

Microbiologia e Imunologia da Otite Média Aguda em Crianças

Noboru Yamanaka

Microbiologia da otite média aguda

1. Virologia

Os estudos epidemiológicos têm demonstrado forte relação entre infecções virais de vias aéreas superiores (IVAS) e otite média aguda (OMA). Em crianças com OMA, no Japão, foram detectados vírus respiratórios em 35% dos pacientes (n = 1092). O vírus sincicial respiratório (VSR), vírus influenza e adenovírus foram os vírus mais comuns¹. Chonmaitree *et al.* relataram que 63% dos 864 episódios de IVAS em crianças com menos de 4 anos de idade nos EUA foram positivas para vírus respiratórios, adenovírus, coronavírus e VSR, frequentemente relacionados a OMA².

As técnicas moleculares recentes tornaram possível a detecção de novos vírus respiratórios relacionados com OMA. Os metapneumovírus humanos (MPVH) foram descobertos há uma década, e são agora reconhecidos como um importante patógeno causando infecção do trato respiratório inferior e IVAS em crianças. Um estudo de coorte de crianças com sintomas respiratórios mostrou que MPVH foi detectado em 3,5% das crianças e 41% das infecções foram complicadas por OMA³. Os bocavírus Humanos (BoVH) foram descobertos em 2005. Em crianças com OMA, Beder *et al.* relataram BoVH com taxa de detecção de 6,3% a partir de secreções nasofaríngeas e 2,7% de fluidos da orelha média. O tempo de resolução de OMA foi maior e a intensidade de febre foi maior em crianças com BoVH⁴. O vírus também foi detectado a partir de 3% dos fluidos da orelha média de crianças com otite média com efusão (OME)⁵. O papel deste vírus na OMA e OME requer uma investigação mais aprofundada.

2. Interações entre vírus e bactérias

Os sintomas de IVAS viral geralmente duram uma semana e a eliminação viral da nasofaringe pode durar 3 semanas ou mais. Tais infecções virais normalmente induzem maiores ou menores danos da mucosa respiratória, promovem o crescimento de bactérias patogênicas na nasofaringe, o aumento da aderência das bactérias às células epiteliais e a eventual invasão da orelha média causando OMA.

Ishizuka *et al.* informaram que o rinovírus infectando células epiteliais das vias aéreas humanas cultivadas com *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) favoreceu a adesão a células epiteliais das vias aéreas através de aumento no receptor ativador de plaquetas (PAF -R)⁶. O aumento da adesão de *S. pneumoniae* pode ser uma das razões para que se desenvolva a pneumonia ou otite média aguda após infecções de rinovírus, por indução da expressão de PAF - R, um receptor

para *S. pneumoniae*^{7,8}. Em um modelo de ratos, o vírus Sendai em co-infecção com o *S. pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*) aumentou a taxa de incidência, a duração da OMA, e a carga bacteriana.

Em um estudo envolvendo seres humanos, a detecção de rinovírus ou adenovírus na nasofaringe foi positivamente associada com a presença de *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) (crianças aborígenes) e *M. catarrhalis* (crianças indígenas e não indígenas). No entanto, o adenovírus foi negativamente associado com *S. pneumoniae* em crianças aborígenes¹⁰. Tomochika *et al.* relataram, no Japão, que 31% das crianças hospitalizadas com VSR tiveram OMA¹¹.

3. Bacteriologia da OMA

As bactérias são encontradas em 50 % - 90 % dos casos de otite média aguda, com ou sem otorréia¹². *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ou *M. catarrhalis* são os principais patógenos responsáveis pela OMA e frequentemente colonizam a nasofaringe¹²⁻¹⁶.

A bacteriologia clínica mudou drasticamente após a introdução da vacina pneumocócica conjugada (PCV)¹³⁻¹⁷. O patógeno mais comumente identificado era o *S. pneumoniae*, que, antes da adoção da vacina pneumocócica conjugada 7-valente (PCV -7), foi isolado em aproximadamente um terço a metade dos casos¹²⁻¹⁶. Block *et al.* estudaram as mudanças da microbiologia após a vacinação de toda a comunidade com PCV- 7¹⁵. Comparando cada coorte (1992-1998 contra 2000-2003), a proporção de *S.pneumoniae* diminuiu significativamente de 48 % para 31 %, e de *H. influenzae* não tipável (NTHI) aumentou significativamente de 41 % para 56 %. Pós- PCV- 7, as bactérias Gram-negativas e produtoras de beta-lactamase foram responsáveis por dois terços e metade de todos os casos isolados de OMA, respectivamente. Em termos de mudança dos sorotipos do *S. pneumoniae* a eficácia da vacina PCV-7 contra os sorotipos vacinais foi de 60%.

4. Susceptibilidade antimicrobiana

O *S. pneumoniae* e o *H. influenzae*, dois patógenos notórios, desde há muito tempo eram suscetíveis aos beta-lactâmicos e as OMA causadas por eles eram facilmente resolvidas com a terapia antimicrobiana oral. No entanto, os patógenos resistentes aos antimicrobianos, especialmente o *S. pneumoniae* resistente à penicilina (SPRP), tornaram-se as principais causas de otite média intratável¹³. A resistência antimicrobiana do *H. influenzae* também evoluiu significativamente nos últimos 20 anos, embora a ampicilina seja considerada o fármaco de primeira escolha para o tratamento da infecção causadas pelo *H. influenzae*.

As definições de resistência são baseadas nas concentrações inibitórias mínimas (*minimal inhibitory concentration* - MIC) estabelecidas pelo Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (CLSI)⁸. O CLSI estabeleceu uma nova abordagem para os pontos de referência para resistência a penicilina (**Tabela 1**)⁸ e essa abordagem é necessária para orientar o tratamento adequado, porque leva em conta se a penicilina é administrada por via oral ou parenteral, e se o paciente tem meningite. Nos estudos de OMA foram utilizados padrões de referência para penicilina oral e foi definido que todas as cepas isoladas com uma MIC para a penicilina de pelo menos 0,12 µg / mL para *S. pneumoniae* são não suscetíveis (PNSP), ou utilizado um intervalo de MIC de 0,12-1,0 µg / mL de penicilina para

definir *S. pneumoniae* (PISP) com resistência intermediária, e $\geq 2,0$ $\mu\text{g} / \text{mL}$ para definir *S. pneumoniae* resistente a penicilina (PRSP).

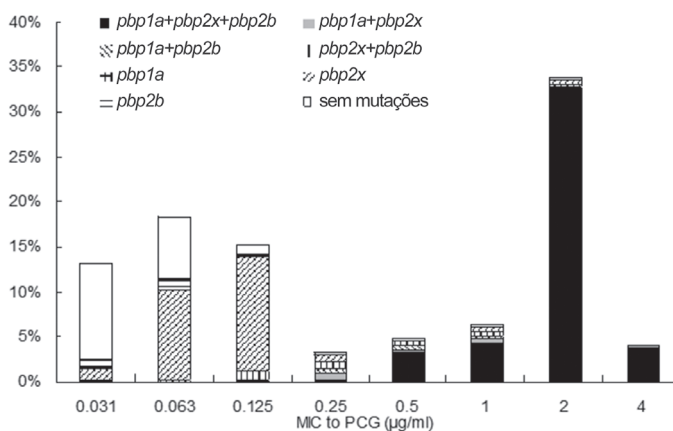
O mecanismo de resistência do *S. pneumoniae* aos β -lactâmicos são as alterações na proteína de parede de elevado peso molecular (PBP) e a redução da afinidade de ligação de beta- lactâmicos da penicilina às PBPs. Dentre as PBPs, a 1A, 2X, e 2B têm atividade de transpeptidase e contêm o código de aminoácidos conservados SXXX, SXN e KT (S) G em um resíduo de serina ativo. O *S. pneumoniae* adquire genes exógenos de baixa afinidade que provoca mutações genéticas que alteram a afinidade da PBP para β -lactâmicos²⁰⁻²³. A mutação *pbp* associa-se bem com a susceptibilidade do *S. pneumoniae* (MIC), ou seja, MIC elevado em cepas com maior número de mutações em *pbp* (Figura 1)¹³.

Tabela 1. Pontos de corte do MIC para o uso clínico da penicilina em doença pneumocócica, por tipo de formulação

| | Suscetível | Intermediário | Resistente |
|---------------------------|-------------|---------------|-------------|
| Parenteral, não meningite | ≤ 2.0 | 4.0 | ≥ 8.0 |
| Parenteral, meningite | ≤ 0.06 | -- | ≥ 0.12 |
| Oral (penicilina V) | ≤ 0.06 | 0.12-1.0 | ≥ 2.0 |
| amoxicilina Oral | ≤ 2.0 | 4.0 | ≥ 8.0 |

Os dados são a concentração inibitória mínima (MIC) ($\mu\text{g} / \text{mL}$).

Figura 1. Associação entre a susceptibilidade a PCG e mutações em genes *pbp*.



