glicoproteínas, glicolipídios e oligosacarídeos de superfície. Há diversidade de neuraminidases sintetizadas entre isolados, sendo a NanA e NanB importantes para sobrevivência do microrganismo no sangue e trato respiratório (Kadioglu et al. 2008).

A patogênese da doença pneumocócica está associada a intensidade da resposta inflamatória, a lesão tecidual resultante da mediação inflamatória acaba por permitir a disseminação do pneumococo e invasão. Uma zinco metaloprotease, ZmpB, está relacionada ao potencial de indução de mediadores inflamatórios, e homologias com a protease IgA1 (Blue et al. 2003). A capacidade de indução de complicações da pneumonia pela ZmpB foi relacionada a determinados alelos gênicos, concluindo que cepas não invasivas possuem similaridade com a

sequencia da cepa R6 (não invasiva) e as com potencial de complicação uma maior similaridade com a sequencia da cepa TIGR4 (reconhecidamente invasiva) (Hsieh et al. 2008).

1.2.5. Outros mecanismos

De fato a interação do pneumococo com as células da mucosa na nasofaringe e o estabelecimento do sucesso de uma colonização ou mesmo a invasão de tecidos e sobrevivência aos mecanismos de defesa do hospedeiro, são vias complexas envolvendo uma grande diversidade de elementos. Alguns são mais claramente relacionados ao sucesso de uma infecção, como a cápsula polissacarídica, mas evidentemente não são únicos e dependem de uma conjuntura de fatores e eventos. Na tabela 1 são demonstradas outras moléculas do pneumococo com potencial de virulência.

Tabela 1 – Outras estruturas com potencial de virulência no pneumococo.

Estruturas do pneumococo	Funções sugeridas
Ácidos lipoteicóicos	Interação com receptores TLR2 de leucócitos, promovendo inflamação (Weidenmaier e Peschel 2008).
Bacteriocinas	Peptídeos antimicrobianos inibindo competição bacteriana (Kadioglu et al. 2008).
Enolase	Interação com plasminogênio (Jedrzejewski 2001).
Fosforilcolina	Ligação aos receptores (rPAF) na superfície de células da nasofaringe (Weidenmaier e Peschel 2008).
Hialuronidase	Digestão de componentes da matriz extracelular que contenham ácido hialurônico (Jedrzejewski 2001).
PavA	Interação com fibronectina (Jedrzejewski 2001).
PiaA e PiuA	Componentes do sistema de transporte ABC, e resistência ao estresse oxidativo (Kadioglu et al. 2008).
PsrP	Interação com a superfície de plaquetas e aderência (van der Poll e Opal 2009).

PavA: Pneumococcal adhesion and virulence; PiaA: Pneumococcal iron acquisition A; PiuA: Pneumococcal iron uptake A; PsrP: Pneumococcal serine-rich repeat protein.

1.3. Doenças pneumocócicas

O pneumococo encontra-se entre os principais agentes de infecções em humanos devido a uma combinação de frequência e gravidade. Infecções como otites e sinusites causadas por pneumococos são extremamente comuns, e é estimado que o número anual de otites em crianças menores de 5 anos ultrapasse 50 milhões de casos em todo o mundo (de Quadros 2009). O isolamento do agente em cultura de fluídos normalmente estéreis configura doença pneumocócica invasiva (DPI), representadas pelas meningites, pneumonias e bacteremias. Os grupos etários de maior risco para estas doenças são crianças com menos de 2 anos e idosos com idade ≥ 65 anos. Globalmente, estima-se que cerca de 800.000 crianças morram a cada ano de doença pneumocócica, sendo que 90% das mortes ocorrem em países emergentes e destes casos 95,6% são de pneumonias, 0,7% meningites e 3,7% outras infecções invasivas (O'Brien et al. 2009). A relação caso-fatalidade na meningite pneumocócica pode alcançar 30% e sequelas são comuns entre os sobreviventes (Weisfelt et al. 2006). Entre 548 pacientes com meningite pneumocócica comprovada por cultura em Salvador, Bahia, a mortalidade foi de 37% em geral e de 46% em indivíduos com ≥ 50 anos (Gouveia et al. 2011).

1.3.1. Pneumonia e suas complicações

Devido a sua relação singular com o ambiente, o pulmão precisa defender-se da infecção de inúmeros microrganismos inalados. O pulmão, em geral, é bem sucedido em proteger-se, contudo, os casos de pneumonias bacterianas continuam sendo um grave problema de saúde (Hoogendijk et al. 2011). Pneumonia comunitária é, por definição, uma infecção aguda do parênquima pulmonar, ocorrida fora do ambiente hospitalar. Há grande variação quanto aos sintomas clínicos, podendo ser de leve a fulminante. Sintomas como expectoração purulenta, dispneia, febre, dor no peito e sibilância estão presentes, infiltrados podem ocorrer uni ou bilateral com presença de derrame na pleura, e o agente etiológico mais frequente é o pneumococo (Schultz et al. 2004).

A pneumonia é a maior causa isolada de mortalidade em crianças menores de 5 anos. O número global de casos de pneumonia pneumocócica é de difícil determinação, principalmente nos países emergentes com limitados meios de vigilância (Webster et al. 2011). No Brasil recentemente foram relatados 22.161 internações por pneumonia pneumocócica no Sistema Único de Saúde (SUS) e estimados um adicional de 7.587 internações quando o setor privado foi incluído, totalizando 29.748 internações por ano. O pneumococo foi identificado como o patógeno causal em 1% das hospitalizações por pneumonia global (2.254.815) na contabilidade do SUS (Novaes et al. 2011). O Departamento de Informática do SUS indica que a pneumonia foi a segunda principal causa de internações, correspondendo a 11,8% de todas as internações no Sudeste do Brasil em 2007 (Donalisio et al. 2011).

Pneumonias bacterêmicas são consideradas um quadro mais avançado de DPI, caracterizado pela presença do pneumococo na corrente circulatória. Uma menor proporção dos casos evolui com esta complicação, que parece ser mais frequente em indivíduos expostos a situações de vulnerabilidade (Burton et al. 2010; Cardoso et al. 2014). A prevalência estimada é de 12% a 16% dos casos de pneumonias, e relação com mortalidade (Plouffe et al. 1996; Palma et al. 2012).

O derrame parapneumônico (DPP) e o empiema são conhecidas complicações de pneumonias bacterianas. De 20% até 40% das pneumonias evoluem com derrame pleural e dessas 60% resultam em empiema (Schultz et al. 2004; Obando et al. 2008). O empiema é caracterizado pela migração do agente etiológico e presença de coleções de pus no espaço pleural, estando associadas ao maior tempo de hospitalizações, intervenções cirúrgicas e riscos para o paciente (Obando et al. 2008). Em 1995, Richard Light descreveu critérios para conduta do DPP e empiema baseado nas alterações de glicose, pH, LDH e achados microbiológicos no líquido pleural (LP), critérios estes muito utilizados até os dias atuais em decorrência das limitações dos métodos microbiológicos disponíveis (Light 1995).

Diversos estudos apresentam dados quanto ao DPP. Schultz e colaboradores avaliaram casos, em crianças, ocorridos no Texas entre 1993 e 2002. Do total de

culturas de LP realizadas 32% foram positivas, sendo que o pneumococo foi o agente mais frequentemente (Schultz et al. 2004). Noutro estudo realizado no Canadá nos anos 2002 a 2003, o índice de positividade das culturas foi reproduzido (32%) assim como o agente etiológico mais frequente. Porém, ao revisitar as amostras negativas a técnicas de PCR permitiu em até 70% dessas a identificação de DNA do pneumococo (Langley et al. 2008). Na Espanha dos casos de DPP o pneumococo esteve presente em 79%, sendo que dentre as amostras negativas por métodos convencionais de cultivo análises de PCR foram capazes de identificar o pneumococo em 84% (Obando et al. 2008). No Brasil foram conduzidos estudos na cidade de São Paulo, onde a positividade de culturas foi maior, aproximadamente 50% obtiveram o agente etiológico identificado. Em concordância com os demais estudos o *S. pneumoniae* foi o agente mais isolado (59,1%) (Cirino et al. 2004). A identificação do agente etiológico do empiema por métodos convencionais é difícil, em geral mais de 60% dos casos de derrame ou empiema não tem seu agente identificado, e por vezes o tratamento antimicrobiano é empírico ao invés de específico (Schultz et al. 2004). Diversos estudos demonstram um rendimento baixo para as culturas convencionais em líquidos pleurais de DPP com positivities de 18 – 49% (Cirino et al. 2004; Menezes-Martins et al. 2005; Kunyoshi et al. 2006; Langley et al. 2008; Picazo et al. 2013).

Alguns sorotipos estão mais associados ao DPP, como os sorotipos 1 e 5, e em menores proporções os sorotipos 3, 7F, 19A e 14, sendo o sorotipo 3 um fator de risco independente para complicações do DPP (Obando et al. 2008). Desde a introdução das vacinas pneumocócicas conjugadas há registros de redução nas taxas de colonização e infecções pneumocócicas. (Henriques-Normark et al. 2008). No entanto, registros de DPP se tornam mais frequentes (Byington et al. 2006; Gupta e Crowley 2006; Hendrickson et al. 2008). No Brasil, estudo recente destacou envolvimento dos sorotipos 14, 1, 6B, 3, 9V, 19A e 5 em 92,4% dos casos de DPP por pneumococo (Cardoso et al. 2014). Apesar de a PCV-10 estar disponível no Sistema Único de Saúde desde 2010, os sorotipos envolvidos na maioria dos casos são vacinas, representando ainda um momento de transição pré e pós-vacinação.

1.3.2. Meningites

A meningite bacteriana é uma inflamação das meninges, em especial a aracnóide e a pia-máter, associada à invasão da bactéria no espaço subaracnóideo (Hoffman e Weber 2009). Dependendo da idade, de 30 a 60% dos sobreviventes desenvolvem sequelas em longo prazo, incluindo perda auditiva, deficiências neurológicas e danos neurofisiológicos (Koedel et al. 2000).

A barreira hematoencefálica, interposta entre o sistema circulatório e o sistema nervoso central (SNC), é uma das principais barreiras de defesa do SNC, formada por células endoteliais cerebromicrovasculares que restringem a passagem de substâncias em direção ao SNC (Pardridge 1999). A invasão dos pneumococos e transmigração é promovida pela ativação das células endoteliais, as quais elevam a expressão de receptores rPAF na sua superfície, os quais interagem com proteínas externas da célula bacteriana. Uma vez que o patógeno tenha alcançado o líquido cefalorraquidiano (LCR), provavelmente sobreviverá, pois as defesas do hospedeiro dentro do SNC parecem ser ineficazes contra patógenos encapsulados, como o *S. pneumoniae*. Antes de ultrapassar a barreira, a principal defesa do hospedeiro envolve leucócitos polimorfonucleares, componentes do sistema complemento e imunoglobulinas, os quais praticamente não são encontrados no LCR (Mitchell e Mitchell 2010).

Conforme dados do DATASUS, obtidos a partir do *Sistema de Informação de Agravos de Notificação* (SINAN), em 2012 houve 21.321 casos de meningite confirmados no Brasil, dentre várias etiologias, sendo que desse total, 5,07% (1.081) foram causadas por pneumococos. A mortalidade total atribuída à meningite foi de 8,4% enquanto que para o pneumococo a mortalidade observada foi de 27% (Brasil 2014).

O tratamento adequado das meningites bacterianas depende do reconhecimento do agente etiológico. Porém, com o uso de técnicas convencionais de cultivo e microscopia é possível a identificação do pneumococo em aproximadamente 75% das amostras de LCR, sendo que o uso prévio de antimicrobianos reduz estes índices para 50% ou menos (Samra et al. 2003). O emprego de metodologias como o PCR possibilita um avanço na determinação da

etiologia das meningites, em estudo comparativo os métodos convencionais identificaram agentes causadores de meningites em 48% dos LCR ao passo que técnicas de PCR elevaram este percentual até 72%, principalmente em pacientes com uso prévio de antimicrobianos (Chiba et al. 2009). O uso de metodologias alternativas como a pesquisa de antígenos capsulares também tem demonstrado boa correlação no LCR, sensibilidade de 95,4% e especificidade de 100% (Samra et al. 2003). As técnicas de PCR e a pesquisa de antígenos capsulares se apresentam como importantes ferramentas complementares no diagnóstico das meningites pneumocócicas, em especial pela antecipação dos resultados e, para a pesquisa de antígeno, pela simplicidade metodológica.

Como comentado anteriormente, para o desfecho da DPP existe a influência de componentes do microrganismo e do paciente, contudo, para meningites, os desfechos dos pacientes não diferiram significativamente entre os sorotipos (Weinberger et al. 2010). Desde a introdução das vacinas conjugadas a incidência de meningites pneumocócicas está decaindo em regiões com cobertura vacinal, como nos Estados Unidos onde foi observada uma redução de 30% na primeira metade dos anos 2000 (Lynch e Zhanel 2010). Em países com poucos recursos e sem cobertura vacinal o pneumococo permanece como importante agente com elevadas taxas de mortalidade, como ocorre no continente Africano (Owusu et al. 2012). No entanto, apesar dos resultados animadores obtidos com a vacinação a incidência de casos por sorotipos não vacinais é notável e deve ser vigiada (Lynch e Zhanel 2010). No Brasil, anteriormente a introdução da vacina PCV-10, os sorotipos relacionados a meningites foram 14, 3, 23F, 19F, 6B, 18C e 6A (Menezes et al. 2011), sendo que dados a cerca da distribuição de sorotipos em meningites pós-vacina ainda não são robustos.

1.4. Técnicas laboratoriais de identificação do *S. pneumoniae*

Em grande parte, o diagnóstico de infecções pelo pneumococo é realizado por metodologias clássicas de cultivo e isolamento. Entretanto, estima-se que em aproximadamente 50% dos casos de pneumonias a etiologia permanece indefinida (Donalisio et al. 2011). Técnicas microbiológicas clássicas de cultivo ainda são as metodologias padrão ouro para diagnóstico de infecções pelo pneumococo, uma vez que o isolamento possibilita também a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana, porém, são metodologias limitadas, demoradas e resultados falsamente negativos podem ocorrer (Le Monnier et al. 2006). De maneira geral, os métodos convencionais são pouco sensíveis e o uso de técnicas moleculares e de detecção de antígenos vem sendo proposto nos últimos anos (Obando et al. 2008).

1.4.1. Métodos convencionais de cultura e identificação

A caracterização fenotípica laboratorial é a principal ferramenta de identificação do *S. pneumoniae* por meio da visualização da morfologia celular e colonial acrescida de testes de suscetibilidade a optoquina e solubilidade em bile. A visualização direta do pneumococo em espécimes clínicos é um método rápido que pode contribuir para uma identificação preliminar da etiologia de pneumonias e meningites. Contudo, esta técnica é extremamente dependente da experiência do observador e influenciada pelo uso prévio de antimicrobianos, demonstrando baixa sensibilidade ao entorno de 57 até 70% em casos confirmados pela cultura (de la Campa et al. 1997; Le Monnier et al. 2006).

S. pneumoniae cresce em meios de cultivo convencionais como o ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro em presença de atmosfera rica de CO₂. As colônias, como descritas anteriormente, são pequenas e geralmente com uma leve depressão central, podendo variar até colônias de aspecto mucóide, circundadas com zonas de alfa-hemólise (van der Poll e Opal 2009). Apenas a caracterização morfológica da colônia não é suficiente para diferenciação do *S.*

pneumoniae e o grupo de estreptococos viridans e testes adicionais devem ser realizados, destacando-se, o teste de suscetibilidade a optoquina e a bile solubilidade.

O teste de suscetibilidade a optoquina é um dos métodos mais corriqueiros realizados para diferenciação do pneumococo em relação aos demais estreptococos alfa-hemolíticos. Trata-se de um teste simples e de fácil interpretação baseado na inibição de crescimento do pneumococo na presença da optoquina. Basicamente, uma colônia é transferida para uma placa de ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro e um disco impregnado com 6µg de optoquina é colocado sobre a superfície da placa. A placa é incubada em CO₂ por 24 horas e a leitura é conduzida da seguinte maneira: zonas de inibição superiores a 14mm identificam *S. pneumoniae*. No entanto, esse tipo de identificação vem apresentando falhas, em especial pelo isolamento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a optoquina (Pinto et al. 2013). Convém ainda ressaltar que outra espécie mais recentemente descrita, *S. pseudopneumoniae*, também apresenta sensibilidade à optoquina quando incubada em atmosfera de aerobiose e resistente quando incubada em CO₂ (Arbique et al. 2004; Dias et al. 2007; Cortes et al. 2008).

O teste de bile solubilidade permite verificar a capacidade de autólise do pneumococo, pela autolisina LytA, na presença de desoxicolato de sódio (Obregon et al. 2002). As colônias a serem testadas são suspensas em 0,5 ml de solução fisiológica (escala de Mc Farland 0,5 a 1,0), em dois tubos. Em um dos tubos são acrescentados 0,5 ml de solução fisiológica. No segundo tubo acrescentam-se 0,5 ml de desoxicolato de sódio a 2%. Após 2 horas de incubação a 35°C é feita a leitura, sendo considerado um teste positivo quando ocorre clareamento da suspensão no tubo em que foi acrescentado o desoxicolato de sódio. Ainda que seja acurado, o teste pode apresentar dificuldades de leitura e interpretação (Winn et al. 2012).

1.4.2. Métodos de amplificação de ácidos nucleicos

Os testes fenotípicos da optoquina e da bile solubilidade são bastante tradicionais e bem adaptados aos laboratórios clínicos. Contudo, a diferenciação em relação a outras espécies intimamente relacionadas é imperfeita. Métodos de identificação não baseados em cultura têm seus resultados não dependentes do tempo de crescimento microbiano, sofrem menores interferências com a carga de patógeno presente, são mais específicos por terem alvos definidos em sequências de DNA, e podem também contribuir para o aumento da sensibilidade no diagnóstico de infecções pneumocócicas.

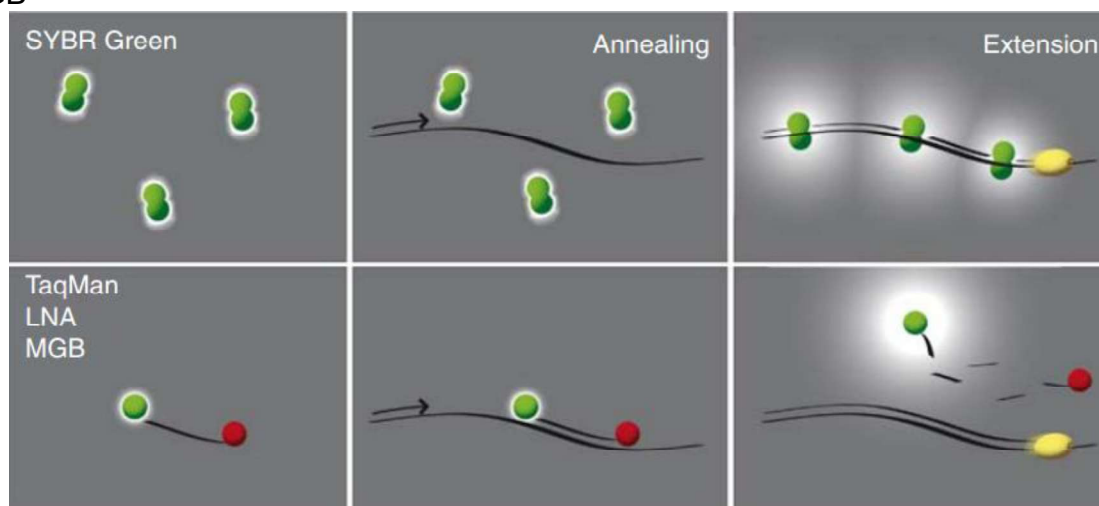
Estudos de avaliação de homologia pela hibridização DNA-DNA são as metodologias mais definitivas para discriminação entre a espécie *S. pneumoniae* e demais espécies relacionadas, possibilitando a identificação de isolados atípicos. No entanto estas metodologias são complexas e destinadas a laboratórios de pesquisa, não sendo aplicados para laboratórios clínicos (Carvalho et al. 2003). Metodologias alternativas de sequenciamento do RNAr 16S são consideradas, mas devemos ponderar que a elevada homologia entre *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis* e *S. pseudopneumoniae* (aproximadamente 99%) é um desafio para estes métodos. Um kit comercial, AccuProbe pneumococcus (Gen-Probe, San Diego, CA), baseado na sequência do RNAr 16S está disponível e pode ser considerado para identificação do pneumococo, apesar das dificuldades de diferenciação com *S. pseudopneumoniae* (Arbique et al. 2004). Em um estudo que utilizou esta sonda como método de referência, e envolveu 1733 organismos previamente identificados como *S. pneumoniae*, o teste de optoquina apresentou sensibilidade de 87,9% e especificidade de 59,3%, enquanto que para a bile solubilidade foram observadas sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 98,8% e 82,6% (Richter et al. 2008).

Outros ensaios de amplificação de ácidos nucleicos baseados na *polimerase chain reaction* (PCR), especialmente a *quantitative polimerase chain reaction* (qPCR), têm sido empregados através da utilização de alguns alvos gênicos (*ply*, *psaA*, *lytA*) (Lahti et al. 2006; Carvalho et al. 2007). Estes ensaios apresentam vantagens significativas eliminando a necessidade de isolamento bacteriano, são

rápidos quando comparados às metodologias convencionais, e principalmente, conseguem detectar quantidades diminutas de DNA bacteriano podendo ser aplicados diretamente em materiais clínicos como o LCR e outros líquidos (Chiba et al. 2009).

A qPCR é uma metodologia de amplificação de DNA, na qual é utilizado um marcador fluorescente na detecção dos fragmentos amplificados de DNA. A fluorescência emitida pela ligação com os fragmentos é detectada por um equipamento, permitindo o acompanhamento em tempo real da reação, e assim possibilitando a detecção e quantificação de DNA presente. Um dos marcadores mais clássicos é o corante intercalante SYBRGreen®, que se liga a fitas duplas de DNA emitindo fluorescência (Figura 2). Para distinção de amplificações inespecíficas é necessária uma análise posterior, como a comparação das curvas de dissociação (temperaturas de *melting*) dos fragmentos. A fim de reduzir o tempo de análise e aumentar a especificidade das reações outras metodologias baseadas em sondas, como TagMan MGB®, são propostas. Estas metodologias envolvem o acréscimo de um terceiro oligonucleotídeo (sonda), marcada com um fluoróforo e um *quencher*, específico para a sequência entre os dois *primers*. Ao ocorrer amplificação a sonda se liga a fragmento amplificado com liberação do fluoróforo que é detectado pelo equipamento (Figura 2). Estas metodologias dispensam uma análise posterior para distinguir amplificações inespecíficas (Buh Gasparic et al. 2010). Recentemente, metodologias de análise posterior da qPCR como o *High-Resolution Melting* (HRM) estão agregando precisão na avaliação dos fragmentos amplificados com baixo custo e simplicidade. A metodologia inicialmente descrita por Carl Wittwer utiliza corantes que podem ser saturados sem inibir a reação de PCR (ex. SYTO9, EVAGreen, MeltDoctor), ao contrário do SYBRGreen®, e o uso de equipamentos com controle acurado de temperaturas do bloco, assim permitindo a obtenção de uma curva de dissociação detalhada. Esta metodologia já foi padronizada para identificação de bactérias e fungos, genotipagem de espécies e detecção de genes de resistência antimicrobiana (Tong e Giffard 2012).

Figura 2 – Representação esquemática das metodologias SYBRGreen e TagMan MGB



(Buh Gasparic et al. 2010)

Em estudo avaliando a especificidade dos alvos gênicos para detecção do pneumococo, foi proposto que a utilização de uma qPCR para *lytA* (com os oligonucleotídeos iniciadores 5'-ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA-3' e 5'-TCGTGCGTTTTAATTCCAGCT-3') pode ser considerada para detecção do pneumococo em amostras de sítios anatômicos não estéreis, diferenciando os integrantes do grupo *viridans* inclusive *S. pseudopneumoniae*, e com limites de detecção inferiores a 10 cópias (Carvalho et al. 2007). Contudo, a utilização desta metodologia diretamente de espécimes clínicos merece cuidados, contaminações na fase pré-analítica mesmo que com baixas cópias podem induzir a resultados falsamente positivos; a presença de inibidores da reação em elevadas quantidades podem interferir na amplificação e hibridização dos oligonucleotídeos assim causando resultados falsamente negativos. Ligações não específicas em sequências repetitivas de DNA e mesmo ligações incompletas entre os iniciadores e a fita molde reduzem a sensibilidade e especificidade. E, por fim, a inexistência de um padrão ouro adequado pode estar gerando uma subestimação do desempenho da qPCR, e consequentemente estes métodos não obtêm a especificidades necessárias para uma aplicação clínica universal (Avni et al. 2010).

1.4.3. Métodos de detecção de antígenos

Uma segunda alternativa de métodos não baseados em culturas para detecção do pneumococo são os testes que avaliam a presença de antígenos diretamente em materiais clínicos. O polissacarídeo C é um antígeno que se acredita estar presente na parede celular de todos isolados de *S. pneumoniae* (Holmberg et al. 1985) e desde os anos 90 testes de aglutinação em látex para pesquisa deste antígeno são avaliados (Boersma et al. 1993).

