

# *Avanços em Vacinas Contra o Streptococcus pneumoniae*

Samantha King

O *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) geralmente está presente na nasofaringe humana de modo assintomático. Porém, se a relação entre o hospedeiro e a bactéria permitir que o agente infeccioso se dissemine para outros locais, podem ocorrer doenças como otite média, pneumonia, bacteremia e meningite. A otite média é uma doença infantil cujo pico de incidência ocorre entre os seis e 18 meses de idade<sup>63</sup>. Nos Estados Unidos, é a segunda causa mais frequente de consultas de crianças com idade inferior aos 12 anos, totalizando mais de 11 milhões de atendimentos por ano<sup>23</sup>. Em lactentes, isto equivale a 62 consultas por 100 mil crianças. Em geral, a otite média não é uma doença fatal, porém suas complicações incluem mastoidite, meningite, perda auditiva e retardo do desenvolvimento<sup>10,119,133,134</sup>. Além disso, os custos são elevados. Estima-se que, nos EUA, o atendimento de casos de otite média atinja valor superior a quatro bilhões de dólares por ano<sup>11</sup>. Os custos indiretos são muito mais elevados, especialmente devido aos dias de trabalho perdidos pelos pais. A otite média é a principal causa de prescrição de antibióticos para crianças, contribuindo de forma importante para a resistência aos antimicrobianos<sup>36</sup>. Este aumento da resistência dificulta cada vez mais o seu tratamento. Consequentemente, há um interesse crescente pelo desenvolvimento de vacinas que previnam as doenças pneumocócicas, incluindo a otite média.

**O objetivo deste capítulo é oferecer informações sobre as vacinas pneumocócicas já licenciadas, sua eficácia na prevenção da otite média e indicações para futuros desenvolvimentos de novas vacinas.** Há poucas pesquisas sobre a eficácia de novas estratégias vacinais contra a otite média. Assim, esta parte será dedicada às doenças pneumocócicas em geral. Como há grande número de publicações referentes a possíveis vacinas proteicas, nem todas serão mencionados aqui. Porém, informamos os aspectos positivos e negativos das vacinas existentes, as dificuldades para desenvolver novas vacinas e as abordagens possíveis de vacinas futuras.

## **Vacinas pneumocócicas disponíveis**

Todas as vacinas atualmente licenciadas estão baseadas nos polissacarídeos capsulares dos pneumococos. Cada uma das cepas isoladas de pneumococos expressa um ou mais dos 90 polissacarídeos capsulares<sup>20</sup> que são importante fator de virulência. As cepas sem cápsula têm poder de colonização inferior ao das encapsuladas; portanto, a cápsula é essencial para causar doença invasiva<sup>3, 86</sup>. Alguns tipos encapsulados têm maior propensão a causar doenças, mas sua distribuição varia com a idade e a distribuição geográfica<sup>53,97</sup>. A resposta imune aos polissacarídeos capsulares geralmente é específica. Há alguns exemplos de pequena proteção cruzada, mas, em termos gerais, a imunização apenas oferece proteção contra os tipos capsulares incluídos na vacina.

A vacina pneumocócica 23-valente (**PPV-23**) inclui a cápsula purificada dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F,

19A, 20, 22F, 23F e 33F. Os tipos de cápsula incluídos nesta vacina contêm alta porcentagem das principais cepas que ocorrem nos EUA e outros países<sup>104</sup>. Outros trabalhos demonstram que a imunização com vacinas derivadas de polissacarídeos pneumocócicos (PPV) têm o poder de proteger adultos contra a doença invasiva, mas os dados sobre a prevenção de pneumonia em adultos são contraditórios<sup>72, 76, 90, 104, 111, 112, 114</sup>. A PPV não é recomendada para crianças com menos de dois anos, pois sua eficácia ainda não foi demonstrada nesta faixa etária. Na realidade, a resposta a muitos polissacarídeos não atinge os níveis adultos antes 8-10 anos<sup>92</sup>. Esta falta de eficácia em lactentes, com alta probabilidade, deve-se ao fato de que estes carboidratos são independentes dos antígenos de células T, e não induzem a memória celular<sup>31, 64</sup>. Os polissacarídeos são antígenos do tipo 2, independentes do timo, que ativam os linfócitos B, sem envolver de células CD4+, ligando-se diretamente por *crosslinking* os receptores dos antígenos à superfície da célula B. A interação dos polissacarídeos pneumocócicos com o sistema imune não provoca resposta de memória e os anticorpos gerados são principalmente as imunoglobulinas G2. Devido à baixa resposta de crianças pequenas aos polissacarídeos, não é surpreendente que as PPV ofereçam baixa na proteção contra a otite média aguda (OMA)<sup>30, 58, 118</sup>.

A eficácia limitada das PPV na população com maior risco e o sucesso de outras vacinas conjugadas, como a meningocócica, levou ao desenvolvimento de vacinas conjugadas contra os pneumococos. Já em 1931 sabia-se que a conjugação de polissacarídeos pneumocócicos a uma proteína transportadora aumentaria a imunogenicidade dos carboidratos<sup>3</sup>. A conjugação a uma proteína converte os polissacarídeos em antígenos dependentes de células T, permitindo a geração de memória.

A vacina pneumocócica 7-valente Prevnar 7® (PCV-7) inclui polissacarídeos capsulares dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados ao CRM197, uma toxina diftérica com mutação. Previa-se que, nos EUA, esta vacina ofereceria cobertura a mais de 65% dos casos de otite média e a 80% da doença pneumocócica invasiva em crianças com menos de dois anos de idade<sup>19, 105</sup>. Em 2000, a introdução da PCV-7 nos EUA causou redução altamente significativa da colonização e de doenças invasivas por sorotipos contidos na vacina<sup>127</sup>. Afirmou-se que resultaria em menos consultas médicas, menor risco de otite média e de colocação de tubos timpânicos<sup>44, 93</sup>.