Dados do Instituto padrões clínicos e de laboratório (2008)¹⁷

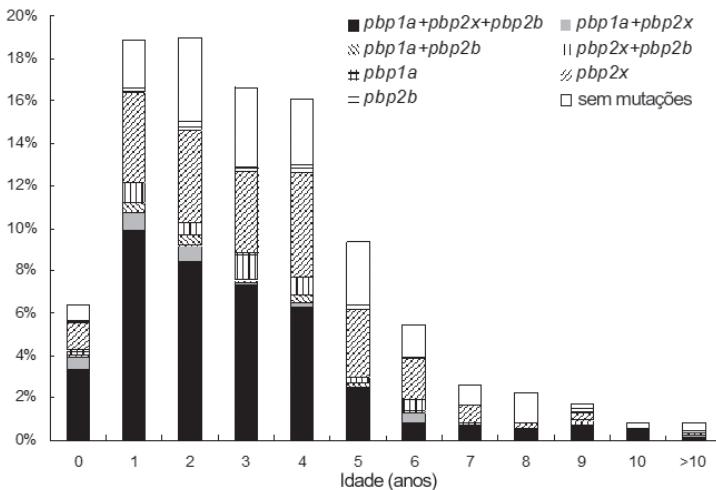
Foram relatados dois mecanismos bem conhecidos de resistência do *H. influenzae* aos β -lactâmicos. Um deles é a produção de β -lactamases tipo TEM-1 ou de ROB – 1^{24,25}. O outro é designado como β -lactamase não produtoras de resistência à ampicilina (BLNAR) e envolve uma diminuição de afinidade de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) para β -lactâmicos causadas por alterações na configuração por mutações genéticas²⁶⁻²⁸. O aumento da resistência aos β -lactâmicos em cepas BLNAR relacionam-se estreitamente com mutações no gene *ftsI* que

codifica a PBP3, que faz a intermediação do septo peptidoglicano^{29,30}. As substituições no gene *ftsI* foram classificadas em três grupos: Grupo I, His é substituído por Arg - 517 (Arg517His) perto do código KTG; grupo II, a Lys é substituída por Lys Asn - 526 (Asn526Lys) perto do código KTG; e grupo III, três resíduos (Met - 377, Ser - 385, e Leu - 389) próximo do código SSN são substituídos por Ile, Thr, e / ou Phe (Met377Ile, Ser385Thr, e / ou Leu389Phe, respectivamente), além da substituição de Asn526Lys. As cepas com resistência intermediária à ampicilina (AMP) são comumente encontradas nos grupos I e II, e as cepas do grupo III estão associadas a um nível elevado de resistência à ampicilina³¹ (**Tabela 2**).

5. A resistência antimicrobiana do *S. pneumoniae*

A alta incidência de *S. pneumoniae* resistentes (PRSP) à penicilina foi uma questão global recente, especialmente nos países asiáticos em desenvolvimento. A partir de estudos de países asiáticos verificou-se que a taxa de PRSP foi de 54,8% na Coreia, 43,2% em Hong Kong, 38,6% em Taiwan, 71,4% no Vietnã, e 29,3 % no Japão^{13,32}. Na análise genotípica do *S. pneumoniae* isolados de crianças com OMA, a alta incidência de mutações em três genes PBP foi observada em crianças de 1 a 4 anos de idade (**Figura 2**)¹³.

Figura 2. Distribuição etária em genes PBP. As crianças mais jovens apresentaram maior incidência de mutação genética em PBP.



A vigilância da susceptibilidade antimicrobiana dos pneumococos isolados de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade em 1997-2001 na América Latina revelou que aproximadamente 70% das amostras foram consideradas suscetíveis à penicilina³³. A ordem de classificação da resistência à penicilina entre os países participantes foi o México (25,0%) > Uruguai (19,2%) > Chile (18,3%) > Colômbia = Argentina (9,9%) > Brasil (3,9%) > Venezuela (2,8%). Estudos recentes do Brasil informaram que 22,1 % dos isolados eram não-suscetíveis à penicilina, 56% eram não-suscetíveis à trimetoprim / sulfametoxazol, e 29,6 % eram não suscetível à tetraciclina. Não suscetibilidade à penicilina e cefotaxima foi detectada exclusivamente entre o sorotipo 14 (1 %)³⁴.

Tabela 2. Correlação entre a genotipagem baseada em PCR e a susceptibilidade à ampicilina (AMP)

| Genotipo com base no PCR | No. de isolados | No. de isolados com MIC para AMP (µg/mL) de: | | | | | | | | | | MIC (µg/mL) | | | Susceptibilidade (%) ^a | | |
|--------------------------|-----------------|--|------|-----|----|----|----|----|----|----|------|-------------------|-------------------|----------|-----------------------------------|------|------|
| | | ≤0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | ≥64 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | Variação | S | I | R |
| gBLNAS | 87 | 3 | 35 | 46 | 3 | | | | | | | 0.5 | 0.5 | 0.12-1 | 100 | 0 | 0 |
| Grupo I/II gBLNAR | 98 | 5 | 23 | 21 | 18 | 23 | 6 | 2 | | | | 0.5 | 2 | 0.12-8 | 68.4 | 23.5 | 8.1 |
| Grupo III gBLNAR | 74 | | | | 7 | 14 | 18 | 24 | 10 | 1 | | 4 | 16 | 32 | 9.5 | 18.9 | 71.6 |
| Grupo I/II gBLPACR | 1 | | | | | | | | | 1 | 128 | 128 | 128 | 0 | 0 | 100 | |
| Grupo III gBLPACR | 2 | | | | | | | | | 2 | >128 | >128 | >128 | 0 | 0 | 100 | |
| gBLPAR | 2 | | | | | | | | | 2 | 64 | >128 | 64->128 | 0 | 0 | 100 | |
| Total | 264 | 8 | 58 | 67 | 28 | 37 | 24 | 26 | 10 | 5 | 0.5 | 8 | 0.12->128 | | | | |

^aS, sensível; I, sensibilidade intermediária; R, resistente.

A resistência do *S. pneumoniae* aos macrolídeos também tem sido uma grande preocupação em todo o mundo e as taxas de resistência foram de 70-80% no Japão, 92,1% no Vietnã, 86% em Taiwan, 80,2% na Coreia, 76,8% em Hong Kong, 30 % nos Estados Unidos^{13,35,36}. A maioria das cepas tinham os genes *mefA* (32,5 %) ou *ermB* (34%) e *mefA* e *ermB* (3,4 %), mediando a resistência a macrolídeo. As susceptibilidades de cepas em relação à claritromicina com o gene *mefA*, gene *ermB* e ambos foram 1-4 µg / mL, > 64 µg / mL e > 64 µg / mL, respectivamente. Os genes de resistência a macrolídeos foram altamente identificados entre cepas não suscetíveis à penicilina (PISP + PRSP) (**Figura 3**)^{13,35}.

6. A resistência antimicrobiana do *Haemophilus influenzae*

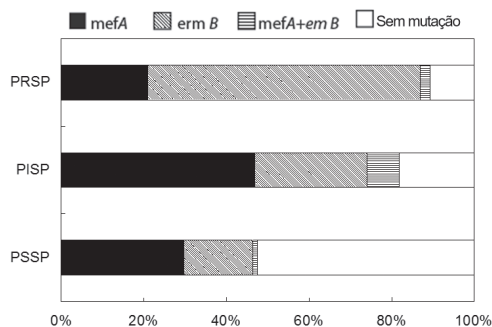
O *H. influenzae* é o segundo principal agente patogênico causador de otite média aguda em crianças. A maioria das OMA é causada por *H. influenzae* não tipável (NTHi). Desde os primeiros relatos de cepas de *H. influenzae* resistentes à ampicilina, em 1974, nos EUA³⁷, o principal mecanismo de resistência antimicrobiana do *H. influenzae* tem sido produzir β-lactamases do tipo ou TEM- 1 ou ROB- 1³⁷⁻³⁹. A prevalência de cepas produtoras de β-lactamase aumentou significativamente até 15,2% em 1983-1984, 36,4% em 1994-1995, e 31,3% em 1997-1998 nos EUA^{39,40}. As cepas resistentes (BLNAR) à ampicilina não produtores de beta-lactamase foram isoladas em baixas frequências, em 1980, mas as cepas BLNAR aumentaram rapidamente a uma taxa de 19,5 % nos anos 1990³⁹. Recentemente, a taxa de BLNAR foi de 58,1% na Coreia do Sul, 37% no Japão, 0-33 % na Europa, 4-10,1% nos EUA^{40,41}.

As cepas resistentes (BLNAR) à ampicilina não produtores de beta-lactamase foram isoladas em baixas frequências, em 1980, mas as cepas BLNAR aumentaram rapidamente a uma taxa de 19,5 % nos anos 1990³⁹. Recentemente, a taxa de BLNAR foi de 58,1% na Coreia do Sul, 37% no Japão, 0-33 % na Europa, 4-10,1% nos EUA^{40,41}.