Durante a última década foram introduzidos no mercado testes imunocromatográficos de membrana para pesquisa de antígeno e aprovados para uso em urina e LCR. O desempenho do teste em urina de adultos para diagnóstico de pneumonia pneumocócica variou de 70% até 88% de sensibilidade e 84,2% até 96% de especificidade. Para diagnóstico de meningite diretamente no LCR o desempenho observado foi de 95,4% de sensibilidade e 100% de especificidade (Gutierrez et al. 2003; Samra et al. 2003; Smith et al. 2009; Sinclair et al. 2013). O teste apresenta potencial para ser utilizado em outros espécimes clínicos, e estudos envolvendo LP demonstraram alguns resultados satisfatórios (Strachan et al. 2011; Picazo et al. 2013), no entanto investigações mais detalhadas precisam ser conduzidas. Apesar do desempenho promissor estes testes não são recomendados para diagnóstico de pneumonias em amostra de urina de crianças devido à positividade em indivíduos colonizados (Dowell et al. 2001; Hamer et al. 2002). Aparentemente, a presença do antígeno se mantém por períodos prolongados após a exposição ao pneumococo (Marcos et al. 2003), além de considerarmos que reações cruzadas com outros estreptococos podem gerar falso-positivos (Casado Flores et al. 2010) acabam por limitar o uso da técnica. Recentemente um estudo demonstrou a limitação de sensibilidade do teste de pesquisa de antígeno em comparação a qPCR, sugerindo que espécimes negativos pela pesquisa de antígeno deveriam ser confirmados através de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (Picazo et al. 2013).

1.4.4. Métodos de ionização e dessorção a laser assistida por matriz

Mais recentemente, avaliações envolvendo MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) vêm sendo dirigidas para diferentes microrganismos, apresentando uma alternativa para identificação rápida. Contudo, erros na identificação *S. mitis* (isolados identificados como *S. pneumoniae*) comprometem a acurácia do sistema (Moussaoui et al. 2010; Neville et al. 2011; Wessels et al. 2012). Em investigação que avaliou 23 isolados de *S. pneumoniae*, 2 de *S. pseudopneumoniae* e 29 outros estreptococos pertencentes ao grupo *mitis*, os testes da optoquina (incubação em ar ambiente), MALDI-TOF, e análise das sequências dos genes *tuf* e *rpoB* revelaram diversas inconsistências incluindo resultados falso-positivos, falso-negativos e inconclusivos (Afshar et al. 2009).

1.4.5. Métodos de sorotipagem

Os pneumococos são classificados em sorotipos e sorogrupos de acordo com os determinantes antigênicos presentes nos polissacarídeos capsulares e a determinação destes diferentes sorotipos circulantes é essencial para estudos de vigilância, impacto e eficácia vacinal. A reação de Quellung é tradicionalmente o padrão ouro para esta sorotipagem, sendo realizada a partir de um crescimento puro de *S. pneumoniae* em contato com antissoro específico para um ou diversos determinantes antigênicos capsulares. A reação positiva é evidenciada pela ligação dos anticorpos à superfície do pneumococo e subsequente tumefação observada pela refração ao microscópio (Austrian 1976). Esta metodologia é razoavelmente simples e pode ser realizada em qualquer local com recursos mínimos, porém o elevado custo para manutenção de um painel de antissoros, compreendendo os mais de 90 sorotipos capsulares, e a subjetividade de interpretação dos resultados limita sua aplicação aos centros de referência.

Mais recentemente, métodos de amplificação de ácidos nucleicos foram propostos para a definição dos tipos capsulares pneumocócicos. A síntese dos

polissacarídeos capsulares ocorre através de uma via comum e os genes que controlam este processo estão localizados no locus *cps*. Este locus, flanqueado pelos genes conservados *dexB* e *aliA*, apresenta regiões bem conservadas em quase todos os sorotipos, ao passo que a região central dos loci contém os genes sorotipo-específico, servindo de base para a classificação por métodos moleculares (Pai et al. 2006). Um PCR multiplex sequencial (com 7 reações e detecção de 28 sorotipos/sorogrupos) foi proposto para identificação dos sorotipos de ocorrência mais frequentes nos Estados Unidos durante a primeira metade da década passada, Tabela 2 (Pai et al. 2006). Esta técnica demonstrou versatilidade ao ser adaptada para os sorotipos mais frequentes na América Latina, determinando corretamente o sorotipo de mais de 90% das amostras (Dias et al. 2007).

Metodologias convencionais de sorotipagem não são aplicáveis em espécimes sem isolamento por cultivo, fato que limita nossa compreensão a cerca os sorotipos que estão associados a infecções uma vez que a minoria das condições infecciosas tem o agente etiológico isolado. Logo, metodologias baseadas em qPCR estão sendo avaliadas para sorotipagem do pneumococo diretamente de espécimes clínicos. Dois estudos apresentam ensaios qPCR sequenciais com sondas TaqMan[®] MGB validados para pesquisa e sorotipagem em LP, LCR e hemoculturas (Tabela 2) (Tarrago et al. 2008; Pimenta et al. 2013).

Tabela 2 – Descrição das metodologias de amplificação do locus *cps* para sorotipagem de *S. pneumoniae*.

Estudo	Pai et al. 2006	Tarrago et al. 2008	Pimenta et al. 2013
Metodologia	PCR convencional Multiplex	qPCR TaqMan® MGB Simplex e Duplex	qPCR TaqMan® MGB Triplex
Nº reações	7	10	7
Total sorotipos	28	16	21
Sorotipos / Sorogrupos	1, 3, 4, 5, 6A/B, 7F, 7C, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 31, 33, 34, 35B, 35F e 38	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F/A, 8, 9V/A/N/L, 14, 15B/C, 19A, 19F/B/C, 18C/B, 23F e 23A	1, 2, 3, 4, 5, 6A/B/C/D, 6C/D, 7F/A, 9V/A, 11A/D, 12F/A/B, 14, 15A/F, 16F, 18C/A/B/F, 19A, 19F, 22F/A, 23A, 23F e 33F/A/37
Espécimes avaliados	Isolados em cultivo	LP	LCR e hemoculturas

LCR: líquido cefalorraquidiano; LP: líquido pleural.

Assim, consideramos a importância de padronizar e avaliar as novas metodologias propostas para identificação e sorotipagem do pneumococo diretamente de materiais clínicos provenientes de pacientes com quadros sugestivos de infecção pneumocócica, mas não confirmados pelos métodos convencionais de cultura e isolamento. As metodologias moleculares de amplificação de ácidos nucleicos e pesquisas de antígenos estão se estabelecendo como as ferramentas do futuro para a microbiologia clínica, contudo o potencial destas ferramentas está criando novos paradigmas e a consolidação destas na prática clínica necessita de ampla investigação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Identificação de *Streptococcus pneumoniae* em líquido pleural de crianças através de métodos independentes de cultura, e caracterização de isolados invasivos por meio de análise do gene *zmpB*.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar um protocolo de ensaio qPCR do tipo SYBRGreen® para identificação de *S. pneumoniae* baseado em sequencia parcial do gene *lytA*;
- Investigar a prevalência de *S. pneumoniae* em amostras de líquido pleural de crianças com derrame parapneumônico em dois hospitais da cidade de Porto Alegre, através de ensaio qPCR do tipo SYBRGreen® para *lytA*;
- Avaliar o desempenho do teste imunocromatográfico para antígeno C do *S. pneumoniae* em líquidos pleurais na investigação da etiologia de derrames parapneumônicos;
- Padronizar um protocolo de ensaio PCR baseado em sequencia parcial do gene *zmpB* para amplificação de alelo associado com potencial de virulência;
- Investigar a presença de alelos do gene *zmpB* associado a potencial de virulência em isolados provenientes de infecções pneumocócicas invasivas por meio de ensaio de PCR baseado em sequencia parcial do gene *zmpB*.

3. ARTIGO - Rapid identification of pneumococcus among children with negative culture of pleural effusion

O presente manuscrito encontra-se formatado nas normas do periódico *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, na categoria *Full-length Article*.

Title

RAPID IDENTIFICATION OF PNEUMOCOCCUS AMONG CHILDREN WITH
NEGATIVE CULTURE OF PLEURAL EFFUSION

Running title

PNEUMOCOCCUS IN NEGATIVE PLEURAL EFFUSION

Authors

Vinicius Pieta Perez¹; Juliana Caierão¹; Gilberto Bueno Fischer²; Cícero Armídio
Gomes Dias¹; Pedro Alves d'Azevedo¹

Affiliations

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio
Grande do Sul, Brazil¹; Hospital da Criança Santo Antônio da Santa Casa de Porto
Alegre, Serviço de Pneumologia Pediátrica. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil².

Corresponding author

Mailing address: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua
Sarmiento Leite 245, Microbiologia, Sala 202, 90050-270, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: 55 51 33038740

Email: viniciuspperez@yahoo.com.br

Abstract

Pneumococcal parapneumonic effusion seems to be increasing in children in the post vaccine era, and is frequently associated with negative culture. Due to the low yield of culture, culture-independent tools are evaluated. Culture-negative pleural fluid specimens from 37 children with parapneumonic effusion were examined for pneumococcal *lytA* by qPCR and soluble antigen (C-polysaccharide) by an immunochromatographic test. In 30/37 (81%) and 24/38 (63%) specimens a positive result was obtained by qPCR and antigen detection, respectively. Most mismatches were observed in specimens with low levels of pneumococcal DNA and a negative antigens test. Our results indicate an imperfect relationship between the two methods described. Indeed, they detect different products (DNA and soluble antigen) and at this point is not possible to determine which one most truly represents pneumococcal infection.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*. Pleural effusion. Real-time PCR. C-polysaccharide. DNA quantification. Invasive pneumococcal disease.

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae is the most frequent cause of community-acquired pneumonia, and is often associated with other infections as sepsis, meningitis, and less severe conditions as sinusitis, conjunctivitis and otitis media (de Quadros, 2009; O'Brien, et al., 2009). Since the conjugated vaccines had been available, the burden of pneumococcal diseases decreased, but at the same time an increase in the rates of complicated pneumonia was reported (Gupta & Crowley, 2006; Hendrickson, et al., 2008). In Brazil, a 10-valent polysaccharide vaccine is widely used since 2010 and its effects are being evaluated.

Parapneumonic effusion (PPE) and empyema are known complications of pneumococcal pneumonia. Effusion occur at least 40% of complicated pneumonias, with 60% resulting in formation of empyema (Schultz, et al., 2004). In cases of PPE surgical procedures, as thoracentesis, chest tube drainage, and decortication, might be indicated as therapy in association with antibiotics (Light, 1995). Studies reported an increase in the incidence of empyema in children in post-vaccine era and most of these were associated to negative cultures (Byington, et al., 2006; Hendrickson, et al., 2008).

The pleural infection is complex and bacterial causes differ in adult and pediatric patients, geographical regions, and coverage of immunization programs (Lisboa, et al., 2011). Isolation of the causative agent is often difficult, and the use of empiric rather than specific therapy is widely employed. Detection of an agent from pleural fluid culture ranges from 18% to 33% (Menezes-Martins, et al., 2005; Kunyoshi, et al., 2006; Langley, et al., 2008; Picazo, et al., 2013). In the last decade, several studies suggested the use of molecular assays, as nucleic acid amplification, to diagnostic PPE, with higher sensitivity (Menezes-Martins, et al., 2005; Lahti, et al., 2006; Carvalho, et al., 2007; Obando, et al., 2008; Blaschke, et al., 2011). However, nucleic acid assays are not readily available at many institutions. Simple and rapid tests for detection of urinary antigens of *S. pneumoniae* may be useful to confirm pneumococcal infections and indicate an early and specific therapy. The BinaxNow *S. pneumoniae* is an immunochromatographic test used to detect pneumococcal soluble antigen (C-polysaccharides) in urine or cerebral spinal fluid, producing results

within 15 min. The urinary test, however, produces false-positive results when applied to children (Dowell, et al., 2001; Hamer, et al., 2002; Navarro, et al., 2004), and use of this diagnostic tool has not been extensively investigated in other clinical specimens, such as pleural fluid.

The aim of this study was to evaluate the use of a qPCR-based method and of an antigen detection system for detection of *S. pneumoniae* in culture negative pleural effusions from children presenting complicated pneumonia

2. Material and Methods

2.1. Patients inclusion and exclusion criteria

We conducted a prospective study during June 2010 to June 2013, among children with parapneumonic pleural effusion, and a negative microbiology culture of pleural fluid (PF) for *S. pneumoniae*, attended at the pneumology unit of two hospitals in Porto Alegre, Brazil. Children with clinical feature of pneumonia (history of cough or breathlessness, inability to feed, fever, tachypnea and/or tachycardia), radiological definition according to the *Standardized interpretation of paediatric chest radiographs for the diagnosis of pneumonia in epidemiological studies* (Cherian, et al., 2005), and undergoing a thoracocentesis were included in this study and medical records were revised. Patients with pleural effusion not requiring thoracocentesis or surgical decortication were excluded. Parents gave consent for their children's participation, and the research study was approved in the ethics committee (CEP/GHC 10-122 and CEP/ISCMPA 193-010).

2.2. Pleural fluid sample

Pleural fluid specimens obtained during thoracocentesis were sent for routine microbiology culture. During surgical procedure at least 2 mL of specimens were collected and frozen at -70°C for further analysis.

2.3. Real time qPCR

DNA was extracted from 0.2 mL specimens by a modification of the QiAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia CA) method, and stored at -20°C. Briefly, PF was added to 100 µL of lyses buffer (Tris-EDTA buffer, containing 0.04 g/mL lysozyme and 75 U/mL of mutanolysin [Sigma-Aldrich, St. Louis MO]) and incubated for 1 hour at 37°C, all subsequent steps were followed the manufacturer's instructions. The concentrations and quality of the DNA extracted were determined by spectrophotometric analysis in the BioSpec-Nano (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan).

The quantitative PCR was conducted by a modification of the assay developed by Carvalho and coworkers (2007), using SYBR-Green dye. The oligonucleotides

primers designed for *lytA* gene was the same of original assay (*lytA*-CDC), carried out in a final 12 μ L reaction volume using Fast SYBR[®]Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City CA), with 2 μ L of DNA sample and a primers final concentration of 200 nM. DNA was amplified with 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City CA) by using the following cycling parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. During each analysis a no-template control and a standard curves were developed using a template known concentrations of DNA. Serial 6-fold dilutions in TE buffer (Tris-EDTA) of purified synthesized template (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) was made to prepare standard DNA curve ranging from 10^5 to 32 copies. Definition of copies in PF were determined by equation $C = Q \times V_{DNA}/V_{PCR} \times 1/V_{EXT}$, where C is number of copies per microlitre of PF, Q is number of copies calculated by software, V_{DNA} is volume of extract, V_{PCR} is volume of DNA in reaction, and V_{EXT} is the volume of PF used for extraction. RNase P amplification was conducted as a positive amplification control, in order to exclude samples with reaction inhibitors. TaqMan Copy Number Reference Assay RNase P (Applied Biosystems, Foster City CA) were conducted following manufacturer's instructions. Amplification data and melting curves of assays were analyzed by instrument software.

2.4. Antigen detection

Pneumococcal antigen detection by immunochromatographic testing was performed with BinaxNow[®] *Streptococcus pneumoniae* (Alere Inc., Scarborough ME) in pleural fluid specimens following manufacturer's instructions for urine specimens.

2.5. Data about the patients

Information about the patients, including previous use of antibiotic, results of viral tests and of biochemical analysis were obtained from patients' charts.

2.6. Statistical analysis

Categorical data were showed in frequencies and the continuous data as DNA quantification were ranked in quartiles. Pneumococcal bacterial load data were Ln-transformed to assume a normal distribution. Continuous data were compared

by T test, and Kappa coefficient were use to measure agreement rate between qPCR and antigen test, P-value of 0.05 was considered significance. All analyses were made using PASW Statistics version 18.0 (SPSS Inc. Chicago, IL).

3. Results

Thirty-eight children with PPE were enrolled in this study. The average age was 63 months (range 11 to 197), and 65% were male. At the moment that PFs were collected, 33 (86.8%) of the children had been pre-treated with antibiotics and all received at least one β -lactam agent, being penicillin the most frequent antibiotic used, 26/38 (68.4%) children (table A1).

In only one culture of PF a positive result was obtained, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and blood cultures were negative for all children. Three patients presented a positive result for respiratory virus, 2 for sincial respiratory virus (LP27 and LP29), and 1 for Influenza A (LP23).

All specimens were tested by qPCR for RNase P and one sample (LP32) did not amplify *lytA*, being excluded from qPCR assays. The lower limit of detection for qPCR was 1 copy/ μ L with an average Ct (cycle threshold) of 32 $\pm$ 0.50, the standard curves generated had slopes of -3.2, with R^2 value >0.99 , and efficiencies ranged from 99.0% to 105%.

Of the 37 PFs, 30 (81%) specimen were positive for *S. pneumoniae* by qPCR. Quantification of *lytA* showed median of 64 copies/ μ L (range 2 to 153,000). Table A1 presents the results of *lytA* qPCR and quantification based on the quartiles distribution (<14 , 14-64, 65-409, >409 DNA copies/ μ L). The proportion of children that had not been pre-treated with antibiotics was larger in group with high bacterial load (>409 copies/ μ L), 42.8% (3/7), while in the group with low bacterial load (<14 copies/ μ L and 14-64 copies/ μ L) the proportion was 12.5% (1/8). In children presenting a negatives results for *lytA*, all had been pre-treated with antibiotics. Indeed, bacterial load was lower in patients with prior antibiotic treatment ($P = 0.007$).

In the antigen test, a positive result from PF was obtained in 24/38 (63.2%) children. Twenty-one were positive in both antigen test and qPCR. These include ten (62.5%) with quantification <14 copies/ μ L and between 14-64 copies/ μ L. The proportion of agreement increased in groups with higher quantifications, between 65 and 409 copies/ μ L and in group >409 copies/ μ L, 71.4% (5/7) and 85.7% (6/7) respectively. We found eleven mismatched results between *lytA* qPCR and antigen test. Two of

these were negative by qPCR and positive by antigen test. Among the remaining, six occurred in specimens with lower quantification (<14 copies/ μL and $14\text{--}64$ copies/ μL), and 3 in specimens with higher quantification ($65\text{--}409$ copies/ μL and > 409 copies/ μL) (Table A1). Indeed, sample LP32 had positive antigen test despite being excluded from qPCR. A fair agreement between Binax and qPCR was demonstrate (Kappa value 0.3, $P=0.042$), but when we exclude specimens with low number of copies, we could obtain a moderate agreement (Kappa value 0.48, $P=0.026$). Nevertheless, the DNA bacterial load did not differ between specimens positive and negative by the antigen test ($P=0.17$).

4. Discussion

PPE and empyema are severe complications of pneumococcal pneumonia that occur most commonly in previously healthy children under five years of age, associated with community acquired pneumonia and need for hospitalization (Sahn, 2007). In recent years, two new ingredients were added to this issue: different conjugate vaccines are being used in the pediatric (Dupont, et al., 2010) population and culture-independent methods were developed to the identification of the agent (Le Monnier, et al., 2006; Carvalho, et al., 2007; Martinon-Torres, et al., 2012). In children, the most common causative agent of PPE is pneumococcus (Sahn, 2007; Girdhar, et al., 2012). By conventional microbiology culture of PF, the agent is isolated in 18-33% of children and positive pneumococcal culture is found in about 68-75% of these children (Menezes-Martins, et al., 2005; Langley, et al., 2008; Blaschke, et al., 2011; Picazo, et al., 2013). The use of PCR for definition of pneumococcal as causative microorganism increases significantly to 71-75% (Lahti, et al., 2006; Blaschke, et al., 2011). We investigated the participation of *S. pneumoniae* in etiology of PPE in PF with negative report by conventional culture methods using a qPCR assay. The yield observed, similar to others studies (Menezes-Martins, et al., 2005; Lahti, et al., 2006; Carvalho, et al., 2007; Obando, et al., 2008; Blaschke, et al., 2011), confirms that qPCR could increase the identification and definition of PPE etiology.

In our study patients with less than 17 years of age were included; the mean age was approximately 5 years old, what is similar to observed elsewhere (Schultz, et al., 2004; Lahti, et al., 2006; O'Brien, et al., 2009). We conducted this study in a very specific group of patients: all had PPE and needed surgical intervention associated with antibiotic as treatment; only five patients did not have previous use of antibiotics. We observed that 30/37 (81%) of culture negative pleural fluids presented pneumococcal DNA according to qPCR for *lytA* results, pointing out, in accordance to other authors (Cirino, et al., 2004; Menezes-Martins, et al., 2005; Kunyoshi, et al., 2006; Langley, et al., 2008), the low sensitivity of culture for detection of *S. pneumoniae*. This was also true for antigen detection, since 24/38 (63.2%) children presented a positive test.

The high proportion of patients that previously received antibiotics, gave us an opportunity to investigate the effect of use of antibiotics on the results of qPCR and antigen detection tests. Also, the quantitative approach used in the present study allowed us an original sight on some issues. The DNA bacterial load differ between children that had been pre treated with antibiotics, among that had pneumococcal *lytA* detected in low levels (<14 copies/μl), 7/8 (87.5%) had been submitted to antibiotic treatment, contrasting with only 4/7 (57%) of those that presented high levels (>409 copies/μl), suggesting that not only culture, but also PCR results and antigen detection tests may suffer the influence of previous use of antibiotic. It is shown, indeed, that even in the presence of previous antibiotic treatment, qPCR may remain positive. In the groups of children with lower number of *lytA* copies (>14 and 14-64), only 62.5% (10/16) presented both a positive result in the antigen detection tests, whereas among children with 65-409 copies/μl 5/7 (71.4%) and group >409 copies/μl 6/7 (85.7%) had positive result in the antigen detection test verified too. The quantitative approach qualifies the concept that pneumococcal DNA detection is superior in sensitivity when compared to antigen detection tests (Le Monnier, et al., 2006), despite the difference in DNA bacterial load and antigen test performance was not confirmed statistically. Recently, the BinaxNow *Streptococcus pneumoniae* and qPCR were compared in a serial dilution of DNA highlighting the superior sensitivity of qPCR (Picazo, et al., 2013). Besides this, it is important to consider that the antigen detection test, producing results within a short period of time (15 minutes), being attractive in settings with limited resources.

The group of seven patients presenting negative results for qPCR in PF deserves special attention. In only one patient a bacterial agent (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) was found in PF culture. Interestingly, in two patients the presence of pneumococcal antigen was demonstrated in PF. Despite the sensitivity of antigen test, false positive results have been described especially with *Sreptococcus viridians* group (Alonso-Tarres, et al., 2001; Ploton, et al., 2006; Casado Flores, et al., 2010; Picazo, et al., 2013). Indeed, some reports of false positive results in urine (Dowell, et al., 2001; Hamer, et al., 2002; Navarro, et al., 2004) as a consequence of carriage among patients may indicate the complexity of the presence and clearance of antigen in biological fluid, suggesting that this issue is far from being utterly understood. All patients had received antibiotics, but at this

point at least in one child (LP13) presented results of biochemical analysis that were not compatible with an infectious cause (Light, 1995).

There are some limitations in our study. First, the small sample size; children included were only those with PPE that needed surgical procedure. Second, we do not have information about vaccination status of each child. The study was performed in a period when vaccination with 10-valent conjugated vaccine was widely available for children in Brazil. We need to consider, however, that most of the children in this study, 31/38 (81.5%), were older than two years, i.e., above the vaccination age. Some reports described an increase of non-vaccine serotypes involved with IPD (Munoz-Almagro, et al., 2008; Blaschke, et al., 2011), indicating that some serotypes, when present in PF, and in accordance with bacterial load are significantly associated with PPE (Esposito, et al., 2013). Here, we did not evaluate the serotypes of pneumococci causing PPE.

In conclusion, our results confirmed the value of qPCR using *lytA* gene to recognize the presence of pneumococcal infections in pleural cavity, particularly in patients that had been pre-treated with antibiotics. The immunochromatographic assay for antigen detection is simple and presents the conditions to be used as a bedside test, but negative results may need to be submitted to a more sensitive test, such as qPCR. Our results indicate an imperfect relationship between the two methods described; they detect different products (DNA and soluble antigen) and at this point it seems impossible to determine which one most truly represents pneumococcal infection.

5. Acknowledgments

We thank Nelson Kretzmann and Grasiela Agnes by technical aids and to Fernanda Mocelin for their assistance at Hospital da Criança Santo Antônio da Santa Casa de Porto Alegre. Grants: CAPES, CNPq, PRONEM, CNPq/FAPERGS (11/2058-5).