Os ensaios clínicos apenas mostraram pequena redução de 6-8% no total de casos de otite média<sup>8, 32, 37</sup>, mas, conforme previsto, a redução foi muito maior (57-67%) em lactentes. Desde então, foi relatado que os sorotipos da otite média incluídos na vacina praticamente foram eliminados<sup>21</sup>. Também foi observada redução menor, mas significativa, na otite média causada por sorotipos com reação cruzada, como, por exemplo, entre os sorotipos 6A e 19A, não incluídos na vacina, mas relacionados<sup>32</sup>. Como os tipos encapsulados incluídos na vacina contêm grande quantidade de cepas isoladas resistentes a antibióticos, também foi detectada redução das cepas resistentes na otite média<sup>9, 22</sup>.

Nos primeiros anos após a introdução da PVC-7 houve diminuição na porcentagem de casos de otite média por *S. pneumoniae* e aumento concomitante de casos de *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi) cepas isoladas no fluido da orelha média<sup>9, 22</sup>. Assim, na época, os NTHi eram a principal causa de otite média. Mais

tarde, observou-se aumento da colonização e doença por pneumococos por sorotipos não incluídos na vacina. Apesar do incremento bastante modesto de otite média pneumocócica invasiva, foi detectado aumento das otites médias por pneumococos que, segundo alguns estudos, atingiram níveis próximos aos de NTHi<sup>21,32,77</sup>.

A **PCV-7** foi desenvolvida especialmente para reduzir a doença pneumocócica invasiva na América do Norte, mas, como sua distribuição sofre variação geográfica, a cobertura desta vacina PCV-7 também varia. Um estudo recente, multicêntrico concluiu que os tipos encapsulados 1 e 5 de *H. influenzae* estão entre os cinco principais sorotipos causadores da doença em todos os países<sup>53</sup>.

A **PCV-10** inclui três tipos encapsulados 1, 5 e 7F, além dos já presentes na PCV-7. Foi licenciada no Canadá, Austrália e Europa em fins de 2007 e início de 2008. Este licenciamento ocorreu devido à não inferioridade na geração de anticorpos específicos ao sorotipo e segurança em comparação à PCV-7, não sendo inferior a ela<sup>96</sup>. Provavelmente, adicionar mais três tipos encapsulados aumentará a eficácia.

Na **PCV-10**, oito dos dez polissacarídeos são conjugados à proteína D dos NTHi. O polissacarídeo capsular 18C é conjugando ao toxóide tetânico e o 19F, ao toxóide diftérico. Sua segurança e eficácia são comparáveis à PCV-7<sup>96</sup>. **A conjugação de polissacarídeos capsulares a proteínas do NTHi reduz a otite média causada por estes microorganismos<sup>95</sup>**. Ensaio clínico com a vacina 11-valente também demonstraram redução semelhante à PCV-7 na incidência da otite média (34%).

A vacina Prevnar 13® (**PCV-13**) contém polissacarídeos dos sorotipos encapsulados 3, 6A e 19A, além dos já presentes na PCV-10. Trata-se de extensão da PCV-7 em que os polissacarídeos são conjugados a CRM197. Foi aprovada nos EUA no início de 2010, apenas com base na segurança e capacidade de provocar resposta imune<sup>33,60</sup>. Provavelmente, o acréscimo de seis polissacarídeos encapsulados, além dos já existentes na PCV-7, reduzirá a colonização e a doença pneumocócica, inclusive a otite média. Há estudos indicando que estes seis tipos capsulares equivalem a 23% dos pneumococos cepas isoladas na nasofaringe e 47%, na orelha média<sup>21</sup>. A modelagem analítica de decisões sugere que a introdução da PCV-13 preveniria 16,3 milhões de casos de otite média em 10 anos<sup>108</sup>.

Como a PCV-13 foi introduzida há relativamente pouco tempo, ainda é difícil determinar se sua eficácia diminuirá com o tempo. É possível que seja observada maior ocorrência de otite média causada por sorotipos não cobertos pela vacina. O 6C, um dos sorotipos pneumocócicos mais comuns, atualmente encontrados com maior frequência no fluido da orelha média, ainda não tem cobertura por nenhuma das vacinas conjugadas<sup>21</sup>. Embora possa haver alguma proteção cruzada, obtida pela inclusão do 6A na PCV -13, talvez haja aumento na incidência do sorotipo 6C e de outros não incluídos na vacina<sup>24</sup>. **Ainda não se sabe e os sorotipos não incluídos na vacina podem causar otites com a mesma gravidade das cepas contidas na vacina.** Porém, dados epidemiológicos sugerem que **todos os sorotipos de pneumococo apresentam a mesma propensão para causar otite média** e que aqueles mais comumente encontrados apenas refletem a frequência da colonização por estas cepas<sup>45</sup>. Se comprovada esta hipótese, seria necessário modificar

totalmente as vacinas para prevenir a otite média, incluindo todas as cepas, ou adaptando-as para áreas geográficas específicas, sendo recriadas periodicamente, para obter proteção contra a maioria das doenças invasivas. Está claro que será necessário monitoramento contínuo do número de casos desta doença e dos sorotipos envolvidos.

Uma desvantagem comum às PCV é sua alta complexidade de produção e o preço elevado. Isto limitou sua disponibilidade, globalmente. Estudos para aumentar sua relação custo/benefício já estão sendo realizados. Isto permitiria a inclusão de maior número de polissacarídeos capsulares. A alternativa seria fabricar vacinas com componentes que protegem contra todas as cepas de pneumococos.