7. Impacto de vacinas pneumocócicas conjugadas na OMA e resistência aos antibióticos

A incidência de otite média aguda diminuiu nos Estados Unidos e nos países europeus após a introdução da PCV-7^{17,42-44}. Não se espera a redução global de casos de OMA, porque o *S. pneumoniae* é normalmente encontrado em menos de 40-50% de todas as OMA, dos quais cerca de 60-70% são os sorotipos contidos

Figura 3. Genes de resistência aos macrolídeos e susceptibilidade para PCG



na vacina. Se levarmos em conta o desfecho clínico de todos os episódios de otite, a eficácia da vacina foi de 7%¹⁷, 6%¹⁴ e -0,4%⁴², e 34% contra os primeiros episódios de infecção de ouvido e nariz em casos referendados aos especialistas⁴³. O acompanhamento até os 2 anos de idade e de longo prazo demonstrou uma eficácia maior da vacina contra a OMA recorrente e colocação de tubo de ventilação, o que sugere que a vacinação contra primeiros os episódios de OMA pode prevenir episódios subsequentes de otite média. Embora os estudos envolvam diferentes critérios de cura, grupos de idade, fonte de fluido da orelha média para a cultura e tipo de randomização, os ensaios clínicos demonstraram a eficácia da vacina contra os casos de otite média com diagnóstico clínico ou microbiológico⁴⁴.

Os sorotipos 19F, 23F e 6 são os mais prevalentes seguidos pelo sorotipo 3, o 9V, sorotipo 7F como patógenos de OMA em todo o mundo. O aumento da ameaça de PRSP é hoje uma grande preocupação em todo o mundo, além do surgimento de mais cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos. O PRSP provoca três vezes mais OMA intratável quando comparado ao PSSP.

O efeito mais importante da PCV7 na OMA pode não ser a redução observada na OMA em crianças vacinadas, mas sim uma mudança nas proporções de *S. pneumoniae* não suscetível à penicilina (PNSP = PISP + PRSP).

Os *S. pneumoniae* resistentes à penicilina com significância clínica (PRSP) estão associados, principalmente, com sete sorotipos: 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F. Destes sete sorotipos cinco (6B, 9V, 14, 19F, 23F) são constituintes da vacina PCV-7 e os restantes dois sorotipos (6A, 19A) são imunologicamente relacionadas com sorotipos de PCV-7, mas somente a frequência de 6A foi reduzida pela PCV-7⁴⁵.

Três estudos dos EUA têm tentado determinar o efeito da PCV-7 na OMA causada por PNSP, comparando os períodos anteriores e posteriores à introdução da PCV-7^{15, 46, 47} (**Tabela 2**). Casey *et al.* relataram a redução significativa de PRSP⁴⁶, no entanto, McEllistrem em Pittsburgh encontrou um aumento na proporção de sorotipos não incluídos na vacina, mas a proporção de cepas PRSP não diminuiu⁴⁷. No espectro de agentes patogênicos da OMA após a vacinação, dois estudos mostram claramente um aumento na proporção de *H. influenzae*^{15, 46}.

Tabela 2. Estudos sobre o efeito da PCV-7 nos patógenos da OMA antes e depois da introdução da PCV-7 nos EUA (*: estatisticamente significantes)

| | Total de patógenos (n) | % De todos os agentes patogênicos | | | | |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------|------------|---------------------|----------------------|
| | | Total de isolados de SP | PISP | PRSP | <i>H.influenzae</i> | <i>M.catarrhalis</i> |
| Block <i>et al</i> | 336 vs 83 | 48% vs 31% | 16% vs 13% | 9% vs 6% | 41% vs 56%* | 9% vs 11% |
| Casey <i>et al</i> | 112 vs 35 | 48% vs 36% | 7% vs 4% | 14% vs 4%* | 43% vs 57%* | 6% vs 5% |
| McEllistrem <i>et al</i> | 308 vs 197 | | 23% vs 21% | 40% vs 33% | | |

A PCV reduz a colonização de *S. pneumoniae* em pacientes com OMA, mas a eficácia da vacina em patógenos resistentes aos antimicrobianos ainda permanece controversa^{48, 49}.

No entanto, subsistem preocupações quanto à falta de cobertura de PCV em muitos países em desenvolvimento e do potencial aumento de OMA devida a sorotipos não incluídos na vacina e devido ao *H. influenzae*.

Imunologia na otite média aguda

1. A carga bacteriana na nasofaringe está intimamente associada com a OMA

A flora bacteriana da nasofaringe é estabelecida durante o primeiro ano de vida em crianças⁵⁰⁻⁵³. A nasofaringe é então densamente colonizada com uma ampla gama de microorganismos, incluindo bactérias comensais, bem como agentes patogênicos potenciais. O *S. pneumoniae* é um dos habitantes normais na nasofaringe humana e também se torna um patógeno responsável por IVAS incluindo a OMA e a rinosinusite aguda (RSA). O *S. pneumoniae* coloniza 54% das crianças com até 1 ano de idade⁵⁰. No entanto, a colonização com pneumococos é assintomática na maioria dos casos. Quando a defesa da mucosa está deteriorada por infecções virais, o patógeno pode invadir os locais adjacentes, como a cavidade da orelha média ou cavidades sinusais causando OMA ou RSA, respectivamente. A presença de *S. pneumoniae* na nasofaringe mudará dramaticamente durante o curso clínico de uma IVAS. O aumento de pneumococos e uma diminuição da flora comensal na nasofaringe são encontrados durante os episódios de otite média aguda entre as crianças com menos de 3 anos de idade⁵². Além disso, a colonização pneumocócica causa propagação horizontal deste patógeno em crianças que frequentam creches e entre os irmãos. Embora faltem dados sobre mudanças de colonização pneumocócica e sorotipos de *S. pneumoniae* relacionadas à idade entre as crianças saudáveis observam-se mudanças da colonização por pneumococo durante o desenvolvimento de IVAS.

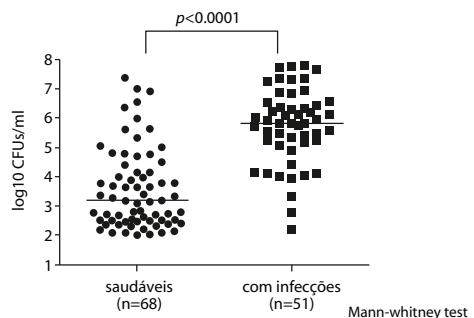
Em nosso estudo sobre as diferenças de densidade nasofaríngea de *S. pneumoniae* entre crianças com IVAS e crianças saudáveis, não só as taxas de detecção de *S. pneumoniae* mas também a densidade de *S. pneumoniae* na nasofaringe estavam aumentadas em crianças com IVAS (**Figura 4**)⁵⁴.

Faden *et al.* relataram o aumento da prevalência de agentes patogênicos na nasofaringe durante episódios de OMA⁵⁵. O estado de portador para o *S. pneumoniae* durante os períodos saudáveis foi relatado como mais baixo (13-43%) do que os de 97 a 100 % durante os episódios de OMA pneumocócicas. A colonização por patógenos potenciais na nasofaringe está associada à alta incidência de OMA entre as crianças. Assim, as mudanças quantitativas na colonização nasofaríngea por pneumococo refletiria o desenvolvimento de uma IVAS.

A OMA ocorre quando os agentes patogênicos da nasofaringe entram na orelha média através da tuba auditiva (TA)⁵⁶. A TA é coberta por um epitélio mucociliar assim como parte do trato respiratório superior, que liga a cavidade da orelha média à nasofaringe. Ela desempenha um papel importante na ventilação e na proteção da cavidade da orelha média⁵⁷. Sob certas circunstâncias, quando microorganismos colonizam a superfície da mucosa nasofaríngea

Figura 4. A densidade de pneumococo na nasofaringe de crianças saudáveis e naquelas com infecção

Densidade do pneumococo na nasofaringe de crianças saudáveis e com infecções



como bactérias comensais, eles podem ter acesso à cavidade da orelha média através da TA, resultando em OMA^{58,59}. A defesa da TA e da orelha média contra patógenos invasores é fornecida por inúmeros fatores, incluindo o sistema mucociliar e as moléculas antimicrobianas do sistema imune inato e adaptativo⁶⁰.

2. Mecanismo de defesa na via aérea superior

A mucosa das vias aéreas é a primeira linha de defesa contra vírus respiratórios e bactérias. Ela tem uma gama de defesas que incluem a defesa mecânica tanto quanto a depuração mucociliar, a imunidade inata, tais como as defensinas, citocinas e quimiocinas, além da defesa adquirida específica para o antígeno. Embora esses mecanismos de defesa destinem-se a facilitar a eliminação rápida microbiana, bactérias e vírus têm desenvolvido estratégias elaboradas para escapar de uma variedade de mecanismos de antimicrobianos, das defesas inatas e das respostas imunes adquiridas.

A proteção contra agentes patogênicos da OMA, como o *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e a *M. catarrhalis* pode depender de anticorpos específicos para o patógeno. No caso do *S. pneumoniae*, o anticorpo protetor é dirigido principalmente para os antígenos do polissacarídeo capsular⁶¹.

Os polissacarídeos capsulares do *S. pneumoniae* são tipo específico e têm uma diversidade de mais de 90 sorotipos. A PCV 13-valente (PCV- 13), licenciada nos EUA em 2010, inclui os sete sorotipos da PCV- 7 (4,6 B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) e mais seis sorotipos adicionais e (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A). Mesmo a PCV-13 cobre apenas 13 sorotipos de mais de 90 sorotipos. Uma desvantagem adicional de polissacarídeos capsulares é a sua fraca imunogenicidade em crianças menores de 2 anos de idade^{62,63}. Além disso, um aumento de OMA causada por sorotipos não vacinais, tais como os sorotipos não incluídos na vacina de *S. pneumoniae*, do *H. influenzae* ou da *M. catarrhalis* tem sido um problema grave após a introdução do PCV-7.