References

- Alonso-Tarres, C, Cortes-Lletget, C, Casanova, T, & Domenech, A. False-positive pneumococcal antigen test in meningitis diagnosis. *Lancet*. 2001: 358 (9289): 1273-4.
- Blaschke, AJ, Heyrend, C, Byington, CL, Obando, I, Vazquez-Barba, I, Doby, EH, Korgenski, EK, Sheng, X, Poritz, MA, Daly, JA, Mason, EO, Pavia, AT, & Ampofo, K. Molecular analysis improves pathogen identification and epidemiologic study of pediatric parapneumonic empyema. *Pediatr Infect Dis J*. 2011: 30 (4): 289-94.
- Byington, CL, Korgenski, K, Daly, J, Ampofo, K, Pavia, A, & Mason, EO. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumonic empyema. *Pediatr Infect Dis J*. 2006: 25 (3): 250-4.
- Carvalho, MG, Tondella, ML, McCaustland, K, Weidlich, L, McGee, L, Mayer, LW, Steigerwalt, A, Whaley, M, Facklam, RR, Fields, B, Carlone, G, Ades, EW, Dagan, R, & Sampson, JS. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007: 45 (8): 2460-6.
- Casado Flores, J, Nieto Moro, M, Berron, S, Jimenez, R, & Casal, J. Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural effusion for the rapid diagnosis of infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Pediatr*. 2010: 169 (5): 581-4.
- Cherian, T, Mulholland, EK, Carlin, JB, Ostensen, H, Amin, R, de Campo, M, Greenberg, D, Lagos, R, Lucero, M, Madhi, SA, O'Brien, KL, Obaro, S, & Steinhoff, MC. Standardized interpretation of paediatric chest radiographs for the diagnosis of pneumonia in epidemiological studies. *Bull World Health Organ*. 2005: 83 (5): 353-9.
- Cirino, LM, Gomes, FM, & Batista, BN. The etiology of extensive pleural effusions with troublesome clinical course among children. *Sao Paulo Med J*. 2004: 122 (6): 269-72.

- de Quadros, CA. From global to regional: the importance of pneumococcal disease in Latin America. *Vaccine*. 2009; 27 Suppl 3 C29-32.
- Dowell, SF, Garman, RL, Liu, G, Levine, OS, & Yang, YH. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. *Clin Infect Dis*. 2001; 32 (5): 824-5.
- Dupont, D, Mahjoub-Messai, F, Francois, M, Doit, C, Mariani-Kurkdjian, P, Bidet, P, Bonacorsi, S, Carol, A, & Bingen, E. Evolving microbiology of complicated acute otitis media before and after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine in France. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68 (1): 89-92.
- Esposito, S, Marchese, A, Tozzi, AE, Rossi, GA, Da Dalt, L, Bona, G, Pelucchi, C, Schito, GC, & Principi, N. DNA bacterial load in children with bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013.
- Girdhar, A, Shujaat, A, & Bajwa, A. Management of infectious processes of the pleural space: a review. *Pulm Med*. 2012; 2012 816502.
- Gupta, R, & Crowley, S. Increasing paediatric empyema admissions. *Thorax*. 2006; 61 (2): 179-80.
- Hamer, DH, Egas, J, Estrella, B, MacLeod, WB, Griffiths, JK, & Sempertegui, F. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis*. 2002; 34 (7): 1025-8.
- Hendrickson, DJ, Blumberg, DA, Joad, JP, Jhavar, S, & McDonald, RJ. Five-fold increase in pediatric parapneumonic empyema since introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27 (11): 1030-2.
- Kunyoshi, V, Cataneo, DC, & Cataneo, AJ. Complicated pneumonias with empyema and/or pneumatocele in children. *Pediatr Surg Int*. 2006; 22 (2): 186-90.
- Lahti, E, Mertsola, J, Kontiokari, T, Eerola, E, Ruuskanen, O, & Jalava, J. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal

- pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; 25 (12): 783-9.
- Langley, JM, Kellner, JD, Solomon, N, Robinson, JL, Le Saux, N, McDonald, J, Ulloa-Gutierrez, R, Tan, B, Allen, U, Dobson, S, & Joudrey, H. Empyema associated with community-acquired pneumonia: a Pediatric Investigator's Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *BMC Infect Dis*. 2008; 8 129.
- Le Monnier, A, Carbonnelle, E, Zahar, JR, Le Bourgeois, M, Abachin, E, Quesne, G, Varon, E, Descamps, P, De Blic, J, Scheinmann, P, Berche, P, & Ferroni, A. Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction, and pneumococcal antigen detection in pleural fluids. *Clin Infect Dis*. 2006; 42 (8): 1135-40.
- Light, RW. A new classification of parapneumonic effusions and empyema. *Chest*. 1995; 108 (2): 299-301.
- Lisboa, T, Waterer, GW, & Lee, YC. Pleural infection: changing bacteriology and its implications. *Respirology*. 2011; 16 (4): 598-603.
- Martinon-Torres, F, Dosil-Gallardo, S, Perez del Molino-Bernal, ML, Sanchez, FP, Tarrago, D, Alvez, F, Diaz, SP, Martinon-Torres, N, & Martinon Sanchez, JM. Pleural antigen assay in the diagnosis of pediatric pneumococcal empyema. *J Crit Care*. 2012; 27 (3): 321 e1-4.
- Menezes-Martins, LF, Menezes-Martins, JJ, Michaelsen, VS, Aguiar, BB, Ermel, T, & Machado, DC. Diagnosis of parapneumonic pleural effusion by polymerase chain reaction in children. *J Pediatr Surg*. 2005; 40 (7): 1106-10.
- Munoz-Almagro, C, Jordan, I, Gene, A, Latorre, C, Garcia-Garcia, JJ, & Pallares, R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (2): 174-82.
- Navarro, D, Garcia-Maset, L, Gimeno, C, Escribano, A, & Garcia-de-Lomas, J. Performance of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay for diagnosis of pneumonia in children with underlying pulmonary

- diseases in the absence of acute pneumococcal infection. *J Clin Microbiol*. 2004; 42 (10): 4853-5.
- O'Brien, KL, Wolfson, LJ, Watt, JP, Henkle, E, Deloria-Knoll, M, McCall, N, Lee, E, Mulholland, K, Levine, OS, & Cherian, T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009; 374 (9693): 893-902.
- Obando, I, Munoz-Almagro, C, Arroyo, LA, Tarrago, D, Sanchez-Tatay, D, Moreno-Perez, D, Dhillon, SS, Esteva, C, Hernandez-Bou, S, Garcia-Garcia, JJ, Hausdorff, WP, & Brueggemann, AB. Pediatric parapneumonic empyema, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14 (9): 1390-7.
- Picazo, JJ, Contreras, JR, Rios, E, Culebras, E, Rodriguez-Avial, I, Mendez, C, & Betriu, C. Rapid diagnosis of invasive pneumococcal disease in pediatric population. *J Microbiol Methods*. 2013; 93 (2): 116-20.
- Ploton, C, Freydiere, AM, Benito, Y, Bendridi, N, Mazzocchi, C, Bellon, G, & Vandenesch, F. *Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema in children: rapid diagnosis by using the Binax NOW immunochromatographic membrane test in pleural fluids. *Pathol Biol (Paris)*. 2006; 54 (8-9): 498-501.
- Sahn, SA. Diagnosis and management of parapneumonic effusions and empyema. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 (11): 1480-6.
- Schultz, KD, Fan, LL, Pinsky, J, Ochoa, L, Smith, EO, Kaplan, SL, & Brandt, ML. The changing face of pleural empyemas in children: epidemiology and management. *Pediatrics*. 2004; 113 (6): 1735-40.

Table A1. Results of qPCR for *lytA*, immunochromatography for C-antigen among 37 pleural fluids from children with negative culture for *Streptococcus pneumoniae*

Id.	Age (months)	<i>LytA</i> qPCR	<i>LytA</i> Quantification	Antigen test	Culture	Antibiotic
LP06	52	+	<14 cp/μL	+	-	PEN
LP19	133	+		+	-	PEN / OXA / CRO
LP24	50	+		-	-	AMX
LP25	77	+		+	-	PEN / OXA
LP27	189	+		-	-	PEN
LP28	74	+		-	-	
LP31	34	+	14 - 64 cp/μL	+	-	PEN / AMX / CRO / SAM
LP36	47	+		+	-	PEN
LP07	22	+		+	-	AMC
LP10	186	+		-	-	PEN
LP12	51	+		-	-	AMX
LP16	41	+		-	-	PEN
LP18	130	+	65 - 409 cp/μL	+	-	PEN
LP23	14	+		+	-	
LP35	53	+		+	-	PEN / AMX
LP38	55	+		+	-	PEN / AMX
LP02	22	+		-	-	AMC
LP05	22	+		+	-	PEN / AMC / CLI
LP17	58	+	>409 cp/μL	+	-	PEN / OXA / CRO
LP20	32	+		+	-	PEN / CRO / AZI
LP29	11	+		-	-	VAN / CXM
LP30	70	+		+	-	PEN / CPM / VAN
LP33	29	+		+	-	OXA / CRO / COM / VAN
LP11	82	+		-	-	PEN / AMX
LP37	55	+		+	-	PEN
LP22	22	+		+	-	PEN / AMX
LP04	30	+		+	-	PEN / CXM
LP21	63	+		+	-	
LP09	76	+		+	-	
LP08	76	+		+	-	
LP01	11	-		-	MRSA	PEN / AMX
LP03	33	-		-	-	PEN / OXA / CTX / CFL
LP13	197	-		+	-	PEN / AMX
LP14	67	-		-	-	PEN / AMX
LP15	51	-		-	-	PEN / CXM
LP26	20	-		+	-	VAN / CPM / PTZ
LP34	62	-		-	-	PEN / AMX

AMC, amoxicillin+clavulanate; AMX, amoxicillin; AZI, azitromycin; CFL, cefalexin; CLI, clindamycin; CPM, cefepime; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; OXA, oxacillin; PEN, Penicillin; PPT, piperacilin+tazobactan; SAM, ampicillin+sulbactam; VAN, vancomycin.

4. CARTA AO EDITOR – ZmpB gene in *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis

O presente manuscrito encontra-se formatado nas normas do periódico *Journal of Medical Microbiology*, na categoria *correspondence*.

zmpB gene in *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis

Vinícius Pieta Perez¹, Monique Hahn¹, Grasiela Agnes², Juliana Caierão¹, Cícero Armídio Gomes Dias¹, Pedro Alves d'Azevedo¹

¹Laboratório de Cocos Gram-Positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. ²Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Corresponding author

Mailing address: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite 245, Microbiologia, Sala 202, 90050-270, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: 55 51 33038740

Email: viniciusperez@yahoo.com.br

Streptococcus pneumoniae is among the leading and most aggressive (around 30% of attributable mortality) causes of meningitis (Van de Beek et al., 2004; O'Brien et al., 2009) and the pathogenesis of this infection is not clearly understood. The capsular polysaccharide plays a central role in the pathogenesis of pneumococcal infection; however other virulence factors need to be considered. An intense inflammatory response is observed in infections due to *S. pneumoniae* and this is at least partially attributed to ZmpB, a zinc metalloprotease present in virtually all pneumococcal strains. It was demonstrated that levels of proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha in lung tissue were significantly lower and the survival time increased in an animal model when the challenge was performed with a mutant strain lacking *zmpB* gene (Blue et al., 2003). Results of a recent study suggest that ZmpB is a potential candidate for pneumococcal vaccine antigen, since immunization with *zmpB*-based vaccine showed protection against pneumococcal disease in mice (Gong et al., 2011). Besides this, in a model of complicated pneumonia in mice, the influence of sequence variation of *zmpB* gene was established; isolates originally obtained from children with complicated pneumonia presented sequences with high identity to those of a well-defined virulent strain of *S. pneumoniae* (TIGR4- genBank access number: AE005672.3) and were capable to induce a stronger inflammatory response in the animal model (Hsieh et al., 2008). The influence of this allelic variation was not investigated so far in other forms of invasive pneumococcal disease, and we aimed to study the DNA sequences of *zmpB* gene of pneumococcal isolates obtained from meningitis cases. A total of nine pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid of patients with meningitis was used in this study. DNA extraction was performed according to previously described (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/files/pcr-DNA-extraction-culture-May2009.pdf>). DNA was employed for serotyping (Dias et al., 2007) and for amplification of *zmpB* (Hsieh et al., 2008). After the *zmpB* amplification step, DNA was purified (Purelink PCR Purification Kit, Invitrogen) and sequenced in an ABI 3130 (Applied Biosystems) apparatus. Sequencing was performed by using primer forward (PHRED values = 25) and the FASTA format of sequences were compared to the *zmpB* of TIGR4 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). It was sequenced a 224 pb fragment of the C-terminal region, which harbored the target sequence with the higher degree of variability:

5-

TCATCACTTAGAACAGACTCACCATCTGTTTTAGATTGTTGTTTATATTTATTTGA

AGCATAACCTAAGAACCCATTT-3'). Among the nine pneumococcal isolates, serotype distribution was as follows: 7F (n=2), 9V (n=1), 12F (n=1), 14 (n=2), 20 (n=1), 23F (n=1), and 34 (n=1). Eight isolates presented 97-100% of identity with the *zmpB* sequence of TIGR4; while one isolate, belonging to serotype 20, presented a lower level (84%) of identity. Our results indicate that there is a low degree of diversity in the sequence of *zmpB* analyzed among pneumococci obtained from meningitis, independent of the serotype and a high identity with TIGR4 is expected. This may suggest that this particular allele of *zmpB* not only induces a stronger inflammatory response (not verified in this study), but may also provide conditions for pneumococci to cross the defenses of the blood-brain barrier and invade the meninges. Further investigation is necessary to better elucidate the role of allelic variation of *zmpB* in the pneumococcal meningitis, including studies with animal models. Besides this, a comparative approach of *zmpB* sequences of pneumococci obtained from the nasopharynx of healthy carriers would permit other insights about this issue.

References

- Blue, C.E., Paterson, G.K., Kerr, A.R., Bergé M., Claverys J.P. & Mitchell, T.J.** (2008) *zmpB*, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces Tumor Necrosis factor alpha production in the respiratory tract. *Infect Immun* **71**:4925-4935.
- Dias, C.A.; Teixeira, L.M.; Carvalho, M.G. & BEALL, B.** (2007) Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol* **56**:1185-1188.
- Hsieh, Y.C., Tsao, P.N., Chen, C.L.; Lin, T.L., Lee, W.S., Shao, P.L., Lee, C.Y., Hsueh, P.R., Huang, L.M. & Wang, J.T.** (2008) Establishing of a young mouse model and identification of an allelic variation of *zmpB* in complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Care Med* **36**: 1248-1255.
- Gong, Y., Xu, W., Cui, Y., Zhang, X., Yao, R., Li, D., Wang, H., He, Y., Cao, J. & Yin Y.** (2008) Immunization with a *ZmpB*-based protein vaccine could protect against pneumococcal diseases in mice. *Infect Immun* **79**:867-78.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T., Hib & Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team.** (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**: 893-902.
- van de Beek, D., de Gans, J., Spanjaard, L., Weisfelt, M., Reitsma, J.B. & Vermeulen, M.** (2004) Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* **351**: 1849-59.

5. Discussão

O trabalho aqui apresentado possui dois principais enfoques: Primeiramente, investigar a participação do pneumococo em condições infecciosas invasivas comparando duas metodologias independentes de cultivo, o qPCR e o teste de antígeno capsular. E por segundo, a caracterização de pneumococos envolvidos em DPI pela avaliação do gene *zmpB* e quando possível sorotipagem.

Inicialmente, foi utilizado um ensaio previamente descrito para amplificação do *lytA* por qPCR para investigação da prevalência do pneumococo em espécimes clínicos. O ensaio inicial proposto por Carvalho e colaboradores em 2007, compreende a amplificação de uma região com 75 pb do gene *lytA* de *S. pneumoniae* e detecção com uma sonda TaqMan[®] MGB específica. No estudo de Carvalho, o ensaio foi avaliado em comparação com testes fenotípicos (sensibilidade a optoquina e bile solubilidade), hibridização DNA-DNA, e outros quatro pares de *primers* por qPCR (*psaA*, *lytA* e *ply*). Na avaliação de um painel de isolados atípicos e intimamente relacionados (grupo *viridans*, e *S. pseudopneumoniae*) o ensaio com os *primers lytA*-CDC foi inferior apenas a hibridização, apresentando excelente especificidade. Neste estudo a especificidade dos *primers* descritos (*lytA*-CDC) foi confirmada através de avaliação pela ferramenta GenBank BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), concluindo com base nas sequências até então depositadas, a amplificação apenas do fragmento parcial do gene *lytA* de pneumococo. O ensaio escolhido foi adaptado com o uso de metodologia baseada em corante fluorescente SYBRGreen[®], oposto a TaqMan[®] MGB inicial. O corante SYBRGreen[®] se liga de forma inespecífica a fitas duplas de DNA, e o complexo formado por DNA+SYBRGreen[®] pode ser detectado pela emissão de fluorescência. À medida que ha amplificação do DNA na PCR ocorre a detecção exponencial do aumento de fluorescência. Nenhuma das duas metodologias aparenta ser significativamente superior, porém algumas características favorecem cada uma delas, e ensaios podem ter desempenhos igualmente favoráveis diante de uma adequada otimização (Buh Gasparic et al. 2010). Uma vez que o corante SYBRGreen[®] é inespecífico a confirmação do produto amplificado deve ser realizada por uma análise posterior, e neste caso foi utilizada a análise da curva de dissociação comparada a um padrão (sequência sintetizada e

purificada do fragmento de 75pb do *lytA*, pela empresa Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unido). Uma curva de diluições seriadas 1:5 com seis pontos (10^5 até 32 cópias/ μ L) foi empregada obtendo uma eficiência de 103% e limite de detecção 1 cópia/ μ L.

Os métodos padrões de isolamento e identificação do pneumococo possuem baixo rendimento e são suscetíveis a interferentes como o uso prévio de antimicrobianos (Langley et al. 2008; Nyambat et al. 2008). Nesse contexto os métodos de amplificação de ácidos nucleicos como a qPCR são promissores, especialmente pela elevada sensibilidade e agilidade. O ensaio aqui proposto foi empregado em líquidos pleurais (LP) de crianças com DPP e cultura negativa para *S. pneumoniae* detectando a presença de *lytA* em 81% dos casos. Achados estes que estão em concordância com o exposto em estudos prévios utilizando os genes *ply* e/ou *lytA* em LP com positivities de 79% até 89% (Obando et al. 2008; Casado Flores et al. 2010; Martinon-Torres et al. 2012; Picazo et al. 2013), apenas um estudo apresentou resultados discrepantes com positivities de 49% para *lytA* em LP provenientes de empiema, entretanto o mesmo estudo confirma o ganho de rendimento em comparação às culturas, e o baixo rendimento pode estar atribuído a um uso prévio de antimicrobianos em 100% dos casos (Strachan et al. 2011).

A sensibilidade conferida para o ensaio qPCR do *lytA* na literatura é de 100% (Picazo et al. 2013), porém a avaliação acerca da sensibilidade neste estudo não é possível. O experimento inicial proposto por Carvalho observou sensibilidades de 100% em fluído de ouvido médio e LCR, entretanto em soro houve inconsistências com a não detecção de sete amostras positivas por cultivo (sensibilidade de 53%). A baixa sensibilidade foi atribuída à vasta presença de inibidores da reação de PCR (Carvalho et al. 2007). Uma vez que todos os LP incluídos nesta pesquisa são negativos para cultura de pneumococo foi adicionado a realização de um qPCR para RNase P, afim de avaliar a presença de inibidores da reação reduzindo o risco de falsos negativos. Entretanto, embora cuidados para evitar a degradação prévia de DNA do pneumococo tenham sido empregados, é sugerido que logo após o início da administração de antimicrobianos se inicia a degradação de DNA e apesar de o mesmo persistir após o cessar da viabilidade microbiana ele não se manterá indefinidamente e mesmo o qPCR pode ser negativo (Saglani et al. 2005).

A avaliação da especificidade do ensaio carece de um padrão ouro adequado. A cultura convencional permite a identificação do agente etiológico do DPP em apenas 18% até 50% dos casos (Cirino et al. 2004; Schultz et al. 2004; Menezes-Martins et al. 2005; Nyambat et al. 2008; Strachan et al. 2011; Picazo et al. 2013). Em contrapartida o qPCR pode detectar vestígios do microrganismo mesmo não estando mais viável e com limites de detecção <10 cópias. Logo, a avaliação de resultados falsos positivos é limitada pelas restrições metodológicas do padrão ouro. Em dois estudos a pesquisa de qPCR foi conduzida em espécimes previamente considerados negativos pela cultura, em um 43 e em outro 118 LP foram incluídos e a positividade obtida pela PCR foi de 70% e 84% respectivamente (Eltringham et al. 2003; Obando et al. 2008). Um dos importantes interferentes no baixo rendimento das culturas é o uso prévio de antimicrobianos, considerando que em nossa amostragem 86,8% dos casos possuíam uso prévio à coleta do LP, estes dados valorizam a proposta do estudo, e a investigação de crianças com DPP e LP negativo pelo cultivo através de metodologias independentes de isolamento.

As metodologias baseadas em amplificação de ácidos nucleicos apresentam resultados promissores, e em diversas situações a sua sensibilidade e especificidade é somada a da cultura para determinação do padrão ouro laboratorial na definição da etiologia das doenças pneumocócicas, principalmente em meningites e DPP (Chiba et al. 2009; Casado Flores et al. 2010; Picazo et al. 2013). Outras metodologias independentes de isolamento são propostas, destacando a pesquisa do antígeno C por técnicas imunológicas. Na última década um kit comercial imunocromatográfico em membrana para pesquisa do antígeno C, BinaxNow *Streptococcus pneumoniae*, foi desenvolvido e aprovado para pesquisas em urina e LCR (Gutierrez et al. 2003). O teste de antígeno foi aplicado nas amostras de LP permitindo a identificação em 63,2% dos casos. Em estudos anteriores envolvendo 199 LP e LCR o teste de antígeno permitiu a identificação em 65,8% versus 18,1% da cultura (Picazo et al. 2013), em outro estudo envolvendo 73 LP a positividade observada para o teste de antígenos foi 82% (Casado Flores et al. 2010), porém em um envolvendo 130 LP apenas 47% foram positivos (Strachan et al. 2011), todavia apesar das discrepâncias todos os estudos indicam um melhor rendimento em comparação aos métodos de cultura no LP. Para a pesquisa de pneumococo em LP as sensibilidades e especificidades descritas variam de 83,8 até

88% e 71% até 93,5% respectivamente, utilizando cultura e PCR como referência (Casado Flores et al. 2010; Strachan et al. 2011; Esposito et al. 2013; Picazo et al. 2013). Ao utilizar o qPCR como padrão nos 37 LP investigados obtemos sensibilidade de 70% (intervalo de confiança de 95%: 50-84%) e especificidade de 71% (30-94%). Portanto, estes dados indicam que o teste de antígeno é um método com potencial para definição da etiologia da DPP com melhor rendimento que a cultura, e tendo como vantagens sua simplicidade e menor influência do uso prévio de antimicrobianos sobre seu desempenho.

A abordagem quantitativa do qPCR permitiu uma nova perspectiva sobre o desempenho e interferentes nas metodologias utilizadas, uma vez que a maioria dos estudos compara a performance do teste de antígeno versus PCR e cultura, ou desfecho versus carga bacteriana. No grupo de crianças estudadas foi realizada uma estratificação em quartis de acordo com a carga de DNA bacteriano detectado, e ao observarmos estes grupos em relação ao desempenho do teste de antígeno podemos verificar uma concordância maior nos grupos com carga bacteriana elevada. De fato, a sensibilidade do qPCR permite a detecção bacteriana em concentrações 28 vezes menores em comparação ao teste de antígeno (Picazo et al. 2013). Ao analisarmos a concordância dos dois métodos pelo índice Kappa, observamos uma fraca correlação com índice de 0,3 ($P=0,042$), no entanto ao desconsiderarmos as amostras com baixa carga de DNA bacteriano obtemos uma correlação moderada com índice de 0,48 ($P=0,026$). Com base nestes resultados e no até então exposto podemos sugerir que resultados negativos pelo teste de antígeno devem ser confirmados por metodologias mais sensíveis como a qPCR para *lytA*. De qualquer modo, a correlação entre qPCR e teste imunocromatográfico é imperfeita, e de fato os ensaios detectam produtos diferentes (DNA e antígeno) e a dinâmica do surgimento e desaparecimento destes produtos quando da formação do DPP é ainda desconhecida. O teste de detecção de antígeno apresenta as características favoráveis de um teste de beira de leito (rapidez e simplicidade).

As crianças incluídas neste estudo possuíam critérios clínicos compatíveis com DPP pneumocócico, e protocolos terapêuticos para tal foram estabelecidos, tendo a cura como desfecho em todos os casos. Em decorrência da progressão da doença pneumocócica o uso prévio de antimicrobianos é extremamente frequente, sendo aqui observado em 86,8% dos casos. Outros estudos também apresentam

percentuais elevados 75,6%, 59%, 86% até 100% (Menezes-Martins et al. 2005; Le Monnier et al. 2006; Blaschke et al. 2011; Strachan et al. 2011). O qPCR pode ter sofrido interferência do uso prévio de antimicrobianos, uma vez que nos pacientes com uso prévio de antimicrobianos a carga bacteriana encontrada foi significativamente menor ($P=0,007$), naqueles com quantificações elevadas (>409 cópias/ μ L) 43% não possuíam uso prévio enquanto o grupo com baixa carga 87,5% e 100% dos negativos possuíam uso prévio, relação que também foi confirmada em estudo que avaliou a carga bacteriana e uso de antimicrobianos (Munoz-Almagro et al. 2011). Neste estudo não investigamos outros dados que poderiam auxiliar na compreensão do envolvimento da carga bacteriana no LP e doença pneumocócica, como tempo de internação e necessidade de tratamento intensivo. Acreditamos que a introdução destes dados em estudos futuros irá contribuir para a determinação do uso dos dados de quantificação de carga bacteriana, por exemplo, no manejo do paciente.