### **Outras abordagens às vacinas**

Várias estratégias que potencialmente poderiam gerar proteção contra todas as cepas de pneumococos já foram pesquisadas em modelos animais. Sua eficácia em humanos ainda não foi demonstrada.

### **Células bacterianas inteiras inativadas**

Aquí são usados pneumococos inativados, mortos. Desde 1920 já se sabe que imunização com pneumococos inativados pode oferecer proteção contra infecções<sup>18</sup>. As pesquisas atuais avaliaram cepas não encapsuladas, a fim de maximizar a exposição aos antígenos mais provavelmente presentes no local<sup>73</sup>. Quando camundongos foram expostos à imunização por inoculação intranasal de células bacterianas inteiras inativadas, conjugadas à toxina da cólera houve redução significativa da colonização nasofaríngea e da presença de pneumococos na orelha média e septicemia<sup>73, 74</sup>. Uma pesquisa independente mostrou que a imunização parenteral ou via mucosa com bactérias inativadas oferece proteção contra bactérias inoculadas na orelha média de ratos<sup>26</sup>. As evidências sugerem que, diferentemente das vacinas licenciadas que atuam por mediação de anticorpos, a proteção obtida pela inoculação intranasal de bactérias inteiras, inativadas, depende de células T CD4+, mas não depende de anticorpos<sup>75</sup>. A imunidade não foi afetada pela ausência de anticorpos, mas foi anulada em camundongos sem receptores de CD4 ou IL-17A, sugerindo que a proteção é mediada por células CD4+ e TH17<sup>69, 75</sup>.

As pesquisas iniciais de vacinas com agentes bacterianos inteiros inativados usaram cepas expressando a pneumolisina e adjuvantes não viáveis para uso em seres humanos. Como a pneumolisina é citotóxica, foram realizados mais estudos para demonstrar que bactérias expressando um derivado inativo ainda podem oferecer proteção contra a colonização pneumocócica<sup>71</sup>. Outros adjuvantes e vias de administração também demonstraram eficácia<sup>47, 65, 70, 71</sup>. A proteção fornecida por células bacterianas inteiras inativadas é observada mesmo quando os animais são expostos a diferentes tipos de cápsulas de pneumococos<sup>73</sup>. Provavelmente esta proteção é devida à apresentação de múltiplos antígenos conservados. Sua presença provavelmente é vantajosa, mas é possível que alguns dos antígenos possam interferir com a proteção, por serem imunodominantes, mas não protetores. Outra preocupação é que muitos produtos de seus genes são altamente conservados em espécies relacionadas, como estreptococos. Muitas destas espécies são comensais em seres humanos e não se sabe se o uso de vacinas pneumocócicas com células inteiras afetará sua distribuição, ou a saúde humana de modo imprevisto.

Apesar dos possíveis problemas, ainda há interesse no desenvolvimento de vacinas pneumocócicas provenientes de células inteiras inativadas, especialmente para uso em países em desenvolvimento. Isto se deve ao custo relativamente baixo de produção e à possível proteção contra várias espécies. Há uma parceria entre o grupo de pesquisa realizando estes estudos, o Programa para Tecnologia Apropriada em Saúde (PATH) e o Instituto Butantan (Brasil) para iniciar ensaios em humanos da vacina de células inteiras inativadas por calor<sup>71</sup>. A vacina com células inteiras já foi produzida segundo as normas de Boas Práticas de Fabricação (GMP) e os ensaios de Fase I foram iniciados no final de 2011<sup>81</sup>.

#### **Vacinas com agentes vivos atenuados**

Esta estratégia imunizaria através da inoculação intencional de cepas atenuadas que poderiam colonizar as vias aéreas, sem causar doença. Em camundongos, a administração de dose única de cepa atenuada, sem adjuvante, ofereceu proteção significativa após exposição intranasal às bactérias<sup>106</sup>. Além disto, a imunização reduziu significativamente a carga bacteriana na nasofaringe. A proteção ainda era significativa após exposição a uma cepa de configuração genética diferente<sup>106</sup>. Como os pneumococos sofrem mutações, uma preocupação válida é a possibilidade de geração de cepa virulenta por recombinação entre as bactérias usadas na vacina e o DNA de estreptococos residentes. Este problema poderia ser evitado pelo uso de mutante não transformável. As mesmas cautelas valem para vacinas inativadas de célula inteira, incluindo possíveis antígenos não protetores e alta conservação de moléculas imunogênicas em diversas espécies de estreptococos. Apesar do sucesso inicial em animais, pode ser difícil convencer as agências reguladoras de que a inoculação de pneumococos vivos, mesmo que atenuados, é um procedimento seguro.

#### **Proteínas pneumocócicas candidatas**

**É objeto de grande atenção avaliar se as proteínas pneumocócicas são capazes de proteger contra a colonização e a doença.** Várias estratégias de vacinação utilizariam estas proteínas: uma combinação de proteínas pneumocócicas poderia ser usada como vacina e uma ou mais proteínas poderiam ser conjugadas ao polissacarídeo capsular, como ocorre na CRM197 e na proteína D do NTHi, atualmente usadas em vacinas licenciadas; as proteínas pneumocócicas também poderiam ser oferecidas através de vacina recombinante viva, atenuada. As proteínas são consideradas antígenos dependentes das células T e, portanto, deveriam ser altamente imunogênicas, capazes de provocar memória imunológica até em lactentes.