Por isso, temos necessidade de antígenos candidatos a vacinas, que são expostas na superfície da bactéria, evocando anticorpos bactericidas e que são expressas em todas as cepas. Atualmente estamos dirigindo a atenção para os antígenos que satisfaçam os fatores acima mencionados e induzam anticorpos específicos para o microorganismo contra imunógenos de proteínas, como a proteína de superfície pneumocócica A (PspA) do *S. pneumoniae*, da P6 do *H. influenzae* não tipável, e da UspA da *M. catarrhalis*.

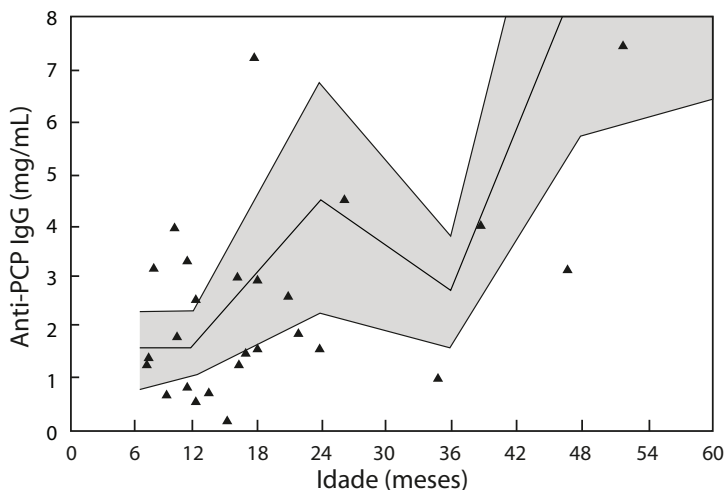
Em nosso estudo imunológico em crianças com otite média⁶⁴⁻⁶⁷, crianças propensas à otite não eram extraordinariamente vulneráveis a infecções em geral, exceto aquelas resultando em otite média. Este fato parece refutar a presença de um déficit imunológico amplo nas crianças. No entanto, as crianças que tiveram episódios recorrentes de otite média causadas por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* não tipáveis, não montaram uma resposta normal ao polissacarídeo da cápsula pneumocócica (PCP), PspA e P6, durante os episódios e não conseguiram ter uma resposta imune secundária em exposições subsequentes. É provável, portanto, que as crianças propensas à otite não respondam adequadamente aos antígenos de pneumococo e, portanto, não possam ser imunizadas com uma vacina eficaz para a otite média que contenha polissacarídeos pneumocócicos. Essas crianças também podem deixar de responder adequadamente a PspA ou P6. Os distúrbios

imunológicos em crianças propensas à otite podem, portanto, ser maiores do que se acreditava anteriormente. As imunoprofilaxias ativas eficazes contra a otite média somente serão possíveis quando os mecanismos do defeito imunológico em crianças propensas à otite for compreendido.

3. A resposta de anticorpos para polissacarídeos capsulares de pneumococos (PCP) em crianças saudáveis e crianças propensas à otite

Em quatro subclasses de IgG humana, IgG1 a IgG4, o anticorpo IgG2 é dirigido e imunologicamente funcional contra antígenos de polissacarídeos. Para conhecer as respostas de anticorpos contra o PCP em crianças saudáveis e em crianças propensas à otite, anticorpos IgG2 anti-PCP no soro daquelas crianças foram dosados pelo método de ELISA⁶⁷. A vacina pneumocócica polivalente (Pneumovax®; Merck Sharp & Dohme, West Point, PA, EUA), contendo 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F) foi utilizada como o antígeno de revestimento. Em crianças saudáveis o nível de IgG2 total foi menor aos 6 meses de idade. O nível aumentou até 2 anos de idade e, em seguida, diminuiu gradualmente até 4 anos de idade. A partir daí, de 4-5 anos, aumentou novamente. A mudança relacionada à idade de anti-PCP IgG2 estava alinhada com IgG2 total. Em crianças propensas à otite, níveis subnormais de IgG total, e IgG2 anti-PCP foram definidos se a concentração fosse mais baixa do que 2 SD (desvio padrão) abaixo da média para a idade em crianças normais. Cinco dos 36 crianças propensas à otite (13,9%) apresentaram níveis subnormais de IgG total. Treze dos 27 crianças propensas à otite (48,1%) apresentaram níveis subnormais de anticorpos IgG2 anti-PCP (Figura 5). O número de crianças com níveis subnormais de IgG2 total não foi maior no grupo de propensas a otite do que no grupo normal ($p = 0,1484$). No entanto, o número de crianças com níveis subnormais de anticorpo IgG anti-PCP foi significativamente maior no grupo de propensas à otite do que no grupo saudável (IgG2 anti-PCP, $p < 0,01$).

Figura 5. IgG2 anti-PCP em crianças saudáveis e em crianças propensas à otite.



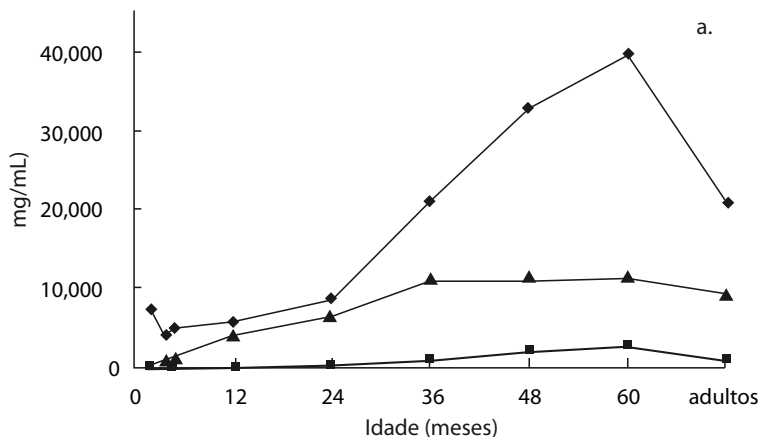
Os valores em crianças saudáveis são desenhados como uma área sombreada que engloba 2 DP em torno da média. Crianças propensas à otite são representadas como pontos individuais (pequenos triângulos pretos).

4. A resposta imune à PspA de *S. pneumoniae* em crianças com otite média aguda

Uma série de publicações recentes descreveu a importância da PspA, tanto na produção da doença, quanto na imunidade. A PspA está ligada à superfície do pneumococo pela extremidade C da molécula, e muito da resposta imune induzida por imunização de animais é dirigida contra a porção alfa - helicoidal N -terminal da molécula⁶⁸. O gene PspA é expresso em todas as cepas de pneumococos, independentemente do seu sorotipo capsular⁶⁹. As respostas dos anticorpos para PspA em animais protegem contra septicemia e a colonização da nasofaringa⁷⁰. Embora o PspA seja uma proteína heteróloga, existe um elevado grau de reatividade sorológica cruzada entre diferentes moléculas PspA das duas principais famílias de PspA⁷¹. Uma única proteína PspA recombinante é capaz de induzir a proteção contra as cepas de pneumococos com diferentes sorotipos capsulares e diferentes sorotipos PspA em modelos animais. Portanto, sugere-se que uma única proteína PspA pode ser capaz de proporcionar proteção contra várias cepas diferentes de *S. pneumoniae*⁷¹.

Estudos de imunidade natural a infecções por pneumococos têm sido dirigidos quase exclusivamente para anticorpos contra os polissacarídeos capsulares. Embora a introdução da vacina conjugada tenha dado respostas satisfatórias aos polissacarídeos em crianças pequenas e às expectativas criadas a respeito de uma vacina à base capsular, ainda existam mais de 90 tipos individuais de cápsula do pneumococo. Uma proteína imunogênica única seria capaz de induzir anticorpos protetores e seria atraente quando comparada com a necessidade de incluir vários polissacarídeos numa vacina para crianças de tenra idade. Estudos epidemiológicos com o *S. pneumoniae* indicam que a aquisição da cepa e o comportamento de queda de colonização com o aumento da idade, sugerem que a maturação do sistema imune, de alguma forma desempenha um papel no controle padrão da colonização⁷².

O estudo das respostas imunológicas a PspA nos soros de vários grupos etários na população em geral mostraram que a IgG é o anticorpo de soro dominante para PspA (**Figura 6**)⁶⁵. Nos primeiros dois anos de vida, uma quantidade comparável de anticorpos IgM e IgG foram observados. Nos idosos, os anticorpos IgG para PspA predominaram sobre anticorpos IgM. O nível de anticorpos IgA para PspA no soro permaneceu baixo durante os primeiros 2 anos de vida. Embora o IgA tenha sido o anticorpo dominante para PspA em secreções das vias aéreas, foi detectado em uma minoria das crianças. Mesmo a maioria das crianças anteriormente colonizadas com o *S. pneumoniae* não tinha o anticorpo nas suas secreções. Um declínio na concentração de anticorpos IgG PspA foi observado no soro de adultos, e isso parece refletir em uma redução semelhante na proporção de IgG total representada por IgG PspA-específica; IgM, IgA.