A primeira investigação a qual este trabalho se propôs nos permitiu avaliar a aplicação de duas ferramentas de diagnóstico laboratorial na definição da etiologia do DPP. Apesar dos esforços para redução do impacto das doenças pneumocócicas, os DPP seguem sendo relatados e o pneumococo é o agente etiológico mais frequente (Hendrickson et al. 2008), assim se faz necessário o aprimoramento das ferramentas disponíveis na sua investigação. Com base nos achados expostos, o ensaio qPCR para *lytA* aqui padronizado é uma ferramenta com desempenho satisfatório na investigação da etiologia das DPI, mas não deve ser substitutiva a cultura, uma vez que é direcionada a um agente etiológico e não possibilita a avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. As informações adicionais proporcionadas por esta metodologia, como a quantificação, permitem um novo olhar no diagnóstico e acompanhamento do paciente. Por fim, o teste para pesquisa de antígeno é uma ferramenta extremamente simples e complementar a cultura possibilitando resultados mais breves. No entanto, as limitações deste teste sugerem a necessidade de confirmação dos resultados negativos por uma técnica mais sensível como a qPCR.

O segundo enfoque deste trabalho envolve a caracterização dos pneumococos relacionados à DPI. O desfecho e evolução da DPI são imprevisíveis havendo influência de fatores do hospedeiro e elementos bacterianos, a

compreensão das características, como sorotipos e fatores de virulência presentes, necessita ser investigada nas DPI. A presença da cápsula polissacarídica é consolidada com um dos principais fatores bacterianos para estabelecimento de um processo infeccioso (Mehr e Wood 2012). Entretanto, outros elementos estão relacionados a colonização, invasão e progressão das doenças pneumocócicas (Jedrzejewski 2001; Kadioglu et al. 2008). Um dos fatores bacterianos associados à complicação é o potencial de indução de resposta inflamatória. A proteína de parede, ZmpB foi descrita como potencial mediadora da inflamação pulmonar, uma vez que camundongos inoculados com mutantes *knockout* para o gene *zmpB* apresentaram níveis de citocinas pró-inflamatórias significativamente menores e tempo de sobrevivência maior em comparação a inoculação com cepas selvagens (Blue et al. 2003). Em estudo posterior se observou que a variação alélica do gene *zmpB* afeta este potencial de indução inflamatória em modelos animais. Resumidamente, se avaliou um isolado obtido de doença pneumocócica não complicada (pneumonia lobar, NTUH-P3) e um de doença pneumocócica complicada (pneumonia necrotizante, NTUH-P15). Ao translocar o *zmpB* de NTUH-P15 para NTUH-P3, foi observada elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos camundongos inoculados, ao passo que o processo inverso não alterou significativamente a resposta inflamatória (Hsieh et al. 2008). Aparentemente o alelo de *zmpB* de NTUH-P15 é encontrado em cepas invasivas conforme identidade observada com a cepa TIGR4 (Frolet et al. 2010), descrita como virulenta (Tettelin et al. 2001).

Neste trabalho desenvolvemos uma PCR para amplificação parcial e específica do alelo de *zmpB* presente em TIGR4, de acordo com o previamente descrito por Hsieh e colaboradores, 2008. Brevemente, foram desenhados pares de *primers* através de análise da sequência: AE005672.3 e avaliados pela ferramenta do GenBank BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para amplificação de um fragmento com 224 pb contendo a sequência alvo de 78 pb: 5'-TCATCACTTAGAACAGACTCACCATCTGTTTTAGATTGTTGTTTATATTTATTTGAAGCATAACCTAAGAACCCATTT-3'. Os produtos amplificados foram sequenciados para confirmação e avaliação da identidade com TIGR4. Em um estudo piloto empregamos estes métodos em 93 isolados clínicos de pneumococo, observando uma prevalência de 22,6% (21/93) e elevada identidade (>95%) em 95% dos isolados, sendo que um isolado pertencente ao sorotipo 15A apresentou baixa

identidade (87%). Os sorotipos encontrados foram: 14 (n=12), 7F (n=2), 9V (n=2), 23F (n=1), 15A (n=1). Neste caso, observamos uma associação entre o sorotipo 14 e o alelo TIGR4 de *zmpB*, 85,7% apresentaram elevada identidade, sendo este sorotipo o mais prevalente na coleção (15%) (Perez et al. 2012).

Ao aplicar esta metodologia em isolados de meningites, oito apresentaram identidade elevada (>97%), pertencentes aos sorotipos 7F (n=2), 14 (n=2), 9V (n=1), 12F (n=1), 20 (n=1), 23F (n=1), e 34 (n=1), e um, pertencente ao sorotipo 20, apresentou baixa identidade (84%). Estes dados indicam uma baixa diversidade da sequência analisada entre pneumococos obtidos de meningites, independente do sorotipo avaliado, e elevada identidade com TIGR4. Sugerindo que o alelo de *zmpB* não só induz resposta inflamatória, mas também pode contribuir para a invasão da barreira hemato-encefálica e meninges. De fato, até o momento não se conhece a função e substrato da ZmpB mas uma possível interação com colágeno IV foi relatada (Frolet et al. 2010).

Nossa segunda investigação se propôs a caracterizar pneumococos invasivos por meio da diversidade do gene *zmpB* e sorotipos em meningites, um estudo parcial, dados não publicados (Apêndice B), demonstrou a presença deste alelo também em LP de crianças com DPP. Porém, esta observação conserva diversas dúvidas e novas investigações são necessárias para elucidar o papel da variação alélica de *zmpB* nas doenças pneumocócicas, incluindo estudos com modelos animais. Além disso, uma abordagem comparativa de sequências *zmpB* de pneumococos obtidos a partir da nasofaringe de portadores nos permitiria outras perspectivas sobre esta questão.

A caracterização dos sorotipos envolvidos em DPI é essencial na era das vacinas conjugadas, uma vez que o desenvolvimento de estratégias de imunização é constituído nos dados de prevalência de sorotipos (Hausdorff et al. 2000). De fato, devemos monitorar a prevalência de sorotipos pós-introdução das vacinas uma vez que relatos de sorotipos não vacinais emergentes ocorrem mundialmente (Mehr e Wood 2012). Metodologias convencionais de sorotipagem, como a Quellung, não são aplicáveis em espécimes sem isolamento por cultivo, fato que limita nossa compreensão, e o uso prévio de antimicrobianos pode estar ocasionando em uma valorização excessiva de sorotipos resistentes (Sheppard et al. 2004). Dois estudos

apresentam ensaios qPCR sequenciais com sondas TaqMan® MGB validados para pesquisa e sorotipagem diretamente em LP e LCR (Tarrago et al. 2008; Pimenta et al. 2013). Em nossos estudos, dados não publicados (apêndice A), é proposto um ensaio baseado em qPCR e análise da curva de dissociação por *High-Resolution Melting* para identificação de 13 sorotipos de *S. pneumoniae*. Contudo, a aplicação desta ferramenta em amostras clínicas permanece a ser investigada. O uso destas ferramentas diretamente em materiais clínicos está contribuindo para nossa compreensão acerca da distribuição de sorotipos e impacto dos programas de vacinação na população e de fato, o reconhecimento da distribuição de sorotipos presentes em DPI no Brasil precisa ser conduzido a fim de determinar a eficácia do programa de vacinação com PCV-10 instituído.

Os estudos aqui conduzidos possuem algumas limitações, a investigação do ensaio qPCR apenas foi conduzido em um grupo de amostras muito específicas e a avaliação da sua performance em espécimes clínicos distintos incluindo não infecciosos contribuirá para uma avaliação aprofundada de sua especificidade. A relação entre as metodologias moleculares, qPCR, e pesquisa de antígenos é imperfeita. Devemos considerar que cada método detecta diferentes produtos e, assim como ocorre para as culturas, o uso prévio de antimicrobianos pode interferir no desempenho dos testes. O conhecimento da carga bacteriana em LP é promissor na definição de um prognóstico e diagnóstico da DPP, para tal novos estudos prospectivos precisam ser conduzidos estabelecendo pontos de corte e a relação com as complicações e desfecho.

Diante do exposto, este trabalho confirma a participação do pneumococo como principal causa de DPP em crianças, sugerindo a utilização de ferramentas independentes de cultura. E, caracteriza a presença de um fator de virulência bacteriano em condições de infecções pneumocócicas.

6. Conclusões

- Foi adaptado e padronizado um ensaio qPCR baseado em metodologia SYBRGreen® para detecção e quantificação do gene *lytA* de *S. pneumoniae*;
- qPCR detectou DNA de *Streptococcus pneumoniae* em 81% de amostras de líquido pleural com cultura negativa;
- A utilização de testes de pesquisa de antígenos por imummocromatografia em LP contribui para determinação da etiologia em amostras com cultura negativa, no entanto, resultados negativos devem ser confirmados por qPCR;
- Pneumococos isolados de meningites apresentam alta identidade genética na sequência alvo de *zmpB* previamente relacionada com resposta inflamatória aumentada em casos de pneumonia complicada, independente do sorotipo

7. Perspectivas

A partir dos trabalhos apresentados e da continuidade dos projetos desenvolvidos, são perspectivas de investigações futuras:

- Avaliar o valor prognóstico da carga bacteriana em LP pelo qPCR para *lytA* diante de complicações como necessidade de internação em unidade de terapia intensiva, tempo de resolução dos sintomas, tempo de internação e morte;
- Avaliar a especificidade do teste de antígeno em LP não infecciosos, de crianças e adultos, correlacionando a positividade com colonização nasofaríngea;
- Aperfeiçoar os ensaios de qPCR sequencial com análise por *High-Resolution Melting* para sorotipagem de pneumococos diretamente do LP;
- Investigar a variabilidade alélica do *zmpB* em isolados de portadores e isolados invasivos;
- Investigar os efeitos de isolados de pneumococo de acordo com a variabilidade alélica de *zmpB* em modelos animais de meningites;
- Relacionar a diversidade do *zmpB* diante de desfechos como necessidade de internação em unidade de terapia intensiva, tempo de resolução dos sintomas, tempo de internação e morte.

Referências

- Afshar, N., J. Tabas, K. Afshar and R. Silbergleit. Blood cultures for community-acquired pneumonia: are they worthy of two quality measures? A systematic review. **J Hosp Med** 4, 2: 112-123. 2009.
- Andrade, A. L., R. Oliveira, M. A. Vieira, R. Minamisava, V. Pessoa, Jr., M. C. Brandileone, S. L. Alves, F. Alfieri, R. Pagliarini, J. C. Moraes, S. Gray and G. L. Rodgers. Population-based surveillance for invasive pneumococcal disease and pneumonia in infants and young children in Goiania, Brazil. **Vaccine** 30, 10: 1901-1909. 2012.
- Arbique, J. C., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Quesne, G. Carvalho Mda, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, D. Jackson, R. J. Davidson and R. R. Facklam. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. **J Clin Microbiol** 42, 10: 4686-4696. 2004.
- Austrian, R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. **Mt Sinai J Med** 43, 6: 699-709. 1976.
- Avni, T., N. Mansur, L. Leibovici and M. Paul. PCR using blood for diagnosis of invasive pneumococcal disease: systematic review and meta-analysis. **J Clin Microbiol** 48, 2: 489-496. 2010.
- Bentley, S. D., D. M. Aanensen, A. Mavroidi, D. Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy, M. A. Quail, G. Samuel, I. C. Skovsted, M. S. Kalløft, B. Barrell, P. R. Reeves, J. Parkhill and B. G. Spratt. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. **PLoS Genet** 2, 3: e31. 2006.
- Blaschke, A. J., C. Heyrend, C. L. Byington, I. Obando, I. Vazquez-Barba, E. H. Doby, E. K. Korgenski, X. Sheng, M. A. Poritz, J. A. Daly, E. O. Mason, A. T. Pavia and K. Ampofo. Molecular analysis improves pathogen identification and epidemiologic study of pediatric parapneumonic empyema. **Pediatr Infect Dis J** 30, 4: 289-294. 2011.
- Blue, C. E., G. K. Paterson, A. R. Kerr, M. Berge, J. P. Claverys and T. J. Mitchell. ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. **Infect Immun** 71, 9: 4925-4935. 2003.
- Boersma, W. G., A. Lowenberg, Y. Holloway, H. Kuttscrutter, J. A. Snijder and G. H. Koeter. Rapid detection of pneumococcal antigen in pleural fluid of patients with community acquired pneumonia. **Thorax** 48, 2: 160-162. 1993.
- Bogaert, D., R. De Groot and P. W. Hermans. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis** 4, 3: 144-154. 2004.
- Brasil, M. d. S. (2014). "Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)." Retrieved 15/04/2014, 2014, from <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>.
- Brueggemann, A. B., D. T. Griffiths, E. Meats, T. Peto, D. W. Crook and B. G. Spratt. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. **J Infect Dis** 187, 9: 1424-1432. 2003.
- Buh Gasparic, M., T. Tengs, J. L. La Paz, A. Holst-Jensen, M. Pla, T. Esteve, J. Zel and K. Gruden. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for

- qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Anal Bioanal Chem** 396, 6: 2023-2029. 2010.
- Burton, D. C., B. Flannery, N. M. Bennett, M. M. Farley, K. Gershman, L. H. Harrison, R. Lynfield, S. Petit, A. L. Reingold, W. Schaffner, A. Thomas, B. D. Plikaytis, C. E. Rose, Jr., C. G. Whitney and A. Schuchat. Socioeconomic and racial/ethnic disparities in the incidence of bacteremic pneumonia among US adults. **Am J Public Health** 100, 10: 1904-1911. 2010.
- Byington, C. L., K. Korgenski, J. Daly, K. Ampofo, A. Pavia and E. O. Mason. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumonic empyema. **Pediatr Infect Dis J** 25, 3: 250-254. 2006.
- Cardoso, M. R., C. M. Nascimento-Carvalho, F. Ferrero, E. N. Berezin, R. Ruvinsky, C. C. Sant'anna, M. C. Brandileone, F. March Mde, R. Maggi, J. Feris-Iglesias, Y. Benguigui and P. A. Camargos. Empyema and bacteremic pneumococcal pneumonia in children under five years of age. **J Bras Pneumol** 40, 1: 69-72. 2014.
- Carvalho, M. G., A. G. Steigerwalt, T. Thompson, D. Jackson and R. R. Facklam. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol** 41, 9: 4415-4417. 2003.
- Carvalho, M. G., M. L. Tondella, K. McCaustland, L. Weidlich, L. McGee, L. W. Mayer, A. Steigerwalt, M. Whaley, R. R. Facklam, B. Fields, G. Carlone, E. W. Ades, R. Dagan and J. S. Sampson. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. **J Clin Microbiol** 45, 8: 2460-2466. 2007.
- Casado Flores, J., M. Nieto Moro, S. Berron, R. Jimenez and J. Casal. Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural effusion for the rapid diagnosis of infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Eur J Pediatr** 169, 5: 581-584. 2010.
- Chiba, N., S. Y. Murayama, M. Morozumi, E. Nakayama, T. Okada, S. Iwata, K. Sunakawa and K. Ubukata. Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. **J Infect Chemother** 15, 2: 92-98. 2009.
- Cirino, L. M., F. M. Gomes and B. N. Batista. The etiology of extensive pleural effusions with troublesome clinical course among children. **Sao Paulo Med J** 122, 6: 269-272. 2004.
- Cortes, P. R., G. E. Pinas, A. G. Albarracin Orio and J. R. Echenique. Subinhibitory concentrations of penicillin increase the mutation rate to optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother** 62, 5: 973-977. 2008.
- de la Campa, A. G., E. Garcia, A. Fenoll and R. Munoz. Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. **Microb Drug Resist** 3, 2: 177-193. 1997.
- de Quadros, C. A. From global to regional: the importance of pneumococcal disease in Latin America. **Vaccine** 27 Suppl 3: C29-32. 2009.
- Desa, M. N., P. Navaratnam, J. Vadivelu and S. D. Sekaran. Expression analysis of adherence-associated genes in pneumococcal clinical isolates during adherence to human respiratory epithelial cells (in vitro) by real-time PCR. **FEMS Microbiol Lett** 288, 1: 125-130. 2008.
- Dias, C. A., G. Agnes, A. P. Frazzon, F. D. Kruger, P. A. d'Azevedo, G. Carvalho Mda, R. R. Facklam and L. M. Teixeira. Diversity of mutations in the *atpC* gene coding for the c Subunit of F₀F₁ ATPase in clinical isolates of optochin-

- resistant *Streptococcus pneumoniae* from Brazil. **J Clin Microbiol** 45, 9: 3065-3067. 2007.
- Dias, C. A., L. M. Teixeira, G. Carvalho Mda and B. Beall. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **J Med Microbiol** 56, Pt 9: 1185-1188. 2007.
- Donalisio, M., C. Arca and P. Madureira. Perfil clínico, epidemiológico e etiológico de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade internados em um hospital geral da microrregião de Sumaré, SP. **J Bras Pneumol** 37, 2: 200-208. 2011.
- Dowell, S. F., R. L. Garman, G. Liu, O. S. Levine and Y. H. Yang. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. **Clin Infect Dis** 32, 5: 824-825. 2001.
- El Aila, N. A., S. Emler, T. Kaijalainen, T. De Baere, B. Saerens, E. Alkan, P. Deschaght, R. Verhelst and M. Vaneechoutte. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. **BMC Infect Dis** 10: 104. 2010.
- Eltringham, G., A. Kearns, R. Freeman, J. Clark, D. Spencer, K. Eastham, J. Harwood and J. Leeming. Culture-negative childhood empyema is usually due to penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype 1. **J Clin Microbiol** 41, 1: 521-522. 2003.
- Esposito, S., A. Marchese, A. E. Tozzi, G. A. Rossi, L. Da Dalt, G. Bona, C. Pelucchi, G. C. Schito and N. Principi. DNA bacterial load in children with bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2013.
- Frolet, C., M. Beniazza, L. Roux, B. Gallet, M. Noirclerc-Savoye, T. Vernet and A. M. Di Guilmi. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. **BMC Microbiol** 10: 190. 2010.
- Gouveia, E. L., J. N. Reis, B. Flannery, S. M. Cordeiro, J. B. Lima, R. M. Pinheiro, K. Salgado, A. V. Mascarenhas, M. G. Carvalho, B. W. Beall, M. G. Reis and A. I. Ko. Clinical outcome of pneumococcal meningitis during the emergence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: an observational study. **BMC Infect Dis** 11: 323. 2011.
- Gupta, R. and S. Crowley. Increasing paediatric empyema admissions. **Thorax** 61, 2: 179-180. 2006.
- Gutierrez, F., M. Masia, J. C. Rodriguez, A. Ayelo, B. Soldan, L. Cebrian, C. Mirete, G. Royo and A. M. Hidalgo. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. **Clin Infect Dis** 36, 3: 286-292. 2003.
- Hamer, D. H., J. Egas, B. Estrella, W. B. MacLeod, J. K. Griffiths and F. Sempertegui. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. **Clin Infect Dis** 34, 7: 1025-1028. 2002.
- Hausdorff, W. P., J. Bryant, P. R. Paradiso and G. R. Siber. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis** 30, 1: 100-121. 2000.
- Hendrickson, D. J., D. A. Blumberg, J. P. Joad, S. Jhavar and R. J. McDonald. Five-fold increase in pediatric parapneumonic empyema since introduction of

- pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatr Infect Dis J** 27, 11: 1030-1032. 2008.
- Henriques-Normark, B., C. Blomberg, J. Dagerhamn, P. Battig and S. Normark. The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. **Nat Rev Microbiol** 6, 11: 827-837. 2008.
- Hoffman, O. and R. J. Weber. Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. **Ther Adv Neurol Disord** 2, 6: 1-7. 2009.
- Holmberg, H., A. Krook and A. M. Sjogren. Determination of antibodies to pneumococcal C polysaccharide in patients with community-acquired pneumonia. **J Clin Microbiol** 22, 5: 808-814. 1985.
- Hoogendijk, A. J., S. H. Diks, T. van der Poll, M. P. Peppelenbosch and C. W. Wieland. Kinase activity profiling of pneumococcal pneumonia. **PLoS One** 6, 4: e18519. 2011.
- Hoskins, J., W. E. Alborn, Jr., J. Arnold, L. C. Blaszczyk, S. Burgett, B. S. DeHoff, S. T. Estrem, L. Fritz, D. J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J. S. Glass, H. Khoja, A. R. Kraft, R. E. Lagace, D. J. LeBlanc, L. N. Lee, E. J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S. M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C. W. Mundy, T. I. Nicas, F. H. Norris, M. O'Gara, R. B. Peery, G. T. Robertson, P. Rockey, P. M. Sun, M. E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C. A. Zook, R. H. Baltz, S. R. Jaskunas, P. R. Rosteck, Jr., P. L. Skatrud and J. I. Glass. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. **J Bacteriol** 183, 19: 5709-5717. 2001.
- Hsieh, Y. C., P. N. Tsao, C. L. Chen, T. L. Lin, W. S. Lee, P. L. Shao, C. Y. Lee, P. R. Hsueh, L. M. Huang and J. T. Wang. Establishment of a young mouse model and identification of an allelic variation of *zmpB* in complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Crit Care Med** 36, 4: 1248-1255. 2008.
- Jedrzejewski, M. J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. **Microbiol Mol Biol Rev** 65, 2: 187-207 ; first page, table of contents. 2001.
- Johnson, H. L., M. Deloria-Knoll, O. S. Levine, S. K. Stoszek, L. Freimanis Hance, R. Reithinger, L. R. Muenz and K. L. O'Brien. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. **PLoS Med** 7, 10: 2010.
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton and P. W. Andrew. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol** 6, 4: 288-301. 2008.
- Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura and T. Ezaki. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. **Int J Syst Bacteriol** 45, 2: 406-408. 1995.
- Kawamura, Y., R. A. Whaley, S. E. Shu, T. Ezaki and J. M. Hardie. Genetic approaches to the identification of the *mitis* group within the genus *Streptococcus*. **Microbiology** 145 (Pt 9): 2605-2613. 1999.
- Koedel, U., I. Bayerlein, R. Paul, B. Sporer and H. W. Pfister. Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis. **J Infect Dis** 182, 5: 1437-1445. 2000.
- Kolkman, M. A., W. Wakarchuk, P. J. Nuijten and B. A. van der Zeijst. Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete *cps* locus and identification of genes

- encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. **Mol Microbiol** 26, 1: 197-208. 1997.
- Kunyoshi, V., D. C. Cataneo and A. J. Cataneo. Complicated pneumonias with empyema and/or pneumatocele in children. **Pediatr Surg Int** 22, 2: 186-190. 2006.
- Lahti, E., J. Mertsola, T. Kontiokari, E. Eerola, O. Ruuskanen and J. Jalava. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 25, 12: 783-789. 2006.
- Langley, J. M., J. D. Kellner, N. Solomon, J. L. Robinson, N. Le Saux, J. McDonald, R. Ulloa-Gutierrez, B. Tan, U. Allen, S. Dobson and H. Joudrey. Empyema associated with community-acquired pneumonia: a Pediatric Investigator's Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. **BMC Infect Dis** 8: 129. 2008.
- Le Monnier, A., E. Carbonnelle, J. R. Zahar, M. Le Bourgeois, E. Abachin, G. Quesne, E. Varon, P. Descamps, J. De Blic, P. Scheinmann, P. Berche and A. Ferroni. Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction, and pneumococcal antigen detection in pleural fluids. **Clin Infect Dis** 42, 8: 1135-1140. 2006.
- Light, R. W. A new classification of parapneumonic effusions and empyema. **Chest** 108, 2: 299-301. 1995.
- Lopez, A. D. and C. D. Mathers. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. **Ann Trop Med Parasitol** 100, 5-6: 481-499. 2006.
- Lynch, J. P., 3rd and G. G. Zhanel. Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. **Curr Opin Pulm Med** 16, 3: 217-225. 2010.
- Marcos, M. A., M. T. Jimenez de Anta, J. P. de la Bellacasa, J. Gonzalez, E. Martinez, E. Garcia, J. Mensa, A. de Roux and A. Torres. Rapid urinary antigen test for diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults. **Eur Respir J** 21, 2: 209-214. 2003.
- Martinon-Torres, F., S. Dosil-Gallardo, M. L. Perez del Molino-Bernal, F. P. Sanchez, D. Tarrago, F. Alvez, S. P. Diaz, N. Martinon-Torres and J. M. Martinon Sanchez. Pleural antigen assay in the diagnosis of pediatric pneumococcal empyema. **J Crit Care** 27, 3: 321 e321-324. 2012.
- Mehr, S. and N. Wood. Streptococcus pneumoniae--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. **Paediatr Respir Rev** 13, 4: 258-264. 2012.
- Menezes-Martins, L. F., J. J. Menezes-Martins, V. S. Michaelsen, B. B. Aguiar, T. Ermel and D. C. Machado. Diagnosis of parapneumonic pleural effusion by polymerase chain reaction in children. **J Pediatr Surg** 40, 7: 1106-1110. 2005.
- Menezes, A. P., L. C. Campos, M. S. dos Santos, J. Azevedo, R. C. Dos Santos, G. Carvalho Mda, B. W. Beall, S. W. Martin, K. Salgado, M. G. Reis, A. I. Ko and J. N. Reis. Serotype distribution and antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. **Vaccine** 29, 6: 1139-1144. 2011.
- Mitchell, A. M. and T. J. Mitchell. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. **Clin Microbiol Infect** 16, 5: 411-418. 2010.
- Mott, M., J. Caierao, G. Rosa da Cunha, L. R. Rodrigues Perez, R. Matusiak, K. R. Pilger de Oliveira, P. A. d'Azevedo and C. Dias. Susceptibility profiles and

- correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **Int J Infect Dis** 20: 47-51. 2014.
- Moussaoui, W., B. Jaulhac, A. M. Hoffmann, B. Ludes, M. Kostrzewa, P. Riegel and G. Prevost. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. **Clin Microbiol Infect** 16, 11: 1631-1638. 2010.
- Munoz-Almagro, C., S. Gala, L. Selva, I. Jordan, D. Tarrago and R. Pallares. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 30, 3: 327-335. 2011.
- Nelson, A. L., J. Ries, F. Bagnoli, S. Dahlberg, S. Falker, S. Rounioja, J. Tschop, E. Morfeldt, I. Ferlenghi, M. Hilleringmann, D. W. Holden, R. Rappuoli, S. Normark, M. A. Barocchi and B. Henriques-Normark. RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol** 66, 2: 329-340. 2007.
- Neves, F. P., T. C. Pinto, M. A. Correa, R. dos Anjos Barreto, L. de Souza Gouveia Moreira, H. G. Rodrigues, C. A. Cardoso, R. R. Barros and L. M. Teixeira. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. **BMC Infect Dis** 13: 318. 2013.
- Neville, S. A., A. Lecordier, H. Ziochos, M. J. Chater, I. B. Gosbell, M. W. Maley and S. J. van Hal. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. **J Clin Microbiol** 49, 8: 2980-2984. 2011.
- Novaes, H., A. Sartori and P. Soárez. Hospitalizações por doença pneumocócica no Brasil, 2004 – 2006. **Rev Saúde Pública** 45, 3: 539-547. 2011.
- Nyambat, B., P. E. Kilgore, D. E. Yong, D. D. Anh, C. H. Chiu, X. Shen, L. Jodar, T. L. Ng, H. L. Bock and W. P. Hausdorff. Survey of childhood empyema in Asia: implications for detecting the unmeasured burden of culture-negative bacterial disease. **BMC Infect Dis** 8: 90. 2008.
- O'Brien, K. L., L. J. Wolfson, J. P. Watt, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O. S. Levine and T. Cherian. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet** 374, 9693: 893-902. 2009.
- Obando, I., C. Munoz-Almagro, L. A. Arroyo, D. Tarrago, D. Sanchez-Tatay, D. Moreno-Perez, S. S. Dhillon, C. Esteva, S. Hernandez-Bou, J. J. Garcia-Garcia, W. P. Hausdorff and A. B. Brueggemann. Pediatric parapneumonic empyema, Spain. **Emerg Infect Dis** 14, 9: 1390-1397. 2008.
- Obregon, V., P. Garcia, E. Garcia, A. Fenoll, R. Lopez and J. L. Garcia. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. **J Clin Microbiol** 40, 7: 2545-2554. 2002.
- Owusu, M., S. B. Nguah, Y. A. Boaitey, E. Badu-Boateng, A. R. Abubakr, R. A. Lartey and Y. Adu-Sarkodie. Aetiological agents of cerebrospinal meningitis: a retrospective study from a teaching hospital in Ghana. **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 11: 28. 2012.
- Pai, R., R. E. Gertz and B. Beall. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J Clin Microbiol** 44, 1: 124-131. 2006.

- Palma, I., R. Mosquera, C. Demier, C. A. Vay, A. Famiglietti and C. M. Luna. Impact of bacteremia in a cohort of patients with pneumococcal pneumonia. **J Bras Pneumol** 38, 4: 422-430. 2012.
- Pardridge, W. M. Blood-brain barrier biology and methodology. **J Neurovirol** 5, 6: 556-569. 1999.
- Paton, J. C., P. W. Andrew, G. J. Boulnois and T. J. Mitchell. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. **Annu Rev Microbiol** 47: 89-115. 1993.
- Perez, V. P., G. Agnes, C. A. G. Dias and P. A. d'Azevedo. Prevalence of allelic variant of *zmpB* *Streptococcus pneumoniae* and relationship with invasive disease. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. Santos, Brazil. **Associação Latinoamericana de Microbiologia** 2012.
- Picazo, J. J., J. R. Contreras, E. Rios, E. Culebras, I. Rodriguez-Avial, C. Mendez and C. Betriu. Rapid diagnosis of invasive pneumococcal disease in pediatric population. **J Microbiol Methods** 93, 2: 116-120. 2013.
- Pimenta, F. C., A. Roundtree, A. Soysal, M. Bakir, M. du Plessis, N. Wolter, A. von Gottberg, L. McGee, G. Carvalho Mda and B. Beall. Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. **J Clin Microbiol** 51, 2: 647-652. 2013.
- Pinto, T. C., A. R. Souza, S. E. de Pina, N. S. Costa, A. A. Borges Neto, F. P. Neves, V. L. Merquior, C. A. Dias, J. M. Peralta and L. M. Teixeira. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *ATPC* gene. **J Clin Microbiol** 51, 10: 3242-3249. 2013.
- Plouffe, J. F., R. F. Breiman and R. R. Facklam. Bacteremia with *Streptococcus pneumoniae*. Implications for therapy and prevention. Franklin County Pneumonia Study Group. **JAMA** 275, 3: 194-198. 1996.
- Richter, S. S., K. P. Heilmann, C. L. Dohrn, F. Riahi, S. E. Beekmann and G. V. Doern. Accuracy of phenotypic methods for identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates included in surveillance programs. **J Clin Microbiol** 46, 7: 2184-2188. 2008.
- Saglani, S., K. A. Harris, C. Wallis and J. C. Hartley. Empyema: the use of broad range 16S rDNA PCR for pathogen detection. **Arch Dis Child** 90, 1: 70-73. 2005.
- Samra, Z., H. Shmueli, E. Nahum, D. Paghis and J. Ben-Ari. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. **Diagn Microbiol Infect Dis** 45, 4: 237-240. 2003.
- Sandgren, A., K. Sjöström, B. Olsson-Liljequist, B. Christensson, A. Samuelsson, G. Kronvall and B. Henriques Normark. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect Dis** 189, 5: 785-796. 2004.
- Schultz, K. D., L. L. Fan, J. Pinsky, L. Ochoa, E. O. Smith, S. L. Kaplan and M. L. Brandt. The changing face of pleural empyemas in children: epidemiology and management. **Pediatrics** 113, 6: 1735-1740. 2004.
- Sheppard, C. L., T. G. Harrison, R. Morris, A. Hogan and R. C. George. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. **J Med Microbiol** 53, Pt 3: 189-195. 2004.

- Sinclair, A., X. Xie, M. Teltscher and N. Dendukuri. Systematic review and meta-analysis of a urine-based pneumococcal antigen test for diagnosis of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol** 51, 7: 2303-2310. 2013.
- Smith, M. D., C. L. Sheppard, A. Hogan, T. G. Harrison, D. A. Dance, P. Derrington and R. C. George. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary antigen detection. **J Clin Microbiol** 47, 4: 1046-1049. 2009.
- Strachan, R. E., A. Cornelius, G. L. Gilbert, T. Gulliver, A. Martin, T. McDonald, G. M. Nixon, R. Roseby, S. Ranganathan, H. Selvadurai, G. Smith, M. Soto-Martinez, S. Suresh, L. Teoh, K. Thapa, C. E. Wainwright and A. Jaffe. A bedside assay to detect *streptococcus pneumoniae* in children with empyema. **Pediatr Pulmonol** 46, 2: 179-183. 2011.
- Tarrago, D., A. Fenoll, D. Sanchez-Tatay, L. A. Arroyo, C. Munoz-Almagro, C. Esteva, W. P. Hausdorff, J. Casal and I. Obando. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. **Clin Microbiol Infect** 14, 9: 828-834. 2008.
- Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead and C. M. Fraser. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Science** 293, 5529: 498-506. 2001.
- Tong, S. Y. and P. M. Giffard. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. **J Clin Microbiol** 50, 11: 3418-3421. 2012.
- van der Poll, T. and S. M. Opal. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **Lancet** 374, 9700: 1543-1556. 2009.
- Wani, J. H., J. V. Gilbert, A. G. Plaut and J. N. Weiser. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun** 64, 10: 3967-3974. 1996.
- Webster, J., E. Theodoratou, H. Nair, A. C. Seong, L. Zgaga, T. Huda, H. L. Johnson, S. Madhi, C. Rubens, J. S. Zhang, S. El Arifeen, R. Krause, T. A. Jacobs, A. W. Brooks, H. Campbell and I. Rudan. An evaluation of emerging vaccines for childhood pneumococcal pneumonia. **BMC Public Health** 11 Suppl 3: S26. 2011.
- Weidenmaier, C. and A. Peschel. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. **Nat Rev Microbiol** 6, 4: 276-287. 2008.
- Weinberger, D. M., Z. B. Harboe, E. A. Sanders, M. Ndiritu, K. P. Klugman, S. Ruckinger, R. Dagan, R. Adegbola, F. Cutts, H. L. Johnson, K. L. O'Brien, J. A. Scott and M. Lipsitch. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. **Clin Infect Dis** 51, 6: 692-699. 2010.
- Weisfelt, M., D. van de Beek, L. Spanjaard, J. B. Reitsma and J. de Gans. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. **Lancet Neurol** 5, 2: 123-129. 2006.

- Wessels, E., J. J. Schelfaut, A. T. Bernards and E. C. Claas. Evaluation of several biochemical and molecular techniques for identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and their detection in respiratory samples. **J Clin Microbiol** 50, 4: 1171-1177. 2012.
- Winn, W., A. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger and G. Woods. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**.6a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2012.
- Xu, Q., R. Kaur, J. R. Casey, V. Sabharwal, S. Pelton and M. E. Pichichero. Nontypeable *Streptococcus pneumoniae* as an otopathogen. **Diagn Microbiol Infect Dis** 69, 2: 200-204. 2011.
- Yother, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. **Annu Rev Microbiol** 65: 563-581. 2011.
- Zbinden, A., N. Kohler and G. V. Bloemberg. recA-based PCR assay for accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other viridans streptococci. **J Clin Microbiol** 49, 2: 523-527. 2011.
- Zielen, S., I. Buhring, N. Strnad, J. Reichenbach and D. Hofmann. Immunogenicity and tolerance of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in nonresponders to the 23-valent pneumococcal vaccine. **Infect Immun** 68, 3: 1435-1440. 2000.

APÊNDICE A – PERSPECTIVAS FUTURAS: Padronização de ensaio qPCR com análise *High-Resolution Melting* para sorotipagem de *Streptococcus pneumoniae*

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO qPCR COM ANÁLISE *HIGH-RESOLUTION*
MELTING PARA SOROTIPAGEM DE *Streptococcus pneumoniae*

Vinícius Pieta Perez¹; Grasiela Agnes²; Nelson Kretzmann¹; Gustavo Riboldi¹; Cícero Dias¹; Pedro d'Azevedo¹

¹Laboratório de Cocos Gram-Positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. ²Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Imunoprofilaxia para infecções pneumocócicas são fundamentadas no desenvolvimento de vacinas para sorotipos capsulares do *Streptococcus pneumoniae*, e a sorotipagem de pneumococos é essencial no monitoramento e impacto destes programas de vacinação. Neste estudo é proposto o uso de ensaios qPCR com posterior análise por *High-Resolution Melting* (HRM), para identificação dos 13 sorotipos presentes nas vacinas conjugadas. Foram avaliados 13 isolados previamente conhecidos em 7 reações sequenciais (*duplex* e *simplex*). O limite de detecção das reações sequenciais é de 1,16pg de DNA (aproximadamente 500 cópias genômicas), não havendo amplificações inespecíficas no painel testado. A análise por HRM permitiu a diferenciação dos 13 sorotipos e pode contribuir na avaliação da distribuição dos sorotipos capsulares.

INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae, conhecido como pneumococo, é reconhecido como agente de condições infecciosas severas, especialmente em crianças, idosos e imunocoprometidos (de Quadros 2009). Desde a década passada a vacina 7-valente conjugada com uma proteína e 7 polissacarídeos (Zielen et al. 2000), e posteriormente as vacinas 10-valente e 13-valente (PCV-7, PCV-10 e PCV-13) foram introduzidas para imunização em crianças (Mehr e Wood 2012). No Brasil, no ano de 2010 a vacina 10-valente passou a integrar o calendário oficial de vacinação do Ministério da Saúde.

A imunoprevenção com vacinas conjugadas levou a uma redução expressiva nas doenças pneumocócicas invasivas em países onde a cobertura vacinal compreendeu amplamente as crianças nos primeiros anos de vida. Entretanto, diversos relatos nos Estados Unidos e Europa, regiões que primeiramente introduziram a vacinação em larga escala, indicam um substancial aumento nas taxas de isolamento de sorotipos não vacinais (Mehr e Wood 2012).

A sorotipagem do pneumococo classicamente é realizada por meio da reação de Quellung diretamente em um isolado bacteriano (Austrian 1976). Recentemente métodos de amplificação de ácidos nucleicos foram propostos para a definição dos tipos capsulares (Pai et al. 2006; Dias et al. 2007) e ensaios baseados em qPCR são promissores ao apresentarem limites de detecção inferiores, possibilitando seu uso diretamente em espécimes clínicos sem o isolamento bacteriano.

Nos últimos anos alguns ensaios de qPCR baseados em metodologia TaqMan MGB foram propostos para sorotipagem do *S. pneumoniae* demonstrando resultados satisfatórios ao serem aplicadas diretamente em espécimes clínicos (Tarrago et al. 2008; Pimenta et al. 2013).

A combinação de técnicas de qPCR com análise de curvas de dissociação por *High-Resolution Melting* (HRM) proporciona uma alternativa funcional e de baixo custo para comparação de sequências, especialmente quando há um número elevado de amostras (Reed e Wittwer 2004). A análise das curvas de dissociação dos produtos amplificados já demonstrou anteriormente potencial para detecção e determinação de espécies microbianas (Giglio et al. 2005; Lin et al. 2008). A metodologia é

baseada na presença de um corante fluorescente intercalante e aquisição de dados de fluorescência ao longo de pequenos incrementos de temperatura. Produtos amplificados contendo sequências distintas podem então ser discriminados em decorrência do formato da curva de dissociação obtida em alta resolução.

Neste estudo é proposto a padronização de ensaios sequenciais de qPCR para amplificação dos 13 sorotipos vacinais de *S. pneumoniae*, e identificação posterior por análise HRM da curva de dissociação dos produtos amplificados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Foram utilizados 13 isolados da coleção de *S. pneumoniae* do Laboratório de Cocos Gram Positivos da UFCSPA, compreendendo todos os sorotipos vacinais PCV-13: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F. Os isolados foram cultivados em ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro em atmosfera rica de CO₂ a 37°C, sendo identificados e caracterizados quanto à suscetibilidade a optoquina e bile solubilidade (Arbique et al. 2004). A sorotipagem foi determinada através de um PCR multiplex sequencial (Dias et al. 2007) e confirmada pela reação de Quellung com soros preparados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC).

Extração do DNA de isolados bacterianos

Para obtenção do DNA dos isolados bacterianos foi utilizado o sistema DNA mini kit QiaGen[®]. Resumidamente, um crescimento bacteriano de 24 horas em ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro foi suspenso em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2,0 mM EDTA) contendo 0,04 g/mL de Lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e 75 U/mL de mutanolisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e incubado por 1 hora em banho-maria a 37°C. As demais etapas foram realizadas de acordo com as informações do fabricante.

Após a extração, a quantidade e qualidade do DNA obtido foi avaliado por espectrofotometria no equipamento BioSpecNano (Shimadzu, Scientific Instruments, Japão).

Desenvolvimento do ensaio qPCR para determinação dos sorotipos capsulares

A sorotipagem molecular do pneumococo foi conduzida utilizando *primers* de oligonucleotídeos previamente descritos (Pai et al. 2006), ou desenhados com base nas sequencias dos diferentes tipos capsulares depositadas no banco de dados do GenBank, e avaliados pela ferramenta do GenBank BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para amplificação de fragmentos específicos, tabela B1.

Todas as reações foram conduzidas em um volume final de 20 μL , contendo MeltDoctor[®] Master Mix 1x (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 1,0 μL de extrato de DNA, e *primers* em concentração final de acordo com a tabela B1. As amplificações ocorreram na plataforma StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) utilizando os seguintes parâmetros: 50°C por 5 min, 95°C por 10 min, seguido de 50 ciclos a 95°C por 15 s. e 60°C por 2 min, ao final 60°C por 1 min. Todas as reações foram realizadas em duplicatas e controles negativos de amplificação foram utilizados. Para determinação do limite de detecção diluições (equivalentes a 230 pg/ μL , 11,6 pg/ μL , 1,16 pg/ μL e 0,11 pg/ μL) dos extratos de DNA foram avaliadas.

Tabela B1 – *Primers* de oligonucleotídeos utilizados

Reação	Primers	No. de acesso [#]	Sequencia (5'-3')	Produto (pb)	[] μ M
1	6A/B/C/D-f*	AF316640	AATTTGTATTTTATTCATGCCTATATCTGG	250	0,1
	6A/B/C/D-r*		TTAGCGGAGATAATTTAAAATGATGACTA		
	7F-f*	554/62	CCTACGGGAGGATATAAAATTATTTTGAG	826	0,1
	7F-r*		CAAATACACCACTATAGGCTGTTGAGACTAAC		
2	5-f	AY336008	GTTTCATTATTGGAAAATCATCACCATGAC	122	0,05
	5-r		GCTCGATAAACATAATCAATATTTGAAAAAGTATG		
	9V-f*	980/68	CTTCGTTAGTTAAAATTCTAAATTTTCTAAG	753	0,1
	9V-r*		GTCCCAATACCAGTCCTTGCAACACAAG		
3	sg18-f	4593/40	GTAACAAAATGGATGGATAATAATTGGATGA	242	0,1
	sg18-r		TTATCTGTAAACCATATCAGCATCTGAAAC		
	19F-f*	U09239	GTTAAGATTGCTGATCGATTAATTGATATCC	304	0,05
	19F-r*		GTAATATGTCTTTAGGGCGTTTATGGCGATAG		
4	19A-f*	AF094575	GTTAGTCCTGTTTTAGATTTATTTGGTGATGT	478	0,075
	19A-r*		GAGCAGTCAATAAGATGAGACGATAGTTAG		
	23F-f	AF057294	GTAACAGTTGCTGTAGAGGGAATTGGCTTTTC	138	0,075
	23F-r		CACAACACCTAACACACGATGGCTATATGATTC		
5	3-f*	Z47210	ATGGTGTGATTTCTCCTAGATTGGAAAAGTAG	371	0,05
	3-r*		CTTCTCCAATTGCTTACCAAGTGCAATAACG		
	4-f*	AF316639	CTGTTACTTGTTCTGGACTCTCGATAATTGG	430	0,05
	4-r*		GCCCACTCCTGTAAAATCCTACCCGCATTG		
6	1-f*	Z83335	CTCTATAGAATGGAGTATATAAACTATGGTTA	280	0,05
	1-r*		CCAAAGAAAATACTAACATTATCACAATATTGGC		
7	14-f*	34359	GAAATGTTACTTGCGCAGGTGTCAGAATT	189	0,05
	14-r*		GCCAATACTTCTTAGTCTCTCAGATGAAT		

**Primers* previamente publicados (Pai et al. 2006).

[#]*Primers* foram desenvolvidos utilizando as sequências depositadas no Genbank (número de acesso disponível) ou a partir www.sangers.ac.uk (número da cepa disponível).

Obtenção e análise por *High Resolution Melting* das curvas de dissociação

A obtenção das curvas de dissociação foi conduzida como ferramenta de análise do produto amplificado e realizada na mesma plataforma do ensaio qPCR. Os produtos foram submetidos a uma elevação gradual de temperatura de 60° C até 95° C com intervalos de leitura de 0,005° C/s. A análise das curvas obtidas foi realizada no software HRM V3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) utilizando o algoritmo fornecido. As duplicatas de todas as reações foram comparadas a fim de minimizar erros.

RESULTADOS

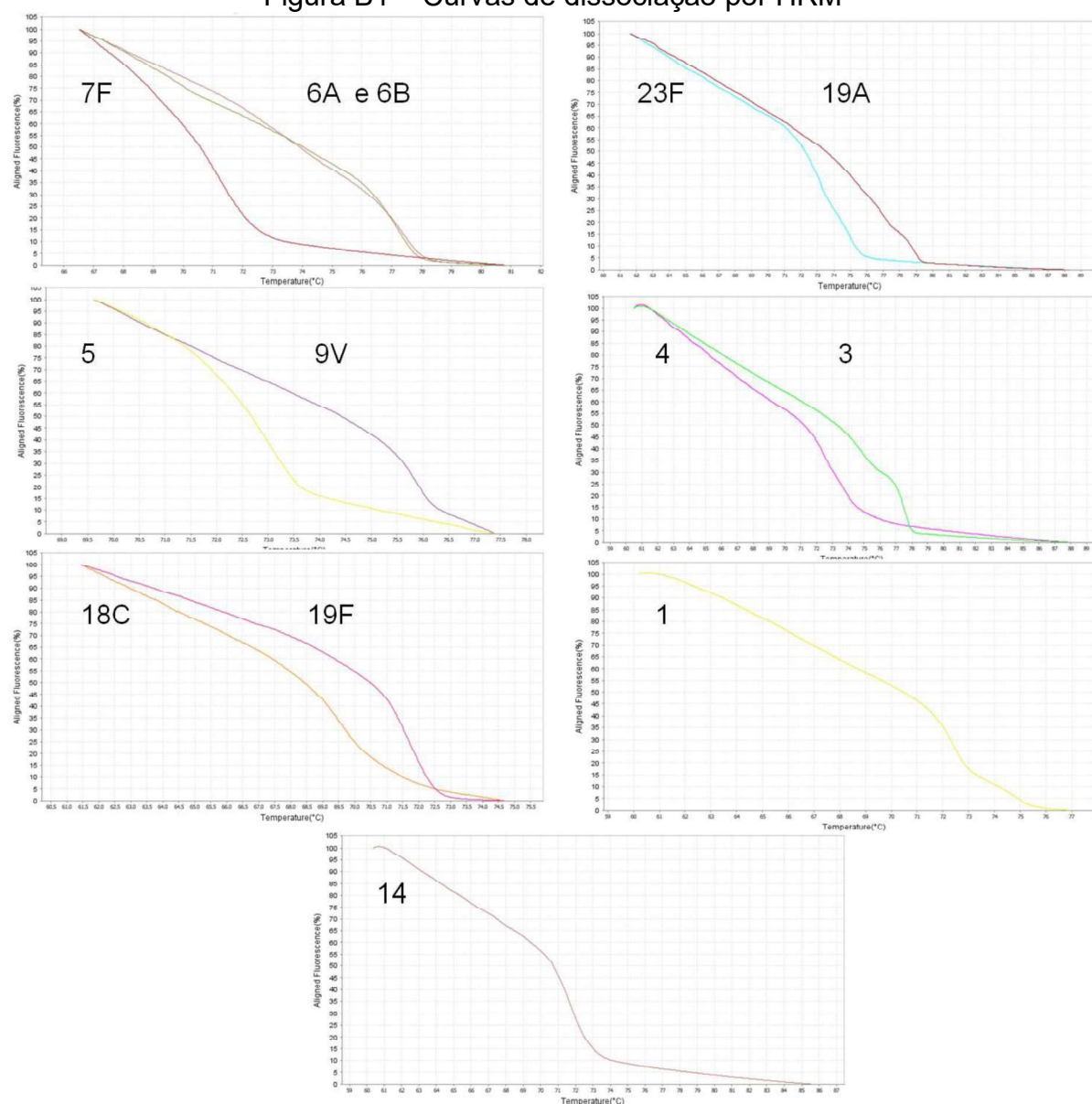
A sequência de ensaios aqui propostos foi capaz de detectar 1,16 pg de DNA (aproximadamente 500 cópias genômicas), na tabela B2 são apresentados os limites de detecção e Ct considerados para cada reação.