**Qualquer proteína alvo selecionada deverá ser imunogênica,** mas vários outros fatores devem ser levados em consideração ao selecionar as proteínas pneumocócicas a serem incluídas na vacina. Sem dúvida, seria vantajoso usar proteínas pneumocócicas associadas à superfície, já que isto permitiria eliminar as bactérias por opsonofagocitose. A seleção de proteínas candidatas, que desempenham papel fundamental na patogênese destas bactérias, poderá neutralizar a atividade destas moléculas. **Uma das maiores limitações das vacinas contra pneumococos atualmente existentes é que fornecem proteção a determinados sorotipos. Para garantir que vacinas protéicas atinjam uma proteção ampla contra a**

**espécie, é importante que todas as proteínas candidatas contenham antígenos expressos por todas as cepas de pneumococos, suficientemente conservados para permitir a criação de anticorpos com proteção cruzada.** Conforme já descrito para as vacinas com células inteiras inativadas, muitos produtos gênicos dos pneumococos são muito bem preservados em espécies relacionadas; portanto, o uso destes produtos gênicos pode levar à eliminação de comensais, com efeitos não previsíveis à saúde humana<sup>54</sup>. Além disto, se houver alelos diferentes nestes loci em estreptococos recombinantes relacionados, poderia ocorrer criação de pneumococos aos quais os anticorpos gerados pela vacina não conseguem se ligar. As proteínas que, conforme estudos, também são codificadas por estreptococos, incluem muitos candidatos à produção de vacinas, incluindo pneumolisina, PspA, PspC, PhtD, MALX, PsaA, PiaA, PiuA e NanA.

Discute-se se a prevenção de todas as colonizações, como resultado das vacinas, seria um benefício ou malefício ao hospedeiro humano. Alguns autores pensam que as bactérias são comensais que ocasionalmente causam doença e que sua erradicação completa abriria espaço a outras bactérias patogênicas. Outros acreditam que a colonização por pneumococos não tem nenhum objetivo biológico e sua erradicação das vias aéreas permitiria que outros comensais verdadeiros ocupassem o nicho.

Há inúmeras proteínas pneumocócicas já investigadas como possíveis candidatas em modelos animais. Aqui oferecemos uma pequena visão geral dos alvos mais estudados. É difícil comparar diretamente a possível eficácia dos diversos alvos, principalmente devido ao uso de diferentes espécies de camundongos, diferentes vias de administração e protocolos variados, além de doses e cepas bacterianas diversas. Além disto, estudos em roedores fornecem indicações valiosas sobre o provável efeito da imunização com os antígenos protéticos selecionados, o que não necessariamente se traduz em proteção de seres humanos.

### **Pneumolisina**

A pneumolisina, uma hemolisina tiol-ativa encontrada na maioria das cepas de pneumococos, é antigênica no homem<sup>56,83</sup>. Sua propriedade mais conhecida é a capacidade de formar poros nas membranas celulares<sup>12</sup>, mas esta proteína contribui para a patogênese através de múltiplos mecanismos, incluindo ativação de complemento, ruptura das junções entre as células epiteliais e inibição do batimento ciliar<sup>91, 100, 115</sup>. É secretada em algumas situações de crescimento e sua ligação à parede celular foi recentemente descrita como sendo do tipo não covalente<sup>94</sup>. Como não tem sequência de sinal reconhecível nem padrão repetitivo de aderência à parede celular, seus mecanismos de associação celular ainda são desconhecidos. Devido à importância da pneumolisina como determinante da virulência, este antígeno é amplamente analisado nas pesquisas de vacinas.

A maioria dos ensaios em animais, usando a via intranasal ou intraperitoneal demonstra aumentos significativos no tempo de sobrevivência, mas ainda não está claro se a pneumolisina confere uma sobrevivência significativamente mais longa ou não<sup>116</sup>. Por outro lado, modelos de exposição endovenosa mostram que a pneumolisina não confere proteção significativa. Devido a sua toxicidade, uma toxina inativada da pneumolisina, ainda imunogênica, teria que ser usada na vacinação<sup>2</sup>. Um

dos possíveis problemas com o uso da pneumolisina como antígeno em vacinas é a possibilidade de doenças autoimunes, devido à semelhança com a sequência da proteína C reativa humana<sup>79</sup>.

### **Proteínas que se ligam à colina**

As proteínas que se ligam à colina pertencem a uma família de proteínas modulares localizadas na superfície celular dos pneumococos; várias foram consideradas candidatas ao uso em vacinas. A proteína superficial pneumocócica A (PspA) foi a mais estudada como candidata a uma vacina protéica. Participa da patogênese do pneumococo ao contribuir para a inativação do complemento<sup>101,102,110</sup>. Seu gene codificador está presente em todas as cepas e a proteína é antigênica em seres humanos<sup>15,42</sup>. Sabe-se que a imunização humana com PspA pode gerar anticorpos protetores e que o soro de pessoas vacinadas é capaz de proteger camundongos da doença<sup>15,84</sup>. Foi demonstrado que a imunização de ratos com a PspA é capaz de conferir proteção significativa quando da exposição aos patógenos em modelo de otite média<sup>126</sup>. Além disto, esta imunização também pode oferecer proteção significativa contra a colonização e a doença invasiva após exposição a cepas homólogas<sup>129</sup>. Apesar das pesquisas demonstrarem que a exposição a cepas homólogas confere proteção significativa, a imunização contra cepas heterólogas é variável<sup>117</sup>. Presume-se que isto se deve à grande variabilidade nas sequências desta proteína<sup>48</sup>.

A incapacidade do alelo de uma PspA fornecer proteção cruzada contra todos os outros alelos sugere que seria necessário incluir vários alelos na vacina. Outro problema que poderia limitar a inclusão da PspA em vacinas pneumocócicas é sua semelhança estrutural com a miosina e outras proteínas eucarióticas<sup>49</sup>. Já foi relatado que os anticorpos contra a PspA apresentam reação cruzada com tecidos humanos.