Figura 6. Anticorpos séricos contra o PspA do *S. pneumoniae* de acordo com a idade

A resposta de anticorpos contra PspA foi avaliada em crianças com OMA causada pelo *S. pneumoniae*⁶⁶. A idade das crianças tinha uma variação de 4-32 meses. As IgG, IgM e IgA para as respostas de anticorpos anti-PspA em soros de crianças nos estádios agudos e convalescentes foram 4,864 mg / mL vs 5,831 mg / mL, $p < 0,05$, 1,075 mg / mL vs 3,752 mg / mL, $p < 0,05$, e 67 mg / mL vs 93 mg / mL, não significante, respectivamente.

Este estudo mostrou que a maioria das crianças responderam a uma infecção por *S. pneumoniae*, produzindo anticorpos para PspA. No entanto, os anticorpos específicos para PspA nem sempre protegem contra infecções da orelha média causadas pelo *S. pneumoniae*, devido a vários fatores. A produção de anticorpos nas mucosas, que deveriam ser as mais cruciais para a proteção na superfície respiratória, pode não ser paralela à produção de anticorpos séricos. Além disso, é bem possível que os anticorpos anti- PspA durante a otite média protejam contra a doença invasiva ainda que a proteção contra a otite média nem sempre seja alcançada.

5. Respostas imunes a P6 de *H. influenzae* não tipáveis em crianças com otite média aguda

O *H. influenzae* não tipável (NTHI) está frequentemente associado com episódios recorrentes e crônicos da doença da orelha média⁷³. Uma das principais proteínas da membrana externa de NTHI, P6, é altamente conservada entre as cepas, é antigenicamente estável, serve como um alvo para anticorpos bactericidas e tem sido proposta como um possível candidata para a formulação de vacina^{74, 75}.

A resposta de anticorpos séricos para P6 foi estudada em crianças propensas à otite e em crianças saudáveis utilizando-se o método de ELISA⁶⁴. O grupo de estudo consistiu de 43 crianças com idade entre 1 e 92 meses e foram incluídas em um estudo prospectivo de otite média. Trinta dos indivíduos foram classificados como crianças propensas porque tiveram quatro ou mais episódios de otite média no primeiro ano de vida ou seis ou mais episódios de otite média no segundo ano, ou seja, foi necessária a colocação de tubos de ventilação. As outras 13 crianças foram consideradas saudáveis e tiveram dois ou menos episódios no primeiro ano de vida, três ou menos até o final do segundo ano.

Na população em geral, o anticorpo IgG anti - P6 ao nascimento foi encontrado quase que no mesmo nível que em adultos, ao passo que foram detectados anticorpos IgM ou IgA específicos para P6. Os níveis de anticorpos Anti- P6 nos três isotipos estudados foram menores aos 6 meses de idade e aumentaram significativamente após 2 anos; os níveis de IgG atingiram um pico aos 10 anos, enquanto IgM e IgA atingiram um pico aos 6 anos. Em cada grupo de idade, o anticorpo IgG específico para P6 estava na concentração mais elevada entre os três isotipos. O anticorpo IgG anti- P6 foi detectado em todos os indivíduos em cada faixa etária, no entanto, o IgM anticorpo específico para P6 foi detectado em todos os indivíduos com idade superior a 6 anos de idade, e anticorpos específicos IgA para P6 foram detectados em todos os indivíduos somente após 10 anos de idade. Durante o episódio de otite média, os níveis de anticorpos séricos da fase de convalescença excediam aqueles em soros de fase aguda em 60 %.

Os soros obtidos durante os períodos agudos e convalescentes foram rastreados para anticorpos bactericidas. Dez soros de fase aguda possuíam anticorpos bactericidas e 10 não; todos os soros da fase de convalescença tinham anticorpos bactericidas. Quando os soros emparelhados foram divididos em dois grupos, dependente da presença ou ausência de anticorpo bactericida no período agudo, e em seguida analisados para o anticorpo P6, um aumento significativo de anticorpo anti-P6 foi detectado no grupo inicialmente sem anticorpos bactericidas.

Para avaliar o distúrbio imunológico em crianças propensas à otite, os níveis de anticorpos anti- P6 foram medidos longitudinalmente em 30 crianças propensas à otite e em 13 crianças saudáveis, em 93 e 32 oportunidades, respectivamente. A idade no momento da amostragem variou entre 1 e 92 meses. Os níveis de anticorpos aumentaram sete vezes no grupo normal por 36 meses, em comparação com menos de três vezes no grupo com propensão à otite, durante 48 meses. Os níveis de anticorpos no grupo normal foram significativamente maiores do que aqueles no grupo de propensas à otite após a idade de 18 meses. Em geral, os níveis de anticorpos em indivíduos propensos a otite não têm um aumento dependente da idade. Além disso, crianças que sofreram dois ou mais episódios de otite média causados por *H. influenzae* não típáveis não tinha resposta de anticorpos secundários à P6. A resposta de anticorpos IgM e a IgA para P6 em crianças propensas à otite atingiu um patamar após 18 meses de idade, e o nível de anticorpos a IgM anti- P6 manteve-se abaixo do nível sérico de adultos, mesmo depois de 4 anos de idade. As diferenças entre as crianças propensas à otite e crianças normais não foram estatisticamente significantes. Os níveis de anticorpos contra P6 em crianças propensas à otite foi dosado, e anti-IgG P6 foram definidos como subnormais, se a concentração fosse mais baixa do que 2 DP abaixo da média de idade em crianças normais. Como mostrado na **Figura 7**, 11 de 20 casos de crianças propensas à otite (55 %) mostraram níveis subnormais de IgG anti-P6⁶⁷.

A incapacidade de desenvolver uma boa resposta de anticorpos contra antígenos comuns pode permitir que o patógeno seja persistente ou recorrente. Como demonstrado por Harabuchi⁷⁶, o nível de anticorpos anti-P6 correlacionou-se com a gravidade da otite média. A base para essas anormalidades imunológicas observadas permanece obscura. No entanto, Kodama e Faden⁷⁷ sugeriram que, no caso

de NTHi, uma falta de linfócitos T de memória contribuiria para a resposta fraca de anticorpos, apesar da exposição repetida ao patógeno. Estes resultados fornecem mais informações sobre os aspectos imunológicos da propensão à otite.

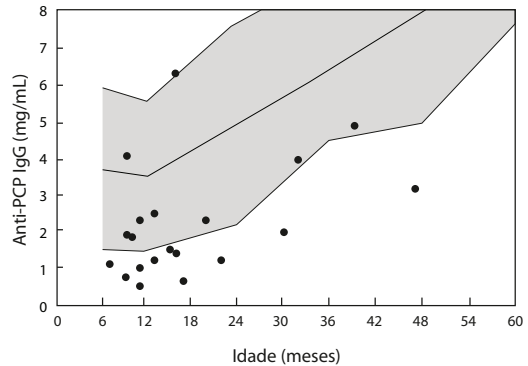
6. Importância de anticorpos maternos e uma estratégia nobre de imunização intranasal

Em nosso estudo imunológico em crianças com otite média⁶⁴⁻⁶⁷, as crianças propensas à otite não eram extraordinariamente vulneráveis a infecções, exceto aquelas resultando em otite média. Este fato parece refutar a

presença de um déficit imunológico amplo nas crianças. No entanto, as crianças que tiveram episódios recorrentes de otite média causadas por *S. pneumoniae*, ou NTHi não montaram uma resposta normal ao PCP, PspA e P6, durante os episódios e não conseguiram ter uma resposta imune secundária em desafio repetido. Os distúrbios imunológicos seletivos em crianças propensas à otite podem, portanto, ser maiores do que se acreditava anteriormente. Além disso, crianças pequenas, saudáveis ou não, mostram o nível menor de soro IgG em suas vidas em idade inferior a 2 anos. Assim, torna-se importante induzir respostas imunes protetoras contra os pneumococos eficazes durante a primeira infância.

A PspA é uma proteína da superfície estruturalmente variável e importante para a virulência dos pneumococos. As PspAs apresentam reação sorológica cruzada e existem como duas grandes famílias. Melin *et al.* relataram a distribuição das famílias PspA 1 e 2 entre as cepas de pneumococo isoladas do fluido da orelha média (MEF) de crianças com otite média aguda e de amostras de secreção nasofaríngea de crianças portadoras sadias de pneumococo⁷⁸. As cepas isoladas de fluido de orelha média (n = 201) dos 109 pacientes e aquelas isoladas de nasofaringe (n = 173) de 49 crianças foram tipadas para família de PspA. A tipagem genética (PCR) da família da PspA foi feita em 60 cepas isoladas para confirmar os resultados de tipagem de AIA. A prevalência de famílias PspA 1 e 2 foram similares entre os pneumococos isolados de MEF (51 % e 45%, respectivamente) e nas amostras da nasofaringe (48 % cada). As cepas isoladas de determinados tipos de cápsulas, bem como de certos tipos de seqüência multilocus (STS) mostram uma associação estatística com qualquer uma das duas famílias PspA1 ou PspA 2. Os pneumococos de sete crianças com cepas múltiplas isoladas pareceram expressar sorologicamente diferentes famílias de PspA em diferentes cepas isoladas e do mesmo sorotipo; em três das crianças os STs das cepas isoladas eram os mesmos, o que sugere que podem ter ocorrido mudanças

Figura 7. IgG Anti- P6 em crianças saudáveis e em crianças propensas à otite. Os valores em crianças saudáveis são plotados como uma área sombreada que engloba 2 SD em torno da média. As crianças propensas à otite são representadas como pontos individuais (pequenos círculos pretos).