As temperaturas de melting obtidas dos fragmentos amplificados foram próximas (variando de 71,94° C até 78,86° C), sendo possível a sua diferenciação adequada apenas utilizando a análise HRM, na tabela B2 são demonstradas as temperaturas médias obtidas de cada sorotipo. A análise HRM de cada ensaio possibilitou a diferenciação dos sorotipos presentes, como é demonstrado na figura B1.

Tabela B2 – Resultados obtidos nos ensaios de qPCR

Reação	Isolado	Limite de detecção (pg)	Ct	T _m (°C)
1	6A	0,11	34,15	77,25
	6B	0,11	35,50	78,15
	7F	1,16	35,03	75,60
2	5	0,11	38,01	72,64
	9V	1,16	45,12	75,73
3	18C	1,16	36,01	71,94
	19F	1,16	39,88	74,9
4	19A	0,11	37,95	78,86
	23F	0,11	37,67	73,21
5	3	0,11	37,15	77,12
	4	1,16	39,96	72,36
6	1	1,16	38,09	72,51
7	14	1,16	34,14	72,16

Figura B1 – Curvas de dissociação por HRM



DISCUSSÃO

A identificação adequada dos sorotipos pneumocócicos é capital na era das vacinas conjugadas, uma vez que o desenvolvimento de estratégias de imunização são constituídas nos dados de prevalência de sorotipos (Hausdorff et al. 2000). De fato, monitorar a prevalência de sorotipos pós-introdução das vacinas é essencial uma vez que relatos de sorotipos não vacinais emergentes ocorrem mundialmente (Mehr e Wood 2012).

Os métodos tradicionais de sorotipagem são dependentes do isolamento bacteriano e acabam sendo limitados visto que estima-se um baixo rendimento das técnicas tradicionais de cultivo e isolamento em condições infecciosas como meningites, bacteremias e derrames parapneumônicos (Samra et al. 2003; Esposito et al. 2013; Picazo et al. 2013). O uso prévio de antimicrobianos pode estar resultando em uma valorização excessiva de sorotipos resistentes (Sheppard et al. 2004).

Os ensaios moleculares atualmente propostos para sorotipagem por qPCR do pneumococo são fundamentados em metodologia de sondas TaqMan MGB, apresentando bons resultados (Tarrago et al. 2008; Pimenta et al. 2013). No entanto, ao considerarmos outros estudos (Gardner et al. 2003) a elaboração de um painel de sondas compreendendo os principais sorotipos possui um custo elevado.

Neste estudo são propostos ensaios qPCR para identificação dos 13 sorotipos vacinais do pneumococo através de uma metodologia de baixo custo, comparado a TaqMan MGB, relativamente simples e ágil. Os resultados obtidos nesta análise inicial são animadores, uma vez que foi possível, ao menos a partir de isolados puros e previamente conhecidos, diferenciar os sorotipos por análise HRM dos produtos de amplificação da qPCR.

As limitações deste estudo estão no painel analisado, sendo necessária a avaliação frente a um painel amplo de isolados compreendendo os mais distintos sorotipos não vacinais e outras espécies de estreptococos relacionados. Numa etapa seguinte, impõe-se investigar a eficiência deste ensaio diretamente de amostras clínicas.

Cabe ressaltarmos que os ensaios aqui propostos foram levados ao seu extremo com o propósito de obtermos o menor limite de detecção possível, situação que pode induzir a perda de especificidade e dificuldades na análise das curvas de dissociação pela produção de fragmentos inespecíficos. Portanto, cabe ainda aperfeiçoar as condições de reação antes que os próximos passos sejam seguidos.

Os ensaios sequenciais propostos neste estudo podem ser importante ferramenta para aperfeiçoamento dos dados epidemiológicos de sorotipos do pneumococo, com custos de implantação inferior aos ensaios existentes nos centros detentores de

infraestrutura para biologia molecular e contribuindo na investigação das distribuições de sorotipos e estratégias vacinais.

REFERÊNCIAS

- Arbique, J. C., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Quesne, G. Carvalho Mda, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, D. Jackson, R. J. Davidson and R. R. Facklam. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. **J Clin Microbiol** 42, 10: 4686-4696. 2004.
- Austrian, R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. **Mt Sinai J Med** 43, 6: 699-709. 1976.
- de Quadros, C. A. From global to regional: the importance of pneumococcal disease in Latin America. **Vaccine** 27 Suppl 3: C29-32. 2009.
- Dias, C. A., L. M. Teixeira, G. Carvalho Mda and B. Beall. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. **J Med Microbiol** 56, Pt 9: 1185-1188. 2007.
- Esposito, S., A. Marchese, A. E. Tozzi, G. A. Rossi, L. Da Dalt, G. Bona, C. Pelucchi, G. C. Schito and N. Principi. DNA bacterial load in children with bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2013.
- Gardner, S. N., T. A. Kuczmarski, E. A. Vitalis and T. R. Slezak. Limitations of TaqMan PCR for detecting divergent viral pathogens illustrated by hepatitis A, B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus. **J Clin Microbiol** 41, 6: 2417-2427. 2003.
- Giglio, S., P. T. Monis and C. P. Saint. *Legionella* confirmation using real-time PCR and SYTO9 is an alternative to current methodology. **Appl Environ Microbiol** 71, 12: 8944-8948. 2005.
- Hausdorff, W. P., J. Bryant, P. R. Paradiso and G. R. Siber. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis** 30, 1: 100-121. 2000.
- Lin, J. H., C. P. Tseng, Y. J. Chen, C. Y. Lin, S. S. Chang, H. S. Wu and J. C. Cheng. Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis. **J Clin Microbiol** 46, 3: 1090-1097. 2008.
- Mehr, S. and N. Wood. *Streptococcus pneumoniae*--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. **Paediatr Respir Rev** 13, 4: 258-264. 2012.

- Pai, R., R. E. Gertz and B. Beall. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. **J Clin Microbiol** 44, 1: 124-131. 2006.
- Picazo, J. J., J. R. Contreras, E. Rios, E. Culebras, I. Rodriguez-Avial, C. Mendez and C. Betriu. Rapid diagnosis of invasive pneumococcal disease in pediatric population. **J Microbiol Methods** 93, 2: 116-120. 2013.
- Pimenta, F. C., A. Roundtree, A. Soysal, M. Bakir, M. du Plessis, N. Wolter, A. von Gottberg, L. McGee, G. Carvalho Mda and B. Beall. Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. **J Clin Microbiol** 51, 2: 647-652. 2013.
- Reed, G. H. and C. T. Wittwer. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. **Clin Chem** 50, 10: 1748-1754. 2004.
- Samra, Z., H. Shmueli, E. Nahum, D. Paghis and J. Ben-Ari. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. **Diagn Microbiol Infect Dis** 45, 4: 237-240. 2003.
- Sheppard, C. L., T. G. Harrison, R. Morris, A. Hogan and R. C. George. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. **J Med Microbiol** 53, Pt 3: 189-195. 2004.
- Tarrago, D., A. Fenoll, D. Sanchez-Tatay, L. A. Arroyo, C. Munoz-Almagro, C. Esteve, W. P. Hausdorff, J. Casal and I. Obando. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. **Clin Microbiol Infect** 14, 9: 828-834. 2008.
- Zielen, S., I. Buhring, N. Strnad, J. Reichenbach and D. Hofmann. Immunogenicity and tolerance of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in nonresponders to the 23-valent pneumococcal vaccine. **Infect Immun** 68, 3: 1435-1440. 2000.

APÊNDICE B – PERSPECTIVAS FUTURAS: Avaliação de alelo do gene *zmpB* de *Streptococcus pneumoniae* em líquidos pleurais

AVALIAÇÃO DE ALELO DO GENE *zmpB* DE *Streptococcus pneumoniae* EM LÍQUIDOS PLEURAIS

Vinícius Pieta Perez¹, Leila Maria Tomé Pedro², Grasiela Agnes³, Cícero Armídio Gomes Dias¹ e Pedro d'Azevedo¹.

¹Laboratório de Cocos Gram-Positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. ²Centro Universitário Metodista - IPA, Rio Grande do Sul, Brasil. ³Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é importante causa de infecções comunitárias severas como pneumonias e meningites. Diversos fatores bacterianos parecem contribuir na resposta inflamatória e progressão da doença pneumocócica, uma zinco metaloprotease (ZmpB) foi previamente descrita relacionada a este processo. Foram incluídas 25 amostra de líquido pleural de derrames parapneumônicos positivos para *S. pneumoniae* por pesquisa do gene *lytA*. Uma reação de PCR para amplificação de fragmento alélico do *zmpB* foi conduzida e os fragmentos amplificados foram sequenciados e comparados com a cepa TIGR4. Duas amostras amplificaram fragmentos e os mesmos foram sequenciados apresentando elevada identidade com TIGR4. Fatores bacterianos são pouco compreendidos na evolução da doença pneumocócica. Neste estudo observamos a identificação de elementos que podem estar relacionados ao potencial de invasão diretamente de amostras clínicas invasivas.

INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae, ou pneumococo, é causa significativa de morbidade e mortalidade, especialmente em crianças, idosos e imunocomprometidos (van der Poll e Opal 2009). A maioria das infecções é causada pela disseminação endógena a partir da nasofaringe, que atua como um reservatório e fonte de transmissão de pneumococos entre indivíduos. Ocasionalmente pode ocorrer a propagação do patógeno para o tecido circundante ou para a corrente sanguínea, podendo provocar desde uma infecção no trato respiratório superior até uma condição severa e invasiva (Kadioglu et al. 2008), condições como bacteremias e meningites são as manifestações mais severas associadas (O'Brien et al. 2009).

A evolução da doença pneumocócica e suas complicações são em parte determinadas pelo agente infeccioso e fatores do hospedeiro. Entre os fatores bacterianos é destacada a ação da cápsula polissacarídica na sobrevivência do pneumococo, sendo alvo das imunoprofilaxias por meio de vacinas com antígenos capsulares (Mehr e Wood 2012). Entretanto, estudos demonstram o envolvimento de outros elementos no estabelecimento da colonização, invasão e progressão das doenças pneumocócicas (Jedrzejewski 2001; Kadioglu et al. 2008).

Um dos fatores bacteriano associado à complicação é o potencial de indução de resposta inflamatória. Uma zinco metaloprotease B (ZmpB) foi descrita como mediadora da inflamação pulmonar, e seu possível envolvimento com a virulência do pneumococo foi proposto (Blue et al. 2003). Em modelos animais foi observado que a variação alélica desta proteína se relaciona com amplificação da inflamação e necrose pulmonar (Hsieh et al. 2008).

Este trabalho avalia a aplicação de uma metodologia molecular para a pesquisa da variável alélica do gene *zmpB* em líquidos pleurais de pneumonias pneumocócicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram avaliadas 25 amostras de líquido pleural de crianças com derrame parapneumônico por *S. pneumoniae* submetidos à toracocentese em unidades de

pneumologia pediátrica de dois hospitais de Porto Alegre (RS) durante o período de junho de 2010 a setembro de 2012. As amostras foram obtidas conforme os procedimentos médicos de cada serviço e alíquotas de 2 mL foram separadas e armazenadas a -70°C para análises. Apenas foram incluídas no estudo espécimes previamente identificados como positivos para a presença de *S. pneumoniae* pela pesquisa do gene *lytA* por qPCR. A pesquisa foi aprovada nos comitês de ética das instituições envolvidas (CEP/GHC 10-122 e CEP/ISCOMPA 193-010) e os pais e responsáveis pelos pacientes consentiram com a participação no estudo.

Extração de DNA

Para extração de material bacteriano, utilizamos o kit comercial DNA mini Kit Qiagen® com adição de um passo inicial. Resumidamente, foram transferidos 200 µL do líquido para um microtubo de 1,5 mL, com adição de 100 µL de solução TE (tampão Tris-EDTA pH 8,0), 40 mg/mL lisozima, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e 75 U/mL Mutanolisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), prosseguindo com incubação por 1 hora a 37°C (Carvalho, et al. 2007). As demais etapas foram realizadas de acordo com as informações do fabricante.

Após a extração, a quantidade e qualidade do DNA obtido foi avaliado por espectrofotometria no equipamento BioSpecNano (Shimadzu, Scientific Instruments, Japão).

Primers de oligonucleotídeos para o alelo de *zmpB*

Foram sintetizados *primers* de oligonucleotídeos para amplificação parcial da região do gene *zmpB* de TIGR4 (GenBank: AE005672.3), descrita com potencial de virulência (Hsieh et al. 2008). Os oligonucleotídeos iniciadores foram avaliados pela ferramenta do GenBank BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para amplificação de um fragmento com 224 pb (5'-AGCTGCTTCATTCAAACATA-3' e 5'-TCGTTGCTTTATCTTTAACTTC-3').

Amplificação do alelo de *zmpB*

Para cada amostra da extração foi utilizado um tubo de microcentrifuga com capacidade de 0,2 mL, o qual continha: 17,3 µL de água, 2,5 µL de tampão Buffer 1x, 1 µL de MgCl₂ a 20 µM, 1 µL de dNTPs a 10 µM, 1 µL de cada oligonucleotídeo

iniciador a 10 μ M, 0,2 μ L de enzima Taq polimerase platinum 1U e 1 μ L do extrato de DNA. Logo após o preparo da reação os tubos foram conduzidos para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No termociclador, os ciclos utilizados foram: 5 minutos a 95 °C; 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 48 °C e 1 minuto a 72°C, todas estas etapas por 40 vezes; e após, 5 minutos a 72 °C. O produto obtido foi visualizado em gel de agarose 1% contendo 5 μ L de brometo de etídio (10 mg/ml), numa corrida a 100V por 25 minutos, juntamente com um padrão de peso molecular (100pb). Foi utilizado transiluminador UV com fotodocumentação. Todas as reações foram realizadas com controles positivos e negativos de reação.

Sequenciamento

Uma vez confirmada a amplificação do gene *zmpB*, os produtos amplificados da PCR foram purificados com o *Purelink PCR Purification Kit* (Invitrogen, Brasil) e encaminhados para sequenciamento realizado em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). O sequenciamento foi realizado em sentido *sense*, com o resultado obtido em eletroferogramas, no formato *.ab1*. Estes arquivos foram traduzidos em formato FASTA (Staden Package e Heracle BioSoft – DNA Baser) e comparados, um a um, com TIGR4 no site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), no programa *nucleotide blast*. A sequência alvo de análise, conforme descrito em estudo prévio (Hsieh et al. 2008), possui 78 pb

(5'-TCATCACTTAGAACAGACTCACCATCTGTTTTAGATTGTTGTTTATATTTATTTGAAGCATAACCTAAGAACCCATTT-3') localizada na região terminal do *zmpB* de TIGR4.

RESULTADOS

Das 25 amostras de líquidos pleurais analisadas duas apresentaram amplificação de fragmentos com aproximadamente 224 pb. Após o sequenciamento dos produtos amplificados e alinhamento com *zmpB* de TIGR4, foi observada a presença de regiões com elevada identidade com a sequência alvo (Figura C1).

Figura C1 – Alinhamento dos produtos amplificados com *zmpb* de TIGR4.

```

TIGR4 TCTTAGGTTATGCTTCAAATAAATATAAACACAATCTAAACAGATGGTGAGTCTGTTCTAAGTGATGA
LP02  ....C.....TT.C.....C.....A.....
LP04  .....A...G.....-.....

```

O alinhamento e análise do produto sequenciado da amostra LP02 apresentou identidade de 93% com TIGR4, havendo alterações de bases em 6 posições, conforme figura C1. O produto de LP02 não apresentou deleções quando comparadas a TIGR4. Para a amostra LP04 a identidade observada com TIGR4 foi de 97%, havendo alterações de 2 bases, conforme Figura C1. O fragmento do LP 04 apresentou uma deleção na posição 57, com a perda de uma Guanina (G), o que não ocorreu no LP02. Ao comparar as sequências dos fragmentos de LP02 e LP04 entre si, a identidade foi de 92%, havendo diferenças nas posições 5, 11,15, 31, 32, 34, 44 e 57, observado na Figura C1.

DISCUSSÃO

É conhecido que a evolução da pneumonia pneumocócica se deve a inflamação induzida nos tecidos pulmonares (Tuomanen et al. 1995) e a inflamação em excesso contribui para o dano tecidual (Bergeron et al. 1998; Butler e Cetron 1999).

A enzima ZmpB foi identificada em pneumococos supostamente tendo um papel na indução da inflamação no trato respiratório de ratos inoculados, através da avaliação do menor potencial inflamatório induzido por cepas com o gene silenciado. O gene que codifica esta proteína na cepa TIGR4, conhecida por sua virulência, tem 5.65 kb e codifica 1.800 aminoácidos (Blue et al. 2003).

As zinco-metaloproteases estão localizadas na parede celular do pneumococo. Uma delas, conhecida como IgAprotease, cliva a IgA1 humana, enquanto a ZmpC cliva uma metaloprotease de matriz em humanos (MMP-9) (Camilli et al. 2006). Já o ZmpB não se conhece seu substrato mas uma possível interação com colágeno IV foi relatada (Frolet et al. 2010).

Em geral as zinco-metaloprotease possuem elevada conservação entre isolados, no entanto ZmpB aparenta ser uma exceção com identidade baixa entre genes

ortólogos (Frolet et al. 2010). Aparentemente os primeiros 300 a 400 aminoácidos, na região N-terminal da proteína, são conservados enquanto o restante da proteína apresenta grande variação (Berge et al. 2001).

Estudos prévios haviam demonstrado que os níveis de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa no tecido pulmonar são significativamente reduzidos em cepas silenciadas para o *zmpB* (Blue et al. 2003). Posteriormente, um segundo estudo observou que a variação alélica do gene *zmpB* afeta o potencial de indução inflamatória do pneumococo em modelo animal. Resumidamente, se avaliou um isolado obtido de doença pneumocócica não complicada (pneumonia lobar) e um de doença pneumocócica complicada (pneumonia necrotizante). Ao translocar o *zmpB* do isolado de pneumonia necrotizante para o isolado de pneumonia lobar, foi observada alteração na resposta inflamatória induzida, ao passo que o processo inverso não afetou a indução de resposta inflamatória (Hsieh et al. 2008). Aparentemente, o alelo de *zmpB* relacionado a amplificação de inflamação é encontrado em cepas invasivas conforme identidade observada com TIGR4 (99%).

Neste trabalho, foi estabelecida uma PCR para amplificação parcial do alelo de *zmpB* de TIGR4 diretamente de espécimes clínicos de doença pneumocócica invasiva. De 25 amostras de líquidos pleurais infecciosos, dois foram positivos para amplificação do fragmento alélico com elevada identidade. E diante do proposto seria, de fato, esperado que este alelo estivesse presente em isolados de condições complicadas como o derrame parapneumônico. As duas amostras apresentaram elevadas identidades com TIGR4, o que nos sugere contribuição deste elemento na severidade da doença.

Nossos dados são limitados, pois não podemos avaliar demais informações de complicação como desfecho, tempo de internação e necessidade de suporte intensivo. Porém foi possível demonstrar a presença deste alelo em condições invasivas e permite a proposição de estudos futuros acerca desta relação.

Aqui não podemos determinar a presença do gene ou alelos nos demais líquidos pleurais. O que pode ser justificado pela condução de uma PCR específica para um determinado fragmento, não contemplando toda a diversidade deste gene, e as limitações de um PCR convencional em condições onde as quantidades de DNA são baixas.

Lembramos que os fatores bacterianos não atuam isolados, e uma conjuntura destes associados a sequencias de eventos, provavelmente são a chave para estabelecimento e progressão das doenças pneumocócicas. Neste estudo foi possível identificar a presença de elementos que podem estar relacionados ao potencial de invasão diretamente em amostras clínicas de pacientes com doença pneumocócica invasiva e prospectar novos experimentos na investigação da relação destes elementos.

REFERENCIAS

- Berge, M., P. Garcia, F. Iannelli, M. F. Prere, C. Granadel, A. Polissi and J. P. Claverys. The puzzle of zmpB and extensive chain formation, autolysis defect and non-translocation of choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol** 39, 6: 1651-1660. 2001.
- Bergeron, Y., N. Ouellet, A. M. Deslauriers, M. Simard, M. Olivier and M. G. Bergeron. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. **Infect Immun** 66, 3: 912-922. 1998.
- Blue, C. E., G. K. Paterson, A. R. Kerr, M. Berge, J. P. Claverys and T. J. Mitchell. ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. **Infect Immun** 71, 9: 4925-4935. 2003.
- Butler, J. C. and M. S. Cetron. Pneumococcal drug resistance: the new "special enemy of old age". **Clin Infect Dis** 28, 4: 730-735. 1999.
- Camilli, R., E. Pettini, M. Del Grosso, G. Pozzi, A. Pantosti and M. R. Oggioni. Zinc metalloproteinase genes in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: association of the full array with a clonal cluster comprising serotypes 8 and 11A. **Microbiology** 152, Pt 2: 313-321. 2006.
- Carvalho M, G., M. L. Tondella, K. McCaustland, L. Weidlich, L. McGee, L. W. Mayer, A. Steigerwalt, M. Whaley, R. R. Facklam, B. Fields, G. Carlone, E. W. Ades, R. Dagan and J. S. Sampson. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. **J Clin Microbiol** 45, 8: 2460-2466. 2007.
- Frolet, C., M. Beniazza, L. Roux, B. Gallet, M. Noirclerc-Savoye, T. Vernet and A. M. Di Guilmi. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. **BMC Microbiol** 10: 190. 2010.
- Hsieh, Y. C., P. N. Tsao, C. L. Chen, T. L. Lin, W. S. Lee, P. L. Shao, C. Y. Lee, P. R. Hsueh, L. M. Huang and J. T. Wang. Establishment of a young mouse model

and identification of an allelic variation of *zmpB* in complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Crit Care Med** 36, 4: 1248-1255. 2008.

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

Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton and P. W. Andrew. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol** 6, 4: 288-301. 2008.

Mehr, S. and N. Wood. *Streptococcus pneumoniae*--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. **Paediatr Respir Rev** 13, 4: 258-264. 2012.

O'Brien, K. L., L. J. Wolfson, J. P. Watt, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O. S. Levine and T. Cherian. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet** 374, 9693: 893-902. 2009.

Tuomanen, E. I., R. Austrian and H. R. Maslow. Pathogenesis of pneumococcal infection. **N Engl J Med** 332, 19: 1280-1284. 1995.

van der Poll, T. and S. M. Opal. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **Lancet** 374, 9700: 1543-1556. 2009.

ANEXO A – Apresentações de trabalhos em Congressos

cultura como a partir de amostra clínica, gerando um fragmento de 684 pares de bases. Conclusão: Testes moleculares, como o descrito acima, oferecem uma promissora alternativa aos métodos de rotina, reduzindo o tempo para identificação, aumentando a sensibilidade e a rapidez no diagnóstico de doenças fúngicas.

IDENTIFICAÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE PACIENTES COM INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO (ITU): COMPARAÇÃO DE MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS

Adriano Martison Ferreira, Carla Ivo Brito, Alessandro Lia Mondelli e Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha – UNESP/Botucatu

Introdução: *Staphylococcus saprophyticus* é o segundo mais frequente agente de ITU adquirida na comunidade. **Objetivo:** O objetivo foi comparar 3 métodos fenotípicos para identificação de *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes com ITU, utilizando como referência o método genotípico ITS-PCR. **Métodos:** Os 101 estafilococos foram identificados pelas provas de catalase, DNAse, coagulase, disco de Novobiocina, Vitek I, método simplificado de provas bioquímicas, e pelo ITS-PCR. **Resultados:** Foram identificadas através do disco de novobiocina 57 *S. saprophyticus* e 27 *S. epidermidis*; o método simplificado de provas bioquímicas identificou 57 isolados como *S. saprophyticus*, 15 *S. epidermidis*, 7 *S. haemolyticus*, 4 *S. warneri* e um *S. lugdunensis*, enquanto o Vitek I identificou 48 *S. saprophyticus*, 12 *S. epidermidis*, 9 *S. haemolyticus* e 4 *S. warneri*. Pelo ITS-PCR foram identificados 57 *S. saprophyticus*, 16 *S. epidermidis*, 8 *S. haemolyticus*, 2 *S. warneri* e um *S. lugdunensis*. Os 17 *S. aureus* encontrados foram identificados por todos os métodos, entretanto 6 espécies de *S. aureus*, 4 de *S. simulans* e um *S. xylophilus* foram identificadas somente pelo Vitek I. O método simplificado de provas bioquímicas obteve taxa de concordância de 98,0% em relação ao ITS-PCR, enquanto que o Vitek I teve 81,2% e o disco de novobiocina 89,1%. **Conclusão:** Não foi encontrada nenhuma outra espécie não *S. saprophyticus* resistente à novobiocina, desta maneira o disco de novobiocina mostrou ser ainda uma alternativa viável para identificação de *S. saprophyticus* em amostras urinárias em laboratórios com recursos limitados. O ITS-PCR e o método simplificado de provas bioquímicas mostraram maior confiabilidade que os sistemas comerciais disponíveis atualmente. **SupORTE Financeiro:** FAPESP

IDENTIFICAÇÃO DE VARIÁVEL ALÉLICA DO GENE ZMPB EM ISOLADOS CLÍNICOS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Vinicius Pieta Perez, Graciela Agnes, Pedro d'Azevedo e Cícero Armínio Gomes Dias – UFCSPA

Complicações respiratórias de infecções com *Streptococcus pneumoniae* são uma das principais causas de morte em crianças menores de 5 anos. Na última década, houve avanços significativos na prevenção desses por meio da vacinação com antígenos capsulares conjugados. Porém, há um avanço dos casos de complicações, como pneumonias necrotizantes, abscessos pulmonares e empiema. Um dos fatores bacterianos associados às complicações é o potencial de indução de resposta inflamatória. Na busca pela identificação de fatores alguns alvos proteicos estão

sendo considerados. Uma zínco metaloprotease, ZmpB, foi descrita como um potencial fator de virulência para o *S. pneumoniae*. Em modelos animais foi observado que a presença de uma variação alélica do gene *zmpB* contendo a sequência TCTTA-GGTTATGCTTCAAATAAATATAAACAAATCTAAAA-CAGATGGTGAGTCTGTTCTAAGTGATGA, está relacionada à amplificação da inflamação e necrose pulmonar. Em nosso estudo foi desenvolvido um teste de PCR para identificação e sequenciamento do fragmento gênico em 13 isolados clínicos de pneumococos provenientes de derrames pleurais. Três entre os isolados, pertencentes aos sorotipos 14, 6A/B e 6A/B ampli-ficaram bandas com aproximadamente 200 pb, que posteriormente foram sequenciadas apresentando o fragmento de 70pb e similaridade de 98 e 100% com a amostra TIGR4, de patogenicidade reconhecida. A presença desta variação alélica pode estar relacionada com um potencial de virulência nas cepas de isolados clínicos de *S. pneumoniae*, porém, não deve ser um fator único e essencial às complicações. Dados mais amplos quanto ao desfecho e outras variantes alélicas podem fornecer uma luz na compreensão da patogenicidade desse agente.