A proteína C da superfície pneumocócica (PspC, também denominada CbpA, SpsA, PbcA, Hic) participa na adesão bacteriana às células endoteliais ativadas e na evasão do complemento<sup>50, 52,107,131,132</sup>. A imunização de camundongos com PspC oferece proteção significativa contra morte em modelo de septicemia e reduz a carga bacteriana na nasofaringe<sup>4,16</sup>, apesar de não proteger contra todas as cepas<sup>34</sup>. O gene que codifica a PspC está presente em todos os pneumococos e a proteína é antigênica em seres humanos<sup>42,50</sup>, apesar de sua grande diversidade. Provavelmente sempre está ligada à superfície, mas os mecanismos de aderência variam nas diferentes cepas. A parte terminal C de algumas moléculas da PspC contém sequências repetidas ricas em colina; em outras, está aderida à superfície através de mecanismo dependente da sortase. Devido às diversas sequências possíveis, não se sabe se os anticorpos oferecem proteção cruzada a todas as sequências<sup>51</sup>. Também se desconhece se a interação da PspC com elementos do sistema imunológico (C3, fator H e pIgR) causará efeitos adversos, caso esta proteína seja usada em imunização de seres humanos<sup>116</sup>.

Dados recentes sugerem que uma região de conservação entre PspA e PspC poderia ser usada como antígeno em vacinas. Trata-se de repetição rica em prolina encontrada na parte terminal C de todas as proteínas PspA e PspC. Esta região é mais conservada do que as áreas terminais N com hélices alfa em ambas as pro-

teínas, sendo imunogênica no homem<sup>42,84</sup>. A imunização com esta parte rica em prolina ofereceu proteção significativa contra a doença pneumocócica invasiva<sup>27</sup>. As pesquisas reforçam a hipótese de que a PspA age como alvo eficaz do anticorpo protetor, mas ainda não está claro se isto também vale para a PspC. Estes dados talvez expliquem porque a PspC nem sempre é protetora. Pesquisas iniciais, demonstrando proteção significativa, usaram molécula proteica incluindo a repetição da sequência rica em prolina; ensaios usando apenas a região terminal N, sem esta sequência de prolina, não mostraram proteção contra cepas heterólogas<sup>16,34</sup>. O uso desta região preservada, rica em prolina, como antígeno poderá diminuir a apreensão de que alelos múltiplos de PspA tenham que ser usados como antígenos em vacinas.

### **Proteínas necessárias à separação celular B (PcsB)**

A PcsB é proteína de superfície essencial à divisão celular dos pneumococos<sup>40,42</sup>. A presença de sequências de aminoácidos repetidas e conservadas sugere que desempenha algum papel no metabolismo de peptídeoglicanos, mas, apesar de haver dados sugestivos de que há modificações na estrutura da parede celular, a função exata das PcsB ainda não foi estabelecida. O gene codificador da PcsB é parte do genoma central, sendo altamente conservado e expresso em todas as cepas testadas<sup>42</sup>. A imunização de camundongos com PcsB ofereceu proteção significativa contra a doença invasiva e reduziu a carga bacteriana pulmonar<sup>42</sup>. Também reduziu significativamente a carga bacteriana no modelo de pneumonias.

### **Família de proteínas pneumocócicas: a tríade de histidina (Pth)**

Esta família de proteínas é composta de quatro proteínas superficiais dos pneumococos (PhtD, PhtE, PhtB e PhtA) que são imunogênicas no homem<sup>1</sup>. São denominadas de acordo com um padrão de sequências de aminoácidos com seis sequências de tríades de histidina contidas em cada uma delas (HxxHxH)<sup>1</sup>. Sua função ainda não está bem definida, mas a avaliação de seu genoma sugere que desempenham papel na infecção pulmonar e estudos moleculares indicam que podem remover iodo e zinco<sup>46, 103</sup>. Apenas a PhtD está altamente conservada e codificada em todas as cepas de pneumococos, sendo, portanto, a candidata mais provável para vacinas<sup>6,103</sup>. A imunização com PhtD protege contra a exposição letal intraperitoneal e intranasal a múltiplas cepas. Também reduz significativamente a carga bacteriana durante as fases de colonização e pneumonia focal<sup>1, 43</sup>.

### **Proteína serina/treonina quinase P (StkP)**

A StkP é uma proteína da superfície, altamente conservada, expressa por quase todas as cepas de pneumococos testadas, sendo imunogênica no homem<sup>42</sup>. A proteína e sua fosfatase (PhpP) formam um par funcional que participa da fosforilação e desfosforilação de várias proteínas pneumocócicas<sup>87</sup>. As mutações da StkP têm forma alongada com septos menos proeminentes, sugerindo que participa da divisão celular<sup>42</sup>. Outras pesquisas demonstram que a StkP está localizada nos septos e fosforila FtsZ<sup>41</sup>. A imunização com StkP oferece proteção variável contra a septicemia, mas aumenta a sobrevivência significativamente<sup>42</sup>. Também reduz a carga bacteriana pulmonar. Três dias após a exposição, os pneumococos estavam abaixo do limite de detecção em pelo menos 50% dos animais, sendo pelo menos tão eficaz como a PCV-7 neste modelo<sup>42</sup>. No entanto, a imunização com StkP não oferece proteção contra a colonização<sup>80</sup>.



### **Proteínas transportadoras de ATP ABC (cassete de ligação de ATP)**

As proteínas transportadoras pneumocócicas ABC pertencem a uma das famílias protéicas de maior distribuição. Esta família inclui as importadoras e as exportadoras de uma gama ampla de substratos. Na superfície das bactérias Gram-positivas importadoras ABC há uma proteína de ligação associada ao substrato. Várias proteínas pneumocócicas que se ligam ao substrato já foram investigadas como possíveis candidatas a vacinas.