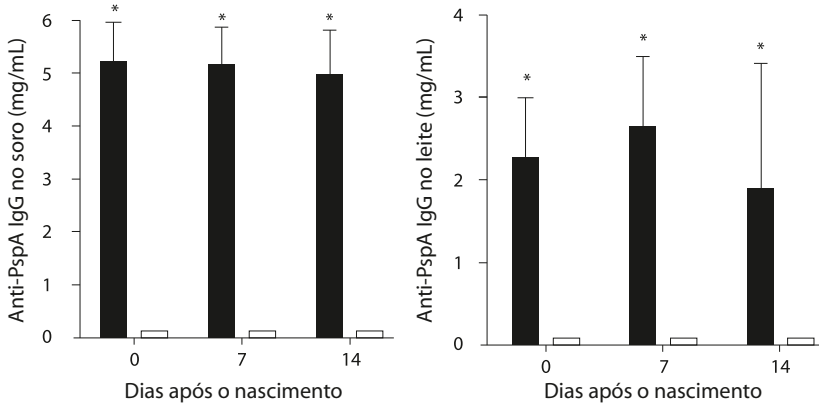
antigênicas na PspA expressas. A maioria das cepas isoladas (97 %) pertencia a família PspA 1 ou 2, sugerindo que uma combinação delas, incluindo as duas principais famílias PspA, seria um boa candidata à vacina. Eles também relataram o desenvolvimento de anticorpos para as famílias PspA 1 e 2 medidas por um teste imunoenzimático do soro e saliva de crianças com histórico de comprovada por cultura de colonização pneumocócica e/ou otite média aguda e no soro e saliva de adultos⁷⁸. A maioria das crianças tinha elevada concentração no soro e salivares de anti- PspA, para a família de PspA que eles tinham encontrado e baixas concentrações para o outro, enquanto os adultos tiveram altas concentrações de anticorpos para ambas as famílias PSpA, tanto no soro quanto na saliva. Os resultados sugerem que as crianças têm uma resposta de anticorpo específico para a família PspA a que foram expostos e que qualquer vacina da PspA para crianças deve conter membros de ambas as famílias principais da PspA. Estudos recentes sobre o desenvolvimento de uma vacina eficaz para a mucosa têm-se centrado sobre o sistema imunológico comum da mucosa (CMSI)^{79,80}. Yamamoto *et al.*⁸¹ relataram que a imunização oral com PspA e toxina da cólera (CT) poderia induzir respostas imunes específicas para a PspA tanto em saliva quanto soro. No entanto, a via oral, geralmente necessitaria de uma quantidade relativamente elevada de antígenos para a imunização. Kurono *et al.*⁸² relataram o benefício da aplicação intranasal para evocar respostas imunitárias específicas das mucosas, bem como as respostas imunitárias sistêmicas, através da utilização das proteínas da membrana externa (OMP) de *H. influenzae*. Nosso estudo anterior mostrou que a imunização intranasal com o OMP P6 de *H. influenzae* e CT a cada 2 dias por 2 semanas induziu anticorpos específicos IgG anti-P6 tão cedo quanto o 7º dia, e estes atingiram o pico no 21º dia⁸³. Uma aplicação deste esquema de vacinação para a imunização materna também induziu IgG anti-P6-específicos no soro da mãe no momento do nascimento e as respostas foram mantidas por 14 dias durante o período de amamentação⁸⁴. O IgG específico anti-P6 em soros da descendência de mães P6- imunizadas estava aumentado no momento do nascimento e até ao 14º dia. A aplicação intranasal é fácil de repetir e requer apenas uma pequena quantidade de PspA, tal como 1 mg, para cada uma das imunizações. Estudos recentes demonstraram vários adjuvantes das mucosas, tais como a CT mutante atenuada, ligandina flt3, e o CpG⁸⁵⁻⁸⁷. Além disso, seria de interesse aplicar estes adjuvantes das mucosas para a imunização intranasal materna. Demonstrou-se que os anticorpos anti-IgG específicos da PspA no soro materno foi transferido para a descendência através da placenta⁸⁸. Yamauchi *et al.* relataram a importância do anticorpo IgG, em vez de sIgA, no leite materno para manter o IgG específico no soro dos ratos recém-nascidos⁸⁴. De modo diferente do que é observado nos seres humanos, o colostro e o leite da mama da rata contém grandes quantidades de anticorpos IgG em comparação com quantidades de anticorpos de IgA e IgM. Em ratinhos, o anticorpo IgG no soro materno é transferida da mãe para o feto através da placenta pelo receptor Fc neonatal, FcRn, que é expresso nos sacos gestacionais de ratos e camundongos^{89, 90}. Além disso, o anticorpo IgG no leite materno é transferido também a partir do lúmen do intestino para a circulação sistêmica nos camundongos neonatos⁹¹. Este transporte de anticorpo IgG é mediado por FcRn

expresso no intestino dos ratos e camundongos^{92, 93}. Os filhotes nascidos a partir de camundongos imunizados para PspA, com a mãe vacinada por via intranasal, foram protegidos contra infecções pneumocócicas sistêmicas. Ogunniyi *et al.* relataram um aumento no tempo de sobrevivência dos ratos com imunização sistêmica com PspA, após infecções intraperitoneais⁹⁴. Roche *et al.* também relataram que o tempo de sobrevivência foi melhorado por imunização subcutânea com PspA em camundongos após a infecção por pneumococos introduzidos por via intravenosa em quantidade 2-log mais elevada do que a dose letal de 50 %⁹⁵. As evidências iniciais de que PspA poderia induzir respostas imunitárias protetoras vieram de experiências de proteção passiva com anticorpos monoclonais para PspA^{96, 97}. A capacidade protetora dos soros é relatada como sendo correlacionada muito mais fortemente com os níveis séricos de anticorpo para PspA do que com os níveis séricos de anticorpo para o antígeno capsular relevante⁹⁸. A PspA pode interferir com a fixação de complemento C3 e potencialmente bloquear os eventos seguintes que conduzem a opsonização e quimiotaxia de fagócitos⁹⁹. A IgG específica irá inibir a ação de PspA e melhorar opsonofagocitose. Com base nas sequências da região alfa helicoidal de um epitopo, o PspA é dividido em seis subtipos que compreendem três famílias PspA. Famílias 1 e 2 cada uma representa cerca de 50 % dos pneumococos consistente com o relatório de Melin *et al.*⁷⁸, enquanto a família 3 compreende cerca de 1 % dos pneumococos (nossos dados não publicados). As PspAs são imunologicamente reativas de forma cruzada, apesar de serem estruturalmente e antigenicamente variáveis¹⁰⁰. Embora a reatividade cruzada de anticorpos IgG específicos de PspA em prole PspA tenha sido submetida recentemente a fase I de ensaios clínicos em humanos e o antígeno tenha sido apontado por ser seguro e altamente imunogênico⁸⁸. Um estudo de fase I em humanos, usando recombinante com PspA (família 1, clade 2), mostrou que o soro pós-imunização poderia proteger camundongos contra a infecção pneumocócica fetal.

Os valores em crianças saudáveis são desenhados como uma área sombreada que engloba 2 DP em torno da média. As crianças propensas à otite são representadas como pontos individuais (pequenos círculos pretos).

Nós avaliamos a proteção conferida contra infecções pneumocócicas graves durante a infância através da imunização intranasal materna com PspA¹⁰¹. Camundongos de quatro semanas de idade, do sexo feminino BALB / c foram imunizados com PspA com ou sem a toxina da cólera B (CTB) por via intranasal, duas vezes por semana durante 3 semanas. Após a imunização final, foram acasalados com camundongos machos para obter descendência. A prole de 10 dias de idade foi inoculada por via intraperitoneal com uma cepa de pneumococo, TIGR4, sorotipo 4. Após as infecções seus períodos de sobrevivência foram monitorizados. Os anticorpos IgG anti- PspA -específico foram induzidos em soro e leite materno ao nascimento e mantidos por 14 dias durante os períodos de amamentação dos camundongos em mães imunizadas (**Figura 8A, 8B**).

Figura 8A e 8B. Os níveis de anticorpo anti-IgG específico da PspA nos soros das mães (a) e no leite materno (b). Os valores para os resultados são expressos como a média \pm SE de anti-IgG específico da PspA. Barras fechadas, mães imunizadas; barras abertas, mães não imunizadas. * $P < 0,01$



Após o nascimento, a descendência de mães imunizadas tinha níveis de anticorpo anti-IgG específico para PspA no soro semelhante aos de suas mães, no dia do nascimento (**Figura 9**). Os tempos de sobrevivência de filhos de mães PspA imunizadas, após infecções pneumocócicas sistêmicas fatais foram ampliados significativamente em comparação com os controles (**Figura 10**). Este estudo indica que, para a proteção contra sepse, uma vacina contendo PspA pode ser ideal para gerar proteção contra a doença invasiva. Um estudo prévio revelou que o anticorpo para PspA pode ultrapassar o efeito anti-complemento da PspA, permitindo uma ativação maior do complemento e a deposição de C3 em pneumococos⁹⁷. Além disso, o anticorpo PspA aumentou a eliminação de pneumococos pela apolactoferrina atra-

Figura 9. Os níveis de anticorpo anti-IgG específico PspA - soros em prole.