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE MICROORGANISMOS ISOLADOS NA UTI PEDIÁTRICA DO HOSPITAL SANTA CRUZ

Betina Brimmer, Jane Dagmar Pollo Renner e Marcelo Carneiro – UNISC

Introdução: Anualmente o índice de infecção hospitalar em pediatria vem crescendo, devido à suscetibilidade dos recém-nascidos em adquirir doenças e o aparecimento de microrganismos resistentes. **Objetivos:** Isolar e identificar os microrganismos que estão presentes no ambiente da UTI Pediátrica do Hospital Santa Cruz. **Métodos:** Realizou-se um estudo analítico transversal e observacional em Março de 2011 com swabs embebidos em solução fisiológica, de 20 amostras de superfícies (incubadora, estetoscópio, respirador, entre outros) na UTI pediátrica. Os isolados foram incubados em caldo BHI por 24 horas a 36°C. Após, incubou-se em meio sólido de Agar Azida, Columbia CNA e McConkey por 24 horas a 36°C para isolamento das bactérias. Para identificação foram utilizados testes bioquímicos baseados no manual da ANVISA módulo 05. Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado utilizando o método de disco difusão Kirby bauer conforme as instruções do CLSI 2010. **Resultados:** Foram isolados 27 microrganismos, sendo estes identificados como *Staphylococcus epidermidis* (66,7%), *Streptococcus* spp. (18,5%), *Klebsiella oxytoca* (3,7%), *Escherichia coli* (3,7%), *Enterococcus* spp. (3,7%) e *Acinetobacter* spp. (3,7%). Quanto ao perfil de sensibilidade, o *S. epidermidis* se mostrou sensível a Ampicilina (16,7%), Cefazotina (16,7%), Vancomicina (100%) e Clindamicina (66,7%); os *Streptococcus* spp. foram sensíveis somente a Ampicilina (20%) e Cefazotina (20%); a *K. oxytoca* e a *E. coli* apresentaram sensibilidade ao Imipenem, Cefazotina, Ciprofloxacin, Clorfenicol e Cefalotina, sendo que a última também é sensível a Ampicilina; já o *Enterococcus* spp. mostrou-se sensível somente a Vancomicina e o *Acinetobacter* spp. não foi sensível a nenhum antibiótico testado. **Conclusão:** Foi observado nesse estudo que o *S. epidermidis* teve maior prevalência nos ambientes e, também, a maioria resistente a Cefazotina (83,3%), mostrando que o mesmo está resistente a todas as Cefalosporinas e provavelmente é portador do gene *mecA*.

ISPPD-8

Poster Shift 1: Monday, March 12, 2012 – Tuesday, March 13, 2012

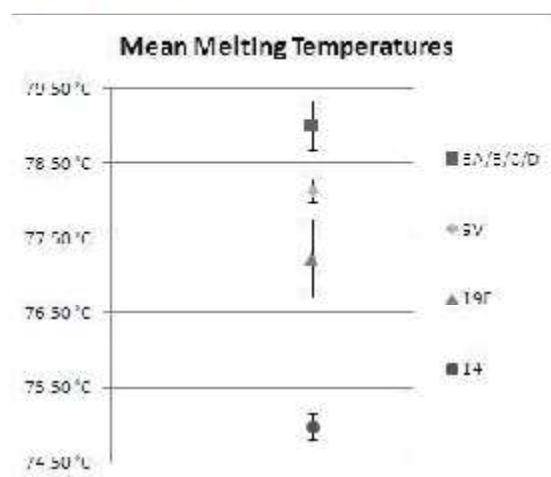
Poster No 63

STANDARDIZATION OF MULTIPLEX RT-PCR MELTING TEMPERATURE ANALYSIS OF PRODUCTS FOR PNEUMOCOCCAL SEROTYPING

V.P. Peraz, N.A. Kretzmann, C.G. Dias, P.A. d'Azevedo, Porto Alegre, Brazil

Pneumococcal diseases are among the most frequent causes of vaccine preventable death. Serotyping is necessary to evaluate vaccine coverage and pneumococcal epidemiology, as a need for establishment of health policies. We developed a multiplex RT-PCR analysis of PCR products by Sybr Green, using the sets of primers described by PAI et al 2006. Four of the most relevant serotypes were included in the reaction, 19F, 14, 9V and 6 A/B/C/D (one isolate for each serotype was tested eight times). Melting temperature of amplicons was evaluated in Applied 7500 Real-Time PCR System, and samples were previously serotyped by conventional PCR. We set a reaction including the following mean melting temperatures: 19F (77.23 $\pm$ 0.52 $^{\circ}$ C), 14 (74.98 $\pm$ 0.18 $^{\circ}$ C), 9V (78.13 $\pm$ 0.16 $^{\circ}$ C) and 6A/B/C/D (79.01 $\pm$ 0.33 $^{\circ}$ C). Agarose gel electrophoresis confirmed the amplification of target fragments. The reaction was reproducible and able to distinguish each serotype with a mean melting temperature difference of 1.0 $^{\circ}$ C. ANOVA analysis showed statically difference between all groups ($p < 0.05$). The assay was able to rapidly and cost-effectively identify the serotypes tested. This is the first step in the establishment of a comprehensive approach to serotype pneumococci by RT-PCR. Such procedure provides conditions to monitor emerging serotypes and to evaluate the pneumococcal epidemiology after the implementation of vaccine programs.

Financial support: CNPq, FAPERGS.



[Mean melting temperatures]



PREVALENCE OF ALLELIC VARIANT OF ZMBP STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AND RELATIONSHIP WITH INVASIVE DISEASE

Vinícius Pieta Perez, Grasiela Agnes, Cícero Dias, Pedro d'Azevedo.

Background

Streptococcus pneumoniae is a leading cause of bacterial pneumonia, meningitis, and sepsis in children. Recent estimates of child deaths caused by *S. pneumoniae* range from 700.000 to 1 million every year worldwide. Effective interventions are available, including pneumococcal conjugate vaccine, however invasive pneumococcal disease (IPD) has been increasing in several countries. Inflammation is a prominent feature of *S. pneumoniae* infections. Indeed, an intense host immune response to infection is thought to contribute significantly to the pathology of pneumococcal pneumonia and meningitis. ZmpB is a zinc metalloprotease identify as a novel virulence factor capable of inducing inflammation. Further studies associated a allelic variation of zmpB, content the sequence TCTTAGGTTATGCTTCAAATAAATATAAACAACAATCTAAAACAGA TGGTGAGTCTGTTCTAAGTGATGA, affects the virulence of *S. pneumoniae*.

Material and methods

In this study were included 93 isolates of *S. pneumoniae* between january 2009 and december 2010 in the pre-vaccine era in Porto Alegre, Brazil. DNA was extracted from culture and a PCR with specific primers to an allelic variation of zmpB was conducted. All isolates that amplified a 198pb fragment had been sequenced by ABI310 system (Applied Biosystems). Isolates were serotyped by a multiplex PCR.

Results and Discussion

Isolates were recovered from blood (64%), liquor (20%), pleural effusion (2%), sputum (2%), and unknown sites (12%). Of 93 isolates 21 (22,6%) show the fragment of variation zmpB, and 17 (81%) of them were isolated of IPD. Only serotype 14, 9V, 7F, 23F and 15A, show the zmpB allelic fragment. Sequencing of fragments were compared with invasive strain TIGR4, similarity were >95%, except for isolate 15A (similarity of 87%). Serotype 14, 7F and 9V are considered invasive and in our study they carrier 85,7%, 66,6%, 33,3%, allelic variation of zmpB. Others serotype only show low frequency of zmpB allelic. IPD is associated with pneumococcal and host factors, and the capsular type appear related with this condition. The invasive serotypes show a molecular background more associated, and allelic variation of zmpB could be one of large virulence factors associated with that isolates and consequently with IPD.

Financial support: CNPQ, FAPERGS.

ANEXO B – Regras de submissão do periódico *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*



Introduction

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease also covers such areas as laboratory and clinical management of microbial diseases, epidemiology and pathogenesis of infections, automation in the diagnostic microbiology laboratory, and antibiotic susceptibility testing. Animal studies will only be considered if they specifically address infectious diseases, laboratory assays or antimicrobial agents relevant to human infectious diseases.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease keeps you informed of the latest developments in clinical microbiology and the diagnosis and treatment of infectious diseases. Packed with rigorously peer-reviewed articles and studies in **bacteriology**, **immunology**, **immunoserology**, infectious diseases, **mycology**, **parasitology**, and **virology**. The journal examines new procedures, unusual cases, controversial issues, and important new literature.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease's distinguished independent editorial board, consisting of experts from many medical specialties, ensures you extensive and authoritative coverage.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease features:

- Informed commentaries on new antibiotics
- Rapid and cost-effective methods in the laboratory
- Instructive case studies with emphasis on complex circumstances
- Insightful editorials on important current issues
- Book reviews that keep you up-to-date on recently published literature.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease also covers such areas as laboratory and clinical management of microbial diseases, epidemiology and pathogenesis of infections, automation in the diagnostic microbiology laboratory, and antibiotic susceptibility testing. Animal studies will only be considered if they specifically address infectious diseases, laboratory assays or antimicrobial agents relevant to human infectious diseases.

Types of paper

Papers may be submitted that are full-length articles (including subject review articles), or short notes. All manuscripts must comply with the required format and word count described in the "Guide for Authors". Any deviation from these instructions may result in immediate rejection.



Preparation

Introductory information

Papers for the full-length category should not exceed 3,500 words and 5 tables and/or figures, except for review articles, which are at the discretion of the editor. Papers for the Notes category, which is intended for the presentation of brief observations (including instructive case reports), that do not warrant full-length papers, should not contain any section heading

and should not exceed 1,000 words and 2 figures and/or tables. Letters to the editor should not exceed 500 words, and in general are limited to correspondence and observations associated with published articles and should not be used as a substitute for publishing independent work in the full-length or note formats.

The first page of the manuscript should include: title, running title of not more than 45 characters and spaces, word counts of the abstract and body of the text, full names of all authors, address of the institution at which the work was performed, and the corresponding author's full address, telephone number, and FAX number. Any change of address by any of the authors should also be noted.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. It should be 150 words or less for full-length papers and 50 words or less for notes. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at

their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated in wheat (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS,

Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also ➡ http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: ➡ <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more.

Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ➡ <http://www.sciencedirect.com>.

In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

ANEXO C – Regras de submissão do periódico *Journal of Medical Microbiology*

1. Scope and Editorial Policy

Queries or comments about online submission should be sent via the email links from the submission site. General enquiries should be sent to the Editorial Office:

Journal of Medical Microbiology Editorial Office, SGM, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK. Tel: +44 118 988 1856. Fax: +44 118 988 1834. email: jmm@sgm.ac.uk

1.1 Scope

1.1.1 General

The Editorial Board of the *Journal of Medical Microbiology* (JMM) wishes to publish excellent original scientific research papers or related original reviews, editorials or case reports, all of which should adhere to the following criteria. Subject matter should be within the ambit of medical microbiology, covering all types of micro-organism. Generally papers should be written from the perspective of microbiology rather than infectious disease. Basic research on the biology of pathogens, set in the context of infection or immunity, is acceptable. Host-centred topics, for example in host cell biology or immunology, will only be considered if there is a strong connection to a specific infection(s). Research findings should be novel, original and have a significant impact and are expected to go beyond purely descriptive or factual reporting of observations. For example, acceptable content might uncover underlying mechanisms or explanations of phenomena observed, or provide novel interpretation of observations. Descriptions of novel organisms associated with disease would be more suitable for *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. If in doubt, the Editor-in-Chief will be pleased to advise authors about eligibility prior to submission, without prejudice to the acceptance or rejection of any papers subsequently submitted.

1.1.2 Types of paper

JMM publishes papers under the following subject categories:

- ☐ Editorials
- ☐ Review articles
- ☐ Pathogenicity and virulence
- ☐ Host response
- ☐ Diagnostics, typing and identification
- ☐ Antimicrobial agents and chemotherapy
- ☐ Epidemiology
- ☐ Clinical microbiology and virology
- ☐ Veterinary microbiology
- ☐ Oral microbiology
- ☐ Models of infection
- ☐ Human and animal microbial ecology
- ☐ Case reports
- ☐ Correspondence

In reading the following guidelines, bear in mind that one full printed page comprises approximately 900 words of normal text, or an average of 500 words when tables and figures are taken into account.

Editorials. Editorials should be brief summaries (limit of 4 printed pages including references) of developments in fast-moving and topical areas of wide interest. They may address any subject within the scope of the JMM but the subject should not be excessively narrow or specialized; they are usually solicited but may be proffered by authors responding to a recognized need.

Reviews. Reviews should be brief summaries (limit of 6 printed pages excluding references) of developments in fast-moving areas. They must be based on published research articles; they may be solicited or proffered by authors responding to a recognized need.

Case Reports. Case Reports are brief papers describing exceptionally interesting and novel diagnoses, investigations and/or treatment of infectious diseases in humans or animals. They should not merely describe observations made or focus solely on novelty of occurrence, but rather should include new insights, explanations of mechanisms, interpretations or other aspects conveying intellectual or academic originality. Case Reports must have a Summary section, are limited to 4 printed pages including references, and may include a maximum of 2 figures and 2 tables. They need not include a review of the literature unless there is a particular reason, for example to resolve controversy.

Correspondence. The Correspondence section is where readers of JMM can communicate their personal observations and opinions, useful methodologies, new theories or alternative interpretations of others' work. Only articles of a high level of interest to a wide range of readers of JMM will be considered. Reports of outbreaks should be dealt with as Case Reports. Correspondence items should be no more than 2 printed pages including references, with a maximum of 1 table or figure. JMM Information for Authors

1.2 Submission and publication requirements

1.2.1 Page and colour charges

There are no page charges for publishing in JMM. Colour figures are published free of charge if the use of colour is judged to be necessary for scientific reasons, and no charges are levied on online-only supplementary material.

1.2.2 Originality, authorship and copyright

Papers submitted must report work that has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. Papers submitted to JMM that have been published preliminarily online (e.g. in Nature Precedings, Faculty of 1000 posters or PLoS Currents) will only be considered if there is a significant amount of additional novel data and analysis to warrant publication. JMM considers preliminary online publication as prior publication, and reviewers and Editors must be able to clearly identify how the paper differs from the preliminary report and that substantially more work is incorporated into the manuscript. All the authors must have agreed to the submission, and to the order of their names on the title page. They must also have agreed that the corresponding author may act on their behalf throughout the editorial review and publication process. The corresponding author is responsible for obtaining such agreement. Requests for changes in authorship after submission must be accompanied by signed agreements from all the parties involved. If the paper is accepted for publication in JMM, all the authors (or other copyright holder) will assign to the SGM the copyright (including electronic reproduction rights) of the paper. Neither a whole paper nor a substantial part of a paper may subsequently be published elsewhere in the same form, in any language or any medium, without the consent of the Society for General Microbiology. [Click here to download a Copyright Transfer Agreement form/Licence to Publish.](#)

1.2.3 Ethics

Papers describing any experimental work with humans should include a statement that the Ethical Committee of the institution in which the work was done has approved it, and that the subjects gave informed consent to the work. Experiments with animals should be done in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority. Procedures should be such that experimental animals do not suffer unnecessarily. Papers should include details of the procedures and of anaesthetics used. The Editors will not accept papers where the ethical aspects are, in their opinion, open to doubt. Authors may wish to consult the ARRIVE guidelines for reporting *in vivo* experiments [Kilkenny *et al.* (2010). *PLoS Biol* 8(6), e1000412 doi:10.1371/journal.pbio.1000412].

1.2.4 Research integrity

SGM is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) and its editors operate within the COPE Code of Conduct for Journal Editors. Complaints of unethical behaviour will be investigated by SGM in line with COPE's flowcharts for such investigation. Common reasons for such investigation include:

- **Redundant (duplicate) publication.** Publication of an already published article, or a substantial portion of a published article, including unauthorized publication in translation.
- **Plagiarism.** Plagiarism is the unauthorized and/or uncredited reuse of content or ideas generated by another person. Plagiarism can occur without a breach of copyright, as it covers more than simple copying-and-pasting.
- **Breach of copyright.** The unauthorized reuse of copyright material, that is the copying of significant amounts of text or tables or figures. This can include unauthorized reuse by an author of their own material that is now copyright of another publisher. SGM makes use of the CrossCheck service to detect text duplication.
- **Fabricated data.** This can include figures that have been digitally manipulated, for example to mask gel bands or alter contrast to make certain features more or less visible or to give the impression that data from separate experiments were in fact obtained in the same experiment.
- **Problems with authorship.** Authorship problems include complaints that individuals have been inappropriately excluded from authorship or included without their knowledge, as well as accusations of guest, ghost or gift authorship.
- **Undisclosed conflict of interest.**
- **Appropriation of ideas or data by a reviewer.**

SGM promotes the COPE International Standards for responsible research publication for authors and Editors. JMM Information for Authors further guidance on research integrity can be obtained from the US Office of Research Integrity.

Conflict of interest. A conflict of interest may exist when your interpretation of the results or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Examples of potential financial conflicts of interest include receipt of funding or salary from an organization that might gain or lose financially from publication of your paper, if you hold stocks or shares in such an organization or if you hold or are applying for a patent relating to the content of this manuscript. Examples of non-financial conflicts of interest might include political, religious or intellectual conflicts.

Reagent sharing. Authors of papers published in JMM are expected to make biological materials, such as strains, plasmids and antibodies, that are described for the first time in the paper available to bona fide researchers in reasonable quantities and at reasonable cost, for non-commercial purposes. Supply of such materials must conform to current local and national laws and regulations.

Materials and results obtained from outside the authors' laboratory. If a paper includes results that were not obtained by the authors' own experiments (e.g. production of antibodies, properties of strains) this must be explicitly stated, and appropriate acknowledgement be included where appropriate.

1.2.5 Policy on security and censorship

The policy of SGM Council on scientific publication, security and censorship can be found [here](#).

1.2.6 Author self-archiving

Details of the SGM policy on author self-archiving can be found [here](#).

Authors may mount a PDF file of their accepted manuscript on their own or their institution's website or on a centrally organized repository, provided that the PDF is not publicly available until 12 months after online publication in the journal. The PDF file must correspond exactly to the accepted version of the manuscript. Authors may not mount a PDF of the final published version, although they should include a link to the published version. Author manuscripts must not be mounted less than 12 months after publication in the online version

of JMM, nor must they be mounted on a server for the purpose of commercial sale or systematic external distribution by a third party (e.g. via an e-print server).

1.2.7 Open access and PubMed Central deposition

SGM is a signatory of the National Institutes of Health (NIH) Portfolio Agreement; as a result, papers that acknowledge funding from NIH will be deposited by SGM in PubMed Central and will be freely available from PubMed Central 12 months after publication. Because SGM has signed the Portfolio Agreement, authors are no longer able to deposit their own manuscripts in PubMed Central. Details of the SGM policy on deposit in other repositories can be found [here](#).

Authors who pay for immediate open access through our Open Option scheme will have their papers deposited in PubMed Central (and mirror sites such as UKPMC) by SGM at the time of publication with no delay to public access, in addition to their paper being freely available to all without a subscription immediately on online publication.

2. Preparing and Submitting a Paper

2.1 General information

All papers must be submitted online, via the Bench>Press system. Submissions are not accepted in hard copy or by email. Authors should read these guidelines before going to the Bench>Press site to submit a paper. Further details and help pages are available on the Bench>Press site.

2.2 Pre-submission checklist

Authors must:

1. read the Information for Authors and ensure that their paper complies with this before submission;
2. all agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process;
3. provide the names and contact details of at least three (and not more than five) potential reviewers;
4. obtain permission for any citations of personal communications or unpublished results; this should be confirmed in a covering message;
5. indicate the Contents Category for the paper on the title page (it should also be JMM Information for Authors entered in the Contents Category field of the online submission form in Bench>Press);
6. use continuous line numbering throughout the manuscript, to facilitate online reviewing;
7. ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style;
8. upload any supplementary material associated with the paper as a supplementary file(s) for peer review with the paper;
9. upload any cited papers that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s);
10. include an accession number from one of the public databases (GenBank, EMBL, DDBJ or PIR) if the paper reports new sequence data; the relevant deposition criteria for the database must be adhered to.

2.3 Preparing files for submission

Papers can be submitted initially either as a single PDF file or as separate word-processor and image files, which will be compiled into a PDF by the system. The submission system will also attempt to prepare an HTML version of the reference list with links to papers that it can identify on the PubMed and HighWire databases, for use by the reviewers. This conversion will not work reliably if the reference format is incorrect (see the the section on References for the correct style); however, an HTML reference list is not essential for review of the paper to proceed. Supplementary material should be submitted as a separate file(s), rather than being incorporated within the single PDF or word-processor file. When submitting

the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

Submission as a single PDF. Please refer to the Help pages on the submission site for guidelines on preparing PDFs for submission, including advice on reducing the size of image files (the submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB).

Submission as separate word-processor and image files. Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. (Excel files are, however, acceptable for supplementary data). Word-processor files including inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate image files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the manuscript PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible: refer to the Help with Online Submission pages for guidelines on how to do this.

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the Bench>Press system as part of an initial submission, as set out in the Files for Publication section of these instructions. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

2.4 General style and layout

2.4.1 Layout

The paper must be written in clear and concise English, normally in the past tense. All papers should normally include: Title page; Summary (Abstract) (not required for Editorials and Correspondence); Acknowledgements; References; Tables; and Figures, with legends. The body of Full papers should be divided into Introduction; Methods; Results; and Discussion. It is often appropriate to combine the Results and Discussion. Figures and tables should only be used to illustrate points that cannot easily be described in the text. Authors should consult a recent issue of the journal for the layout of headings, tables, etc. Guidance on the presentation of individual sections is given below.

2.4.2 Title page

This should carry the following information.

- ☐ The title of the paper. The title should provide a concise statement of the contents of the paper.
- ☐ A short 'running title', of not more than 55 characters (including spaces), for use as a headline.
- ☐ The Contents Category for the paper.
- ☐ The names of the authors. Author names should be given in upper- and lower-case, not in all capitals, to avoid ambiguities such as 'van' and 'Van'. The author for correspondence must be clearly indicated. It is permissible to include the names of more than one author as

corresponding author, but a single author must act as the point of communication during the peer review process.

- ☐ The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.
- ☐ An email address and telephone and fax numbers for the corresponding author.
- ☐ A footnote 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/*gyrA*, etc.] sequence of XXXXX is XX00000', where a new sequence(s) has been determined.
- ☐ If appropriate, a footnote defining any non-standard abbreviations. Guidance on abbreviations not requiring definition is given in the Abbreviations section.

2.4.3 Summary (Abstract)

This section is likely to be read by more people than the full paper, and many abstracting services use authors' summaries without modification. It is therefore important that this section is clear and comprehensible in its own right. References should not be cited, and any non-standard abbreviations used must be defined.

2.4.4 Introduction

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

2.4.5 Methods

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason.

2.4.6 Results

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organized, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

2.4.7 Discussion

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

2.4.8 Acknowledgements

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. If required, please state the names of funding bodies and grant numbers in this section. Authors may also wish to acknowledge individuals who have contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors.

2.4.9 References

References in the text should be cited as follows: two authors, Smith & Jones (1996) or (Smith & Jones, 1996); three or more authors, Smith *et al.* (1996) or (Smith *et al.*, 1996). References to papers by the same author(s) in the same year should be JMM Information for Authors distinguished in the text and the reference list by the letters a, b, etc. (e.g. 1996a or 1996a, b).