#### **MALX**

MALX é o substrato que se liga ao transportador de maltooligossacarídeos. Esta proteína é expressa por todos os pneumococos e é imunogênica no homem<sup>42</sup>. Um estudo evidenciou que a imunização com MALX não protege contra a doença invasiva<sup>42</sup>, mas outro trabalho demonstrou proteção significativa contra a colonização<sup>80</sup>. Esta proteção é mediada por um mecanismo dependente de CD4+ e IL-17. Embora a vacina ideal proteja contra a colonização e a doença invasiva, a redução da colonização, sem dúvida, reduzirá as taxas de doença pneumocócica e é possível que a MALX seja usada como componente da vacina.

#### **Adesina de superfície pneumocócica A (PsaA)**

Todos os pneumococos codificam a proteína PsaA, altamente conservada, que é a proteína de ligação do substrato ao transportador pneumocócico de manganês<sup>29, 109</sup>. Como sugerido por seu nome, esta proteína provavelmente também desempenha algum papel na aderência bacteriana<sup>7</sup>. A imunização com PsaA oferece proteção significativa contra a colonização<sup>14</sup>, mas as pesquisas sobre proteção contra doença invasiva apresentam resultados diversos<sup>116</sup>. Estes dados podem refletir diferenças na exposição do PsaA na superfície celular das bactérias, devido a diferenças na expressão capsular. A possibilidade de exposição de um alvo na superfície desta bactéria afeta especialmente as proteínas de ligação ao substrato, já que estão localizadas bem próximas à parede celular. Não há ensaios verificando se a imunização com PsaA protege contra a otite média, mas títulos mais elevados de anticorpos contra PsaA em crianças com mais de nove meses de idade estão correlacionados com menor risco de colonização progredindo para a otite média. Porém, os níveis mais elevados de anticorpos contra PsaA em lactentes com idade inferior a seis meses estão associados à maior risco de otite média<sup>98,99</sup>.

Duas proteínas transportadoras de ferro ligadas ao substrato, PiaA e PiuA, também foram consideradas candidatas. Estas proteínas são codificadas por todas as cepas de pneumococos, são muito bem conservadas e imunogênicas no homem<sup>55,124,125</sup>. A imunização com combinação de PiuA e PiaA conferiu proteção significativa contra a exposição a bactérias em modelo de estudo de pneumonias<sup>55</sup>. Brown et al. (2001) demonstraram que a imunização contra estas proteínas pode oferecer proteção significativa contra a infecção sistêmica (PiuA > PiaA)<sup>17</sup>. Porém, outros estudos sugerem que esta proteção pode depender da cepa e que, apesar da alta conservação da sequência, a proteção cruzada não é necessariamente obtida<sup>89</sup>.

#### **Glicosidases**

*S. pneumoniae* é capaz de manipular as estruturas de glicano do hospedeiro através das glicosidases associadas à sua superfície (ver revisão de King 2010<sup>61</sup>). Várias glicosidases foram investigadas como possíveis candidatas. A glicosidase

que recebeu, indevidamente, mais atenção é a neuraminidase *NanA*. Ela cliva o ácido siálico terminal da estrutura de glicano do hospedeiro e acredita-se que desempenha um papel na aderência, competição entre espécies, crescimento e evasão do sistema imunológico<sup>61</sup>. O gene codificador da *NanA* está presente em todos os pneumococos e a proteína é imunogênica no homem<sup>62,135</sup>. A imunização de chinchilas com *NanA* recombinante reduziu a carga bacteriana e o tempo de colonização<sup>121</sup>. A mesma tendência foi observada na otite média, mas a redução não foi significativa<sup>68</sup>. Entretanto, uma diminuição significativa da carga bacteriana foi vista na orelha média, após imunização com *NanA* nativa purificada, mas as proteínas contaminantes podem ter contribuído para esta proteção.

Os estudos em lactentes não demonstraram correlação entre os níveis de anticorpos contra *NanA* e o risco de otite média<sup>113</sup>. Estudando camundongos expostos a uma dose intranasal letal, verificou-se aumento pequeno, mas significativo, no tempo de sobrevivência<sup>67</sup>. Embora o gene que codifica a *NanA* esteja presente em todas as cepas, há regiões com grande variabilidade<sup>62</sup>. Ainda não se sabe se a imunização com um único alelo é capaz de proteger contra todas as cepas pneumocócicas. Também não está claro se o genoma sequenciado da cepa TIGR4 está truncado, resultando na expressão e secreção de uma proteína truncada<sup>120</sup>. Apesar desta alteração não ser observada em outras 100 cepas isoladas de amostras clínicas, não se sabe se esta mutação está presente em outras cepas ou se ela compromete a capacidade da TIGR4 de formar colônias ou causar doenças no homem<sup>62</sup>. Quando a associação à superfície não for necessária, o uso de *NanA* como antígeno na vacina poderá levar a uma pressão de seleção das cepas sem *NanA* na superfície.

### **Vacinas recombinantes com microorganismos vivos atenuados**

Outra abordagem às vacinas proteicas é oferecer as proteínas pneumocócicas expressas de modo recombinante em outras bactérias vivas. Há dois métodos para criar vacinas recombinantes vivas ou atenuadas. Os *Lactococcus lactis* foi modificado para expressar proteínas pneumocócicas e as pesquisas demonstraram que a imunização com esta vacina recombinante pode oferecer proteção significativa contra pneumonia e doença invasiva<sup>78,122</sup>. É importante ressaltar que, apesar da presença de anticorpos contra as proteínas pneumocócicas, eles não responderam aos *Lactococcus lactis*. A segunda estratégia usa salmonelas vivas, atenuadas, para expressar as proteínas pneumocócicas. Uma cepa recombinante não virulenta de *Salmonella enterica* expressando PspA ofereceu proteção significativa a camundongos inoculados com proteína intraperitoneal de cepa homóloga<sup>85</sup>. As pesquisas com estruturas semelhantes também ofereceram proteção significativa contra pneumonia<sup>130</sup>. As cepas de *Salmonella enterica* foram modificadas para que a oferta de antígenos fosse mais eficaz. Estas modificações incluem sua atenuação retardada, permitindo níveis mais elevados de expressão dos antígenos, secreção de proteínas pneumocócicas para maior antigenicidade, síntese retardada de antígenos e geração de mecanismos independentes de antibióticos para a manutenção dos plasmídeos<sup>39, 57,66,123</sup>. Um ensaio clínico de Fase I sobre a segurança e tolerabilidade de salmonelas expressando PspA está em andamento<sup>81</sup>. Vesículas da membrana externa são secretadas pela maioria das bactérias Gram-negativas, inclusive a *Salmonella enterica*. As vesículas de cepas de salmonelas que expressam derivado