Os valores para os resultados são expressos como a média \pm SE de anti-IgG específico da PspA. Barras fechadas, mães imunizadas; barras abertas, mães não imunizadas.

* $P < 0,01$

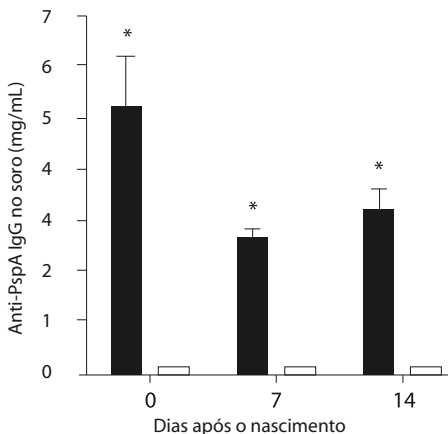
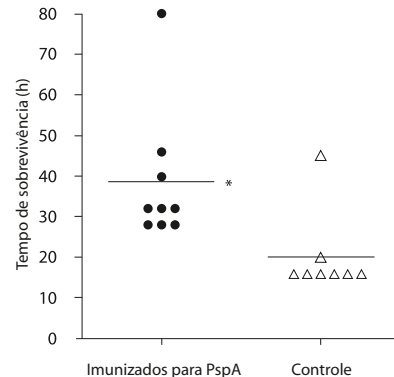


Figura 10. Sobrevida de camundongos após infecções pneumocócicas sistêmicas fatais

A sobrevida da descendência depois de infecções pneumocócicas sistêmicas fatais é mostrada. Círculos fechados, prole de camundongos com mãe PspA imunizadas; triângulo, camundongos de mãe não imunizadas.

* $P < 0,01$ pelo teste U Mann Whitney.



vés do bloqueio do sítio ativo bactericida da lactoferrina responsável pela morte pneumocócica¹⁰². Estes resultados sugerem fortemente que o anticorpo anti-PspA pode atuar como um anticorpo bactericida e/ou que pode estar envolvido na morte opsonofagocítica. Testes adicionais serão necessários para se chegar à composição mínima ideal de uma vacina para prevenir as infecções pneumocócicas.

Em conclusão, **a imunização intranasal materna seria um procedimento atraente contra infecções pneumocócicas na infância, pois a transição do anticorpo específico pode ser esperada através da placenta e do leite da mãe.**

Referências bibliográficas

1. Yano H, Okitsu N, Hori T, *et al.* Detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions and middle ear fluid from children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol.* 2009;129(1):19-24.
2. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, *et al.* Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clin Infect Dis.* 2008;46(6):815-823.
3. Heikkinen T, Osterback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpaa R. Human metapneumovirus infections in children. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(1):101-106.
4. Beder LB, Hotomi M, Ogami M, *et al.* Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media. *Eur J Pediatr.* 2009;168(11):1365-1372.
5. Rezes S, Soderlund-Venermo M, Roivainen M, *et al.* Human bocavirus and rhinovirus infections in childhood otitis media with effusion. *J Clin Virol.* 2009;46(3):234-237.
6. Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, *et al.* Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis* 2003; 188:1928-39.
7. Tuomanen EI. The biology of pneumococcal infection. *Pediatr Res* 1997;42:253-8.
8. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 1995;377:435-8.
9. Krishnamurthy A, McGrath J, Cripps AW, Kyd JM. The incidence of *Streptococcus pneumoniae* otitis media is affected by the polymicrobial environment particularly *Moraxella catarrhalis* in a mouse nasal colonisation model. *Microbes Infect.* 2009;11(5):545-553.
10. Moore HC, Jacoby P, Taylor A, *et al.* The interaction between respiratory viruses and pathogenic bacteria in the upper respiratory tract of asymptomatic Aboriginal and non-Aboriginal children. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(6):540-545.
11. Tomochika K, Ichiyama T, Shimogori H, Sugahara K, Yamashita H, Furukawa S. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection-associated acute otitis media. *Pediatr Int.* 2009;51(4):484-487.
12. Bluestone CD, Stephenson JS, Martin LM. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:S7-11
13. Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, Yamanaka N. High prevalence of *Streptococcus pneumoniae* with mutations in *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* genes of penicillin binding proteins in the nasopharynx among children in Japan. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2006;68: 139-45.
14. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, *et al.* Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media *N Engl J Med*, 2001; 344(6): 403-9
15. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, *et al.* Community-wide vaccination with the heptavalent pneumococcal conjugate significantly alters the microbiology of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(9): 829-33
16. Kilpi T, Herva E, Kaijalainen T, Syrj nen R, Takala AK. Bacteriology of acute otitis media in a cohort of Finnish children followed for the first two years of life. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(7): 654-62.

17. Fireman B, Black SB, Shinefield HR, *et al.* Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(1):10-6.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fourteenth informational supplement [document M100-S14]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2004.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth informational supplement [document M100-S18]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2008.
20. Barcus VA, Ghanker K, Yeo M, Coffey TJ, Dowson CG. Genetics of high level penicillin resistance in clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 126: 299-303.
21. Kell CM, Sharma UK, Dowson CG, Town C, Balganesch TS, Spratt BG. Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B, 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Letter* 1993;106: 171-175.
22. Markiewicz Z, Tomaz A. Variation in penicillin-binding protein patterns of penicillin-resistant clinical isolates of pneumococci. *J Clin Microbiol* 1989;27: 405-410.
23. Munoz RC, Dowson CG, Daniels M, Coffey TJ, Martin C, Hakenbeck R, Spratt BG. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1992; 6:2461-2465.
24. Reid AJ, Simpson IN, Harder PH, Aymes SGB. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*: Identification of resistance mechanism. *J Antimicrobiol Chemother* 1987; 20: 645-656.
25. Vega R, Sadoff HL, Patterson MJ. Mechanism of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* type B. *Antimicrob Agent Chemother* 1976; 9: 164-168.
26. Medeiros AA, Levesque R, Jacoby GA. An animal source for the ROB-1 beta-lactamase of *Haemophilus influenzae* type b. *Antimicrob Agent Chemother* 1986; 29: 212-215.
27. Mendelman PM, Chaffin DO, and Kalaizoglou G. Penicillin binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25: 525-534.
28. Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, Rubens CE, Mack KD, Selanser RK. Characterization of non- beta-lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 235-244.
29. Parr TR Jr, Bryan LE. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 747-753.
30. Clairoux N, Picard M, Brochu A, Rousseau N, Gourde P, Beauchamp D, Parr TR Jr, Bergeron MG, Malouin F. Molecular Basis of non-β-lactamase-mediated resistance to β-lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1504-1513.
31. Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S and Yamanaka N. Genetic characteristics and clonal dissemination of β-lactamase non-producing ampicillin resistant (BLNAR) *Haemophilus influenzae* isolated from the upper respiratory tract in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3969-3976.
32. Jae-Hoon S, Jung S, and Ko KS. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48: 2101-2107.
33. Castanheira M, Gales, AC, Medes RE, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(7):645-51.
34. Menzes APO, Campos LC, Santos MS, *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine* 2011;29(6):1139-44.
35. Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, Yamanaka N, An increase of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* expressing *mefE* or *ermB* gene in the nasopharynx among children with otitis media. *Laryngoscope* 2005; 115: 317-20.

36. Farrell DJ, File TM, Jenkins SG. Prevalence and Antibacterial Susceptibility of *mef(A)*-Positive Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* over 4 Years (2000 to 2004) of the PROTEKT US Study. *J Clin Microb* 2007; 45: 290-293.
37. Thomas WJ, McReynolds JW, Mock CR, Bailey DW. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. *Lancet* 1974; 23: 313.
38. Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Horry GHJr, Rauch A. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: result of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41: 292-297.
39. Doern GV, Jones RN, Pfaller MA, Kugler K. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patients with community-acquired respiratory tract infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:385-389
40. Jasen WT, Varel A, Beistma M, Herhoof J and Milatovic. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemotherp* 2006; 58: 873-77.
41. Hotomi M, Fugihara K, Sakai A, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, and Yamanaka N. Antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of Japanese children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol* 2006; 126:240-7.
42. O'Brien KL, David AB, Chandran A, *et al.* Randomized, controlled trial efficacy of pneumococcal conjugate vaccine against otitis media among Navajo and White Mountain Apache infants. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27(1):71-3.
43. Prymula R, Peeters P, Chrobok V, *et al.* Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomized double-blind efficacy study. *Lancet* 2006; 9512:740-8.
44. Fletcher MA and Fritzell B. Pneumococcal conjugate vaccines and otitis media:an appraisal of the clinical trials. *Int J Otolaryngol* 2012; 2012:312935. Epub 2012 Sep 19.
45. Dagan R, Klugman K. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:785-95.
46. Casey JR, Pichichero ME. Changing in frequency and pathogens causing acute otitis media in 1995-2003. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:824-28.
47. McEllistrem MC, Adams JM, Patel K, *et al.* Acute otitis media due to penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 2005;40:1738-44.
48. Grijalva CG, Nuorti JP, Griffin MR. Antibiotic prescription rates for acute respiratory tract infections in US ambulatory settings. *JAMA.* 2009;302(7):758-766.
49. Vergison A, Dagan R, Arguedas A, *et al.* Otitis media and its consequences: beyond the earache. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(3):195-203.
50. Faden H, Duffy L, Wasielewski R *et al* (1997) Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. *J Infect Dis* 175:1440-5
51. Faden H, Duffy L, Williams A *et al* (1995) Epidemiology of nasopharyngeal colonization with non typeable *Haemophilus influenzae* in the first two years of life. *J Infec Dis* 172:132-5
52. Faden H, Waz MJ, Bernstein JM *et al* (1991) Nasopharyngeal flora in the first three years of life in normal and otitis-prone children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100:612-615
53. García-Rodríguez JA, Fresnadillo Martínez MJ (2002) Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 50(Suppl S2):59-73
54. Ogami M, Hotomi M, Togawa A, Yamanaka N. A comparison of conventional and molecular microbiology in detecting differences in pneumococcal colonization in healthy children and children with upper respiratory illness. *Eur J Pediatr* 2010;169:1221-5.