For references with ten or fewer authors, give the names of all authors in the form "Surname, Initials". For references with more than ten authors, list the first nine followed by "& other authors".

Sample journal references:

Cerdà-Cuellar, M., Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J., Jofre, J. & Blanch, A. (1997). *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 58–61.

Pasta, F. & Sicard, M. A. (1996). Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synapsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* **142**, 695–705.

Sample journal reference for more than ten authors:

Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H.-P., Gill, S. & other authors (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539–547.

Sample reference to a whole book:

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sample reference to a book chapter or section:

Romano, A. H. & Saier, M. H., Jr (1992). Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In *The Evolution of Metabolic Function*, pp. 171–204. Edited by R. P. Mortlock. Boca Raton, FL: CRC Press.

References to websites

It is not practical to provide a generic example of a reference to a website. Essential items that must be provided are:

- ☐ an author(s) (which may be a company name or organization);
- ☐ a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated);
- ☐ the URL (web address) of the page;
- ☐ a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes)

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.

Authors who use **EndNote** or **Reference Manager** can download the style for JMM by clicking on the links below: EndNote output style Reference Manager output style

Please note the following style points:

- ☐ References in the list must be given in alphabetical order, except for papers with three or more authors, which should be listed in chronological order after any other papers by the first author.
- ☐ References must include the title of the paper as well as both initial and final page numbers.
- ☐ Titles of journals should be abbreviated according to the system used by MEDLINE; no stops should be used after abbreviated words.

- References to books should include year of publication, title (in full), edition, editor(s) (if any), town of publication and publisher, in that order. When the reference is to a particular part of a book, the inclusive page numbers of the chapter or section and, if appropriate, chapter title must be given.
- Only papers accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list, and the reference must include the name of the journal. Relevant papers cited as 'in press' should be included as supplementary files with the online submission. References to papers not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such papers should not appear in the list of references.
- Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results.

2.4.10 Tables

These should be broadly comprehensible without reference to the text, but it is not necessary to repeat detailed descriptions of methods, etc. The symbols * † ‡ § || ¶ # should be used for footnotes, rather than superscript letters or numbers. When results are expressed as percentages, the absolute value(s) corresponding to 100% must be stated. Statements of reproducibility should be included (see above). Tables should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text.

2.4.11 Figures

This section outlines journal policy on figures. See these links for advice on preparing figures for JMM Information for Authors inclusion as a PDF for Preparing files for submission and on the source files needed for publication.

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching. Where possible, please also supply line drawings, bar diagrams and sequence data in the original file format in which they were generated and/or as EPS (Encapsulated PostScript), PowerPoint or CorelDraw files. Do **not** supply as PostScript files as these cannot be used.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) **not** Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) **not** (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., **not** (A), (B), etc.

Line drawings. These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

Bar diagrams. Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 'three-dimensional' bars unless there is a specific justification for their use.

Sequence data. Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be published where there is justification. The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5–2 mm (or 6–8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80–100 nucleotides per line is appropriate (or 60–70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50–60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

JMM does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence

figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary data.

Photographs (halftones). Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

2.4.12 Colour figures

These are published at no cost to the author, if the Editors believe that colour is essential to show the results. Colour figures should preferably be supplied as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). The files should preferably be generated as CMYK (4-colour) images, not RGB, as these reproduce better in print.

2.4.13 Supplementary material

Material associated with a paper but not suitable for print publication (e.g. large datasets, sequence alignments, 3D structures, movie files) can be included as online-only supplementary data. Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. All supplementary data files will be reviewed along with the main paper; these will not be published unless they significantly enhance the paper. The Editors may sometimes suggest that figures or tables that the author has included within a paper should be converted into supplementary data.

Supplementary data files must not include methods for results that are included in the main paper, nor should they introduce different results or new discussion points. Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and be cited accordingly in the main paper. A heading and, if appropriate, a short legend or text description must be supplied for each supplementary data item.

File types and formatting for supplementary data. The contents of the supplementary file should be indicated in the 'File label' field when the file is uploaded. Most file types can be supported but authors should try to avoid files that require unusual software, because these will be of limited JMM Information for Authors use to readers. Very large files should also be avoided where possible because they may be difficult to download. Editorial staff may apply stylistic editing to supplementary files, and will, where possible, convert the files to PDF format for online publication.

3. Style, Nomenclature and Units

3.1 Nomenclature of micro-organisms

The correct name of the organism, conforming with international rules of nomenclature, must be used; if desired, synonyms may be added in parentheses when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code and the opinions issued by the International Committee on Systematics of Prokaryotes. See the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Information for Authors for more details. Names of algae and fungi must conform with the current International Code of Botanical Nomenclature. Names of protozoa must conform with the current International Code of Zoological Nomenclature.

The following may be useful:

- ☐ List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
- ☐ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

3.1.1 Vernacular names

Generic names are singular Latin nouns and do not take a plural verb. Authors should avoid the use of a generic name alone when the reference is to the members of the genus. Thus, 'The strains (species or cultures) of *Salmonella* are...' not 'The *Salmonella* are...'. The latter implies more than one generic name *Salmonella*.

Many micro-organisms are known by their vernacular (common) names as well as by their scientific names. The vernacular name for an organism may vary from language to language or from place to place, even within the same country. There are no rules governing the use of vernacular names.

It is often convenient to use vernacular names coined from the generic names. In these forms, the initial capital letters are dropped and italics are not used. For plural forms of vernacular names, Latin or other plural endings are used, depending primarily on euphony. Thus, the vernacular singular for a member of the genus *Spirillum* is spirillum, and the plural generally used in the English language is spirilla (Latin plural), not spirillums (English plural). Occasionally, more than one common name arises from a generic name, such as treponema (plural treponemata or treponemas) and treponeme (plural treponemes) from *Treponema*.

3.2 Chemical and biochemical nomenclature

Authors should follow the recommendations of IUPAC for chemical nomenclature, and those of the Nomenclature Committee of IUBMB and the IUPAC–IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature for biochemical nomenclature (see <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcbtn>).

3.3 Enzyme nomenclature

The system published in Enzyme Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>) should be followed. Enzyme Commission numbers should be given where appropriate.

For restriction enzymes, use e.g. *EcoRI* **not** EcoRI, etc.; *HindIII* **not** *HindIII*, *HindIII*, *Hind III*, etc.

3.4 Genetic nomenclature

For bacterial gene names, use e.g. *gyrA* **not** *gyrA*; *arg-1* **not** *arg1* or *arg1*, etc.

The following proposals should be adhered to wherever possible.

Bacteria: Demerec, M. *et al.* (1966) *Genetics* **54**, 61–76 [also *J Gen Microbiol* (1968), **50**, 1–14]. Plasmids: Novick, R. P. *et al.* (1976) *Bacteriol Rev* **40**, 168–189. *Saccharomyces cerevisiae*: Sherman, F. (1981) In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. I. Life Cycle and Inheritance, pp. 639–640 (edited by J. N. Strathern *et al.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory). *Aspergillus nidulans*: Clutterbuck, A. J. (1973) *Genet Res* **21**, 291–296. *Neurospora crassa*: *Neurospora News* (1978), **25**, 29.

3.5 Abbreviations

Abbreviations must be listed on title page, and defined at first mention in both Summary and main text. JMM Information for Authors The following need **not** be defined:

aa; ACES; ADA; ADP, cAMP, ATP, etc.; AIDS; BES; Bicine; bp; BSA; CAPS; c.f.u.; CHAPS; CHES; CIE; CM-cellulose; CoA; c.p.m.; Da; DEAE-cellulose; DIG; DMSO; DNA, cDNA, CCC DNA, dsDNA, ssDNA, DNase; DNP; d.p.m., d.p.s.; DTT; ED50; EDTA, EGTA; ELISA; EMS; e.o.p.; EPR or ESR; FITC; FPLC; GC or GLC; GSH, GSSG; HEPES; HEPPS; HPLC; i.d.; IEF; IgG, IgM, etc.; IPTG; IR; kb, kbp; LD50; LPS; LSU; mAb; MES; MIC; m.o.i.; MOPS; MS; NAD, NADP; NMR; nt; NTG; ONPG; ORF; PAGE; PBS; PCR; PEG; PFGE; p.f.u.; Pi, PPi; PIPES; PMSF; ppGpp, pppGpp; p.p.m.; p.s.i.; PVDF; Py-GC, Py-MS; RBS; RFLP; RNA, mRNA, rRNA, tRNA, RNase; r.p.m.; RT-PCR; SDS, SDS-PAGE; SSU; TCA; TES; TLC; Tricine; Tris; UPGMA; UV; X-Gal.

3.6 Units

3.6.1 General points

SI units should be used. If non-SI units are used, the equivalent in SI units should also be given, e.g. 1 p.s.i. (6.9 kPa).

For **compound units** (e.g. micrograms per millilitre), use $\mu\text{g ml}^{-1}$ not $\mu\text{g/ml}$; use 10 $\mu\text{g amplicillin ml}^{-1}$ not 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ amplicillin.

Give **concentrations** as g l^{-1} , etc., or molarity, M, **not** normality, N. The term '%' should be defined as 'w/v', 'v/v' or 'w/w' if this is necessary to avoid ambiguity.

For **radioactivity**, the preferred unit is becquerels (Bq); if given in curies (Ci), the equivalent in Bq **must** be given ($1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$); radioactivity may also be expressed as d.p.s. ($1 \text{ d.p.s.} = 1 \text{ Bq}$) or as c.p.m.

3.6.2 Molecular mass

Mr (relative molecular mass) should be used rather than "molecular weight". "Molecular mass" should be used if values are quoted in daltons (Da) (e.g. molecular mass 20 kDa). Either *Mr* or molecular mass may be used, but they should not be mixed in any one paper. In table headings and figure axes, for values >1000 use kDa or $10^{-3} \times Mr$.

3.6.3 Absorbance, optical density and attenuation

The term absorbance, *A*, should be used for the quantity $\log(I_0/I)$ in UV and visible absorption spectrophotometry of samples in which there is negligible scattering or reflection of light. If scattering is considerable, as in spectrophotometric measurements of microbial biomass, the term optical density, OD (or attenuation, *D*), should be used; the path length of the cell or cuvette, and the make and model of the spectrophotometer, should be specified, because optical design dramatically influences such measurements. If a sample is diluted prior to measuring optical density, the dilution and the diluent should be stated. Readings obtained with instruments designed for turbid samples, such as nephelometers or Klett meters, should be reported in appropriate units. Whenever *A*, OD or *D* is used, the wavelength (in nm) of the incident light must be specified (e.g. A280, OD600).

3.7 Presentation of nucleotide and amino acid sequences

In the absence of a detailed discussion of specific structural features, the nucleotide sequence or proposed secondary structure should not be presented. Such papers should be accompanied by substantial additional experimentation to characterize the gene(s) and products(s) concerned, and by substantial computer analysis. JMM will not normally publish DNA sequences from double-stranded genomes unless the two strands have been sequenced independently.

JMM will not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Sequence alignments of nucleic acids and proteins may be presented using the supplementary data facility.

When making comparisons between nucleotide or amino acid sequences, it is important to use the correct terminology. 'Homology' has a precise biological meaning of 'having a common evolutionary origin'. When a percentage comparison is made, the terms 'identity' or 'similarity', as appropriate, must be used.

Submitted manuscripts containing new sequence data should include, on the title page, the footnote 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/*gyrA*, etc.] sequence of XXXXX is XX00000'.

4. Peer Review and Publication

4.1 Editorial handling of papers

Submitted papers are checked by the editorial staff to ensure that they comply with the requirements. If any problems are noticed, the paper will be returned to the author for amendment before being assigned to an Editor. After the above step, papers are assigned by the editorial staff to an Editor with appropriate expertise, who is responsible for making the

decision on acceptability; while every effort will be made to select an Editor suggested during the submission process, the editorial office staff reserve the right to assign the paper to another Editor if the one suggested is unavailable or another Editor is considered significantly more appropriate. Before sending a paper to reviewers, the Editor will pre-screen the paper to check that it fulfils certain basic criteria that would make it potentially suitable for JMM: nature of the study, quantity and quality of data, general conclusions and standard of presentation. If the paper does not fulfil these criteria, it may be rejected at this stage, so that the authors can submit the paper to a more appropriate journal without further delay. Papers that pass the pre-screening stage will normally be sent to at least one independent reviewer, but the Editor may also act as a reviewer him/herself. The use of reviewers suggested by authors is at the discretion of the Editor.

4.2 Submitting a revised manuscript

If revision of a paper is requested, the revised version should be returned within the time specified. If more time is required, the author should contact the Editorial Office (jmm@sgm.ac.uk) or Editor to discuss a new deadline. If revision is delayed by the author without prior agreement, the revised version will be treated as a new submission. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

4.3 Source files for publication

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the submission system as part of an initial submission. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

4.3.1 Text

The text (including tables, but without embedded figures) must be supplied as a word-processor file. Word files are preferred; .docx files produced in Word 2007 or 2010 can be used as source files. TeX and LaTeX formats can not be used.

4.3.2 Tables

Tables must **not** be supplied as image files (TIFF, PDF, PowerPoint); files containing tables prepared as images (whether provided separately or pasted into a Word file) will be returned to the author and this may delay publication. Tables should be prepared using your word-processor's table functions, with individual entries in individual table cells. They must **not** be supplied as tab- or space-separated text or as multiple entries separated by line breaks in single table cells. Tables prepared in Excel can be accepted but are not desirable.

4.3.3 Equations

Equations that cannot be represented using the keyboard can be prepared using the Word equation editor (in versions up to Word 2003) or MathType. Word 2007/2010 users should **not** use the default equation editor to prepare equations as it is not compatible with any other current software; equations in Word 2007/2010 should be prepared using the MathType equation editor or the 'legacy' equation editor included as part of Word (i.e. a Microsoft Equation 3.0 object, accessible from 'Insert Object' on the 'Insert' ribbon).

4.3.4 Line figures

Line figures should be produced as vector rather than bitmap (raster) images. Acceptable formats are PDF, EPS, CorelDRAW (.cdr; version 15 or earlier), Adobe Illustrator (.ai), Excel (.xls), Word and PowerPoint. Fonts must be embedded for figures supplied as PDF or EPS. TIFF and other bitmap formats are not recommended for line figures; if their use cannot be avoided, the resolution should be at least 600 d.p.i.

Charts prepared in Microsoft Excel should be supplied in Excel format where possible. If they are copied and pasted into another Microsoft application, use Paste Special and select 'Picture (Enhanced Metafile)'.

4.3.5 Halftone figures (photographs)

The preferred format for halftones (i.e. photographic images) is TIFF, but PDF, EPS and JPG/JPEG are also acceptable. If image files are pasted into Word, PowerPoint, Photoshop, etc., in order to add lettering or other annotation or **to combine line and halftone images**, the original unlabelled halftone images should also be supplied. A final print resolution of 300 d.p.i. or more is recommended; i.e. an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. Colour images should use CMYK colour (which can be reproduced in print) rather than RGB (which cannot be reproduced faithfully using four-colour printing) (this setting can be accessed in Adobe Photoshop via Image:Mode:CMYK Color, for example). For some colour images, such as fluorescence micrographs, it may be useful to submit an RGB version of the image to be mounted online as supplementary material.

4.3.6 Scanning images

If images must be scanned, a resolution of 300 d.p.i. is usually sufficient for same-size reproduction of halftone (photographic) images without text, whereas 600 or 1200 d.p.i. should be used for figures containing lines and/or text. The scanned image should be cropped to remove as much white space as possible and supplied in TIFF format.

4.3.7 Supplementary material

Files supplied as supplementary material should follow the appropriate guidelines given above. If supplementary files contain material that cannot be represented in print (sound, video, computer programs, etc.), please consult the Editorial Office for advice on suitable formats.

4.4 Publication ahead of print

JMM has a Papers in Press feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless the authors inform the Editorial Office staff (jmm@sgm.ac.uk) to the contrary, it will be assumed that they agree to their manuscript being used in this way. Please note that the PDF used for peer review, and the manuscript title, subject category and author details that authors have entered into the online submission site, will be used to generate the Papers in Press record.

4.5 Proof corrections

Proofs are sent by email as a PDF attachment to the email address supplied for the corresponding author. It is the authors' responsibility to inform the Editorial Office of any changes to this email address.

Only typographical and absolutely essential factual changes may be made. Authors may be charged for the correction of non-typographical errors.

4.6 Reprints

As a result of declining reprint orders and feedback from many authors who tell us they have no use for reprints, SGM no longer provides free reprints to corresponding authors; instead, corresponding authors will receive an email including a link to download the published PDF of their paper. The link can be forwarded and used to download the published PDF up to 25 times.

Reprints of published papers can be purchased from the SGM Reprint Service.

4.7 Cover illustrations

The Editors welcome the submission of pictures for possible use on the front cover, and will pay £75 towards expenses for each one used. Pictures need not be linked with a paper in the journal.

ANEXO D – Parecer de aprovação do CEP ISCMPA



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tcche.br



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer nº 193/010

Protocolo nº 3297/10

Título: “Desenvolvimento de uma metodologia PCR real-time para rápida identificação e sorotipagem de *Streptococcus pneumoniae* em derrame pleural”.

Pesquisador Responsável: Gilberto Bueno Fischer

Instituição onde se realizará – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Data de Entrada: 13/04/2010

II – Objetivos – Objetivo Geral: Desenvolver uma metodologia de PCR real-time para detecção e classificação de sorotipo capsular de *Streptococcus pneumoniae* em amostras de derrame pleural.

Objetivos Específicos:

- Desenvolver um protocolo de PCR para identificação e concomitante sorotipagem molecular do *S. pneumoniae*;
- Identificar os genes mais conservados para o *S. pneumoniae*;
- Selecionar os genes capsulares mais específicos para cada sorotipo de *S. pneumoniae* relacionados ao derrame pleural;
- Desenhar e desenvolver *primers* para alvos gênicos selecionados e sondas TaqMan MGB;
- Determinar a sensibilidade e especificidade da metodologia PCR real-time para identificação e sorotipagem molecular do *S. pneumoniae*;
- Confrontar os achados das técnicas convencionais de isolamento e identificação com o PCR real-time;
- Observar a prevalência de derrames pleurais relacionados ao *S. pneumoniae*, na população estudada;
- Determinar os sorotipos do *S. pneumoniae* mais prevalentes na população estudada.

III - Sumário do Projeto

Descrição e caracterização da amostra: Estudo transversal prospectivo a ser realizado com amostras de pacientes provenientes do Hospital da Criança Santo Antônio do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia e avaliadas nos laboratórios da UFCSPA. Serão considerados para o estudo crianças com idade entre 2 meses e 14 anos hospitalizadas por pneumonia adquirida na comunidade, e que sejam submetidas ao procedimento de toracocentese ou drenagem pleural. A amostragem está estimada em 361 participantes aptos a atender os critérios de inclusão.

Crítérios de inclusão: Pneumonia será definida pela presença de quadro clínico associado a achados radiológicos compatível com este diagnóstico. Quadro clínico compatível com pneumonia aguda será baseado nos seguintes critérios: pacientes com sinais e/ou sintomas sugestivos de infecção respiratória (febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$, taquipneia, tosse e/ou achados de crepitações, broncofonia ou diminuição de sons ventilatórios). Raio-X de tórax compatível com o diagnóstico de pneumonia será definido de acordo com o *Standardized interpretation of paediatric chest radiographs for the diagnosis of pneumonia in epidemiological studies*. Desses pacientes, aqueles com derrame pleural segundo os critérios descritos por Light, e submetidos a toracocentese ou drenagem pleural terão uma amostra do líquido pleural coletada para a pesquisa.

Crítérios de exclusão: Entre as crianças elegíveis, serão excluídas:

1. Crianças com pneumonia associada à bronquiectasias, trauma, derrame pós-cirurgia torácica ou abdominal;
2. Crianças portadoras de doença pulmonar supurativa crônica, secundária à fibrose cística do pâncreas, à Bronquiolite Obliterante e a imunodeficiência como Hipogamaglobulinemia e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida;

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA
Reconhecido:

Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tcche.br
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
IRB -- Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



3. Presença de doenças predisponente ou com diagnóstico diferencial com Pneumonia tais como: cardiopatia, malformações pulmonares ou torácicas, encefalopatia e Tuberculose;
4. Paciente hospitalizado nos últimos 10 dias antes da admissão por pneumonia;
5. Pacientes com coagulopatias severas que contra indiquem a toracocentese ou cirurgia torácica nas últimas 4 semanas;
6. Pacientes onde a alíquotas enviadas para a pesquisa possua volume de amostra insuficiente para análise.

Adequação das condições - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito.

IV -Comentários:

- Justificativa do uso de placebo – Não se aplica.
- Análise de riscos e benefícios – Adequado, não apresenta riscos aos pacientes.
- Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo – Adequado.
- Informação adequada quanto ao financiamento – Adequado.
- Outros centros no caso de estudos multicêntricos – Não se aplica.

V -Parecer do Relator - “Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer”.

VI - Data da Reunião: 04/05/2010.

“Projeto e Termo de Consentimento, Aprovados”.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA, Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 11 de Maio de 2010.

Prof. Dr. Cláudio Teloken
 Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA
 Reconhecido:

Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.

Parecer nº 193/10

ANEXO E – Parecer de aprovação do CEP UFCSPA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEP – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Protocolo para apresentação de Projeto de Pesquisa aprovado pelo
CEP ISCMPA**

Data de recebimento CEP UFCSPA	Número
25/05/2010	020/10

Nome do projeto: Desenvolvimento de uma metodologia PCR Real-Time para rápida identificação e sorotipagem de streptococcus pneumoniae em derrame pleural.

Autores: Pedro D'Azevedo, Vinícius Pieta Perez e Cícero Dias.

Protocolo: 3297/10

Parecer: 193/010

Data de Aprovação no CEP ISCMPA: 11/03/2010

Secretaria CEP UFCSPA

Edi C. Pulcinella
Secretária do CEP/UFCSPA

ANEXO F – Parecer de aprovação do CEP GHC



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Trein, 596
CEP 91350-200 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.2000
CNPJ: 92.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Rubbo, 20
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.4100
CNPJ: 92.787.126/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Mostardero, 17
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3314.5200
CNPJ: 92.693.134/0001-53



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em reunião ordinária realizada em 16 de fevereiro de 2011, avaliou o seguinte projeto de pesquisa:

Projeto: 10-122

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

PEDRO ALVES D'AZEVEDO
CÍCERO ARMÍDIO GOMES DIAS
ROBERTO MATUSIAK
VINÍCIUS PIETA PEREZ

Título: Desenvolvimento de uma metodologia PCR real-time para rápida identificação e sorotipagem de *Streptococcus pneumoniae* em derrame pelural

Documentação: Aprovados
Aspectos Metodológicos: Aprovados
Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC. Lembramos do compromisso de encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.


Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP/GHC

Porto Alegre, 16 de fevereiro de 2011.

ANEXO G – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa de cunho médico do curso de Pós Graduação de Ciências da Saúde da Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), intitulada: “**Desenvolvimento de uma metodologia PCR real-time para rápida identificação e sorotipagem de *Streptococcus pneumoniae* em derrame pleural**” que tem por objetivo identificar o tipo de germe que causa a pneumonia. Serão avaliadas crianças com idade entre 2 meses e 14 anos de vida que apresentam sintomas de pneumonia. Sendo aproveitado para a pesquisa amostras de líquido pleural (derrame pleural) coletados para exames médicos. Outros exames que são realizados de rotina serão aproveitados para a pesquisa. A bactéria identificada será avaliada por um estudo genético.

A Pneumonia é uma infecção que acomete o pulmão e que algumas vezes pode apresentar complicações, como o derrame pleural (excesso de líquido na membrana pulmonar), e o empiema (pus na mesma região). O motivo de se fazer esta pesquisa é desenvolver um método mais adequado de diagnóstico da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, principal bactéria relacionada a essas infecções.

Para participação nessa pesquisa serão utilizadas informações presentes no prontuário médico de atendimento, e alíquotas de derrame pleural coletados para exames. Os dados obtidos serão utilizados apenas para estudo.

Eu, _____, na condição de
pai/mãe ou representante legal de (nome da criança)
_____, fui informado:

da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa; da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação dos cuidados e tratamentos; da segurança de que não será identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade; de que se existirem gastos adicionais, estes serão de responsabilidade dos responsáveis pela pesquisa.

O Sr.(a) pode recusar-se a participar da pesquisa e não haverá nenhuma alteração no atendimento.

Em caso de dúvida contatar Vinícius P. Perez no setor de Microbiologia da UFCSPA, telefone: 3303-8740.

Dr. Pedro A. d'Azevedo
Pesquisador responsável
Tel: 3303-8740

Dr. Gilberto Bueno Fischer
Coordenador da pesquisa
Tel: (51) 3214-8646

Sujeito da pesquisa

Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre Esclarecido, ficando outra via com o pesquisador.

Nome da criança:

Assinatura do responsável pela criança:

Nome e assinatura do pesquisador:

Este Formulário foi lido para _____ em
____/____/____ enquanto eu estava presente.

Nome e assinatura da Testemunha:

Porto Alegre, ____ de _____ 20 ____