periplasmático de PspA contêm esta proteína em sua luz<sup>82</sup>. A inoculação intranasal destas vesículas ofereceu proteção significativa contra a exposição letal a pneumococos. Esta proteção é muito maior do que a obtida com quantidades equivalentes de PspA livre administradas pela mesma via. Estes dados sugerem que as vesículas poderiam ser usadas para a criação de vacina contra os pneumococos.

### **Combinação de proteínas pneumocócicas**

Várias pesquisas demonstram que uma única proteína pneumocócica raramente é tão eficaz como a PCV-7. Vários estudos demonstraram que a combinação de proteínas pneumocócicas aumenta a eficácia das vacinas<sup>14, 17, 88, 89</sup>. Por exemplo, a combinação de toxóide de pneumolisina, PspA e PspC ofereceu proteção significativamente maior à exposição intraperitoneal do que a administração das proteínas isoladamente<sup>89</sup>. Um ensaio recente mostrou aumento significativo da sobrevivência em primatas do gênero macaca imunizados com toxóide de pneumolisina e PhtD, em modelo de pneumonia<sup>28</sup>. Em conjunto, estas **pesquisas sugerem que as vacinas protéicas incluirão várias proteínas**. A incorporação de várias proteínas poderá ajudar a prevenir escapes por diversidade genética das proteínas ou recombinação dos genes com os de estreptococos relacionados. Além disto, **a geração de anticorpos contra várias proteínas pneumocócicas pode inativar muitos fatores de virulência**. A expressão das diferentes proteínas pneumocócicas é variável em diversos hospedeiros e, portanto, **a inclusão de vários antígenos protéicos poderá auxiliar na proteção contra diversos estágios da doença**. Um benefício adicional da inclusão de maior número de antígenos protéicos é a possibilidade de inativação de fatores múltiplos de virulência. **Outro benefício da inclusão de vários antígenos é que poderiam ser selecionados para diferentes mecanismos de proteção, especialmente respostas mediadas por IL-17 ou anticorpos**.

### **Uma nova vacina pneumocócica oferecerá proteção contra a otite média?**

Há evidências sugerindo disfunção imunológica em pacientes com otite média, mas não está claro se a vacina baseada em proteínas pneumocócicas oferecerá proteção a crianças predispostas à doença. Há resultados conflitantes sobre se as crianças predispostas a otites têm títulos mais baixa de anticorpos contra os determinantes de virulência das proteínas e polissacarídeos capsulares após infecção natural<sup>25, 38, 59, 128</sup>. **Assim, é possível que a exposição ao *S. pneumoniae* em crianças predispostas provoque uma resposta imune adaptativa mais fraca**. Alguns estudos demonstram que as respostas adequadas ocorrem nestas crianças predispostas a otites após imunização com vacinas conjugadas. **A hipótese de que a produção de vacinas com cobertura mais ampla possa oferecer proteção a estas crianças parece lógica**<sup>5, 13, 25</sup>.

### **Resumo**

Está claro que novas vacinas são necessárias para prevenir ou reduzir significativamente a otite média causada por pneumococos. **Se for confirmado que cepas de pneumococos que causam otite média são apenas um reflexo daquelas que colonizam a nasofaringe, teremos que prevenir a colonização para evitar o surgimento da otite média**. Inúmeras vias estão sendo exploradas para a próxima geração de vacinas pneumocócicas. Apesar da otite média não ser a doença pneumocócica mais grave, causa grande morbidade e custos elevados em todo

o mundo. Mesmo com o interesse em desenvolver vacinas para proteção contra pneumococos e otite média, há poucas pesquisas avaliando a eficácia de vacinas candidatas em modelos relevantes. Provavelmente isto se deve parcialmente às dificuldades associadas aos modelos animais. Como as PCVs são muito usadas em países desenvolvidos, provavelmente seria mais fácil obter licença para modificações das formulações já existentes. Uma colaboração entre a GlaxoSmithKline e a PATH estuda a eficácia da vacina PCV-10; o conjugado é uma proteína pneumocócica, ainda não revelada<sup>81</sup>. Para estas vacinas, bastaria a demonstrar que sua imunogênese e segurança são equivalentes às já existentes, mas novas vacinas provavelmente requerem demonstração de eficácia em sujeitos já vacinados com PCV. Devido ao número reduzido de casos, seriam necessárias coortes muito grandes e seria difícil demonstrar aumento da eficácia. Portanto, é **provável que a próxima geração de vacinas use polissacarídeos pneumocócicos capsulares conjugados a proteínas de pneumococos**. O uso experimental de modelos de colonização em seres humanos também poderia ser usado para avaliar novas vacinas contra esta colonização, em coortes de tamanho razoável<sup>35</sup>. Ainda não está claro quais proteínas pneumocócicas serão selecionadas e se os modelos observados em roedores serão aplicáveis ao homem. Um dos problemas com muitos destes antígenos protéicos é que podem ser afetados pela colonização com estreptococos relacionados e que esta alteração da flora normal poderia causar efeitos imprevisíveis sobre a saúde humana. Apesar das pesquisas em andamento buscarem aumentar a relação de custo-benefício, disponibilizando estas vacinas a mais países, poderá haver mercado para vacinas mais baratas e mais fáceis de administrar, como as de células inteiras inativadas ou com proteínas antigênicas. Apesar das inúmeras dúvidas e fatores desconhecidos no desenvolvimento de vacinas contra os pneumococos, está claro que ainda há muita pesquisa a ser realizada, antes que possamos reduzir os malefícios da otite média pneumocócica.

### Referências bibliográficas

1. Adamou, J. E., J. H. Heinrichs, A. L. Erwin, W. Walsh, T. Gayle, M. Dormitzer, R. Dagan, Y. A. Brewah, P. Barren, R. Lathigra, S. Langermann, S. Koenig, and S. Johnson. 2001. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. *Infect Immun* 69:949-958.
2. Alexander, J. E., R. A. Lock, C. C. Peeters, J. T. Poolman, P. W. Andrew, T. J. Mitchell, D. Hansman, and J. C. Paton. 1994. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 62:5683-5688.
3. Avery, O. T., and R. Dubos. 1931. The protective action of a specific enzyme against Type III pneumococcus infection in mice. *J Exp Med* 54:73.
4. Balachandran, P., A. Brooks-Walter, A. Virolainen-Julkunen, S. K. Hollingshead, and D. E. Briles. 2002. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 70:2526-2534.

5. Barnett, E. D., S. I. Pelton, H. J. Cabral, R. D. Eavey, C. Allen, M. J. Cunningham, E. R. McNamara, and J. O. Klein. 1999. Immune response to pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines in otitis-prone and otitis-free children. *Clin Infect Dis* 29:191-192.
6. Beghetto, E., N. Gargano, S. Ricci, G. Garufi, S. Peppoloni, F. Montagnani, M. Oggioni, G. Pozzi, and F. Felici. 2006. Discovery of novel *Streptococcus pneumoniae* antigens by screening a whole-genome lambda-display library. *FEMS Microbiol Lett* 262:14-21.
7. Berry, A. M., and J. C. Paton. 1996. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64:5255-5262.
8. Black, S., H. Shinefield, B. Fireman, E. Lewis, P. Ray, J. R. Hansen, L. Elvin, K. M. Ensor, J. Hackell, G. Siber, F. Malinoski, D. Madore, I. Chang, R. Kohberger, W. Watson, R. Austrian, and K. Edwards. 2000. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 19:187-195.
9. Block, S. L., J. Hedrick, C. J. Harrison, R. Tyler, A. Smith, R. Findlay, and E. Keegan. 2004. Community-wide vaccination with the heptavalent pneumococcal conjugate significantly alters the microbiology of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 23:829-833.
10. Bluestone, C. D. 2000. Clinical course, complications and sequelae of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 19:S37-46.
11. Bondy, J., S. Berman, J. Glazner, and D. Lezotte. 2000. Direct expenditures related to otitis media diagnoses: extrapolations from a pediatric medicaid cohort. *Pediatrics* 105:E72.
12. Boulnois, G. J., J. C. Paton, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew. 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5:2611-2616.
13. Breukels, M. A., G. T. Rijkers, M. M. Voorhorst-Ogink, B. J. Zegers, and L. A. Sanders. 1999. Pneumococcal conjugate vaccine primes for polysaccharide-inducible IgG2 antibody response in children with recurrent otitis media acuta. *J Infect Dis* 179:1152-1156.
14. Briles, D. E., E. Ades, J. C. Paton, J. S. Sampson, G. M. Carlone, R. C. Huebner, A. Virolainen, E. Swiatlo, and S. K. Hollingshead. 2000. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68:796-800.
15. Briles, D. E., S. K. Hollingshead, J. King, A. Swift, P. A. Braun, M. K. Park, L. M. Ferguson, M. H. Nahm, and G. S. Nabors. 2000. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis* 182:1694-1701.

16. Brooks-Walter, A., D. E. Briles, and S. K. Hollingshead. 1999. The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 67:6533-6542.
17. Brown, J. S., A. D. Ogunniyi, M. C. Woodrow, D. W. Holden, and J. C. Paton. 2001. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 69:6702-6706.
18. Bull, C. G., and C. M. McKee. 1929. Respiratory immunity in rabbits. VII. Resistance to intranasal infection in the absences of demonstratable antibodies. *American Journal of Hygiene* 9:490-499.
19. Butler, J. C., R. F. Breiman, H. B. Lipman, J. Hofmann, and R. R. Facklam. 1995. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. *J Infect Dis* 171:885-889.
20. Calix, J. J., and M. H. Nahm. 2010. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis* 202:29-38.
21. Casey, J. R., D. G. Adlowitz, and M. E. Pichichero. 2010. New patterns in the otopathogens causing acute otitis media six to eight years after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 29:304-309.
22. Casey, J. R., and M. E. Pichichero. 2004. Changes in frequency and pathogens causing acute otitis media in 1995-2003. *Pediatr Infect Dis J* 23:824-828.
23. Cherry, D. K., D. A. Woodwell, and M. S. Rechtsteiner. 2007. National Ambulatory Medical Care Survey: 2005 Summary. Advance data from vital and health statistics. National Center for Health Statistics.
24. Cooper, D., X. Yu, M. Sidhu, M. H. Nahm, P. Fernsten, and K. U. Jansen. 2011. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-13) elicits cross-functional opsonophagocytic killing responses in humans to *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 7A. *Vaccine*.
25. Corscadden, K., L. A. Kirkham, E. Mowe, S. Vijayasekaran, H. Coates, P. Richmond, and S. Wiertsema. 2011. Presented at the 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, New Orleans, U.