55. Faden H, Stanievich J, Brodsky L *et al* (1990) Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. *Pediatr Infect Dis J* 9:623-6
56. Bluestone CD: Current concepts in eustachian tube function as related to otitis media. *Auris, nasus, larynx* 1985, 12 Suppl 1:S1-4.
57. Seibert JW, Danner CJ: Eustachian tube function and the middle ear. *Otolaryngologic clinics of North America* 2006, 39(6):1221-35.
58. Tonnaer EL, Rijkers GT, Meis JF, Klaassen CH, Bogaert D, Hermans PW, Curfs JH: Genetic relatedness between pneumococcal populations originating from the nasopharynx, adenoid, and tympanic cavity of children with otitis media. *J Clin Microbiol* 2005, 43(7):3140-4.
59. Tonnaer EL, Sanders EA, Curfs JH: Bacterial otitis media: a new non-invasive rat model. *Vaccine* 2003, 21(31):4539-4544.
60. Lim DJ, Chun YM, Lee HY, Moon SK, Chang KH, Li JD, Andalibi A: Cell biology of tubotympanum in relation to pathogenesis of otitis media - a review. *Vaccine* 2000, 19 Suppl 1:S17-25.
61. Bruyn GAW, Zegers BJM, van Furth R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1992; 14:251-62.
62. Douglas R, Paton J, Duncan SJ, Hansman DJ. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis* 1983;148:131-7.
63. Koskela M. Serum antibodies to pneumococcal C polysaccharide in children: response to acute pneumococcal otitis media or to vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:519-26.
64. Yamanaka N, Faden H. Antibody response to outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis-prone children. 1993;122:212-8.
- 65) Samukawa T, Yamanaka N, Hollingshead S, Klingman K, and Faden H. Immune responses to specific antigens of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in the respiratory tract. *Infect Immun* 2000;68:1569-73.
66. Samukawa T, Yamanaka N, Hollingshead S, Murphy TF, and Faden H. Immune response to surface protein A of *Streptococcus pneumoniae* and high-molecular-weight outer membrane protein A of *Moraxella catarrhalis* in children with acute otitis media. *J Infect Dis* 2000;181:1842-5.
67. Hotomi M, Yamanaka N, Saito T, *et al*. Antibody responses to the outer membrane protein P6 of non-typeable *Haemophilus influenzae* and pneumococcal capsular polysaccharides in otitis-prone children. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1999;119:703-7.
68. McDaniel DS, *et al*. Molecular localization of variable and conserved regions of PspA and identification of additional PspA homologous sequences in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 1992;13:261-9.
69. Crain MJ, *et al*. Pneumococcal surface protein (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immune* 1990; 58:3293-9.
70. Wu HY, *et al*. Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997;175:839-46.
71. Briles DE, *et al*. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin Microbiol Rev* 1998;11:645-57.
72. Gray BM, Concerse GM III, and Dillon HC. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 1980;142:923-33.
73. Carlin SA, Marchant CD, Shurin PA, *et al*. Early recurrences of otitis media: reinfection or relapse? *J Pediatr* 1987;110:20-5.
74. Murphy TF, Nelson MB, Dudas KC, Mylotte JM, Apicella MA. Identification of a specific epitope of *Haemophilus influenzae* in a 16,600-dalton outer membrane protein. *J Infect Dis* 1985;152:1300-7.
75. Murphy TF, Bartos LC, Campagnari AM, Nelson MB, Dudas KC, Apicella MA. Antigenic characterization of the P6 protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1986;54:774-9.

76. Harabuchi Y, Murakata H, Goh M, *et al.* Serum antibodies specific to CD outer membrane proteins of *Moraxella catarrhalis*, P6 outer membrane protein of non-typeable *Haemophilus influenzae*, and capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* in children with otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1998;118:826-32.
77. Kodama H, Faden H. Cellular immunity to the P6 outer membrane protein of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immunol* 1997;63:2467-72.
78. Melin MM, Hollingshead SK, Briles DE, Lahdenkari MI, Kilpi TM, Kayhty HM. Development of antibodies to PspA families 1 and 2 in children after exposure to *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol* 2008, 15(10):1529-35.
79. Kiyono H, Bienenstock J, McGhee JR, Ernst PB. The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg Immunol* 1992;4:54-62.
80. Marinaro M, Staats HF, Hiroi T, Jackson RJ, Coste M, Boyaka PN, *et al.* Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J Immunol* 1995;155:4621-9.
81. Yamamoto M, McDaniel LS, Kawabata K, Briles DE, Jackson RJ, McGhee JR, *et al.* Oral immunization with PspA elicits protective humoral immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 1997;65:640-4.
82. Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, Kodama S, Suzuki M, Mogi G, *et al.* Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae* specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J Infect Dis* 1999;180:122-32.
83. Hotomi M, Saito T, Yamanaka N. Specific mucosal immunity and enhanced nasopharyngeal clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* after intranasal immunization with outer membrane protein P6 and cholera toxin. *Vaccine* 1998;16:1950-6.
84. Yamauchi K, Hotomi M, Billal DS, Suzumoto M, Yamanaka N. Maternal intranasal immunization with outer membrane protein P6 maintains specific antibody level of derived offspring. *Vaccine* 2006;24:5294-9.
85. Kataoka K, McGhee JR, Kobayashi R, Fujihashi K, Shizukuishi S, Fujihashi K. Nasal Flt3 ligand cDNA elicits CD11c+CD8+ dendritic cells for enhanced mucosal immunity. *J Immunol* 2004; 172:3612-9.
86. Harandi AM, Holmgren J. CpG oligodeoxynucleotides and mobilization of innate mucosal immunity: tasks and tactics. *Vaccine* 2006;24 (Suppl 2):48-9.
87. Yamamoto M, Briles DE, Yamamoto S, Ohmura M, Kiyono H, McGhee JR. A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. *J Immunol* 1998;161:4115-21.
88. Baril L, Briles DE, Crozier P, King JD, Hollingshead SK, Murphy TF, *et al.* Natural materno-fetal transfer of antibodies to PspA and to PsaA. *Clin Exp Immunol* 2004;135:474-7.
89. Ahouse JJ, Hagerman CL, Mittal P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, *et al.* Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. *J Immunol* 1993;151:6067-88.
90. Roberts DM, Guentert M, Rodewald R. Isolation and characterization of the Fc receptor from fetal yolk of the rat. *J Cell Biol* 1990;111:1867-76.
91. Simister NE, Rees AR. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol* 1985;15:733-8.
92. Israel EJ, Patel VK, Taylor S, Marshak-Rothstein A, Semister NE. Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J Immunol* 1995;154:6246-51.
93. Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A, *et al.* Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* 1997;92:69-74.
94. Ogunniyi AD, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2000;68:3028-33.

95. Roche H, Ren B, McDaniel LS, Hakansson A, Briles DE. Relative roles of genetic background and variation in PspA in the ability of antibodies to PspA to protect against capsular type 3 and 4 strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2003;71:4498–505.
96. McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular serotype. *Infect Immun* 1991;59:222–8.
97. Tart R, McDaniel LS, Ralph BA, Briles DE. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J Infect Dis* 1996;173: 380–6.
98. Briles DE, King JD, Gray MA, McDaniel LS, Swiatlo E, Benton KA. PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine* 1996;14:858–67.
99. Ren B, McCrory MA, Pass C, Bullard DC, Ballantyne CM, Xu Y, *et al*. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol* 2004;173:7506–12.
100. Briles DE, Tart RC, Swiatlo E, Dillard JP, Smith P, Benton KA, *et al*. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on PspA. *Clin Microbiol Rev* 1998;11: 645–57.
101. Katsurahara T, Hotomi M, Yamauchi K, Billal DS, Yamanaka N. Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). *J Infect Chemother* 2008, 13(4):235-254.
102. Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH Jr, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun* 2004;72:5031–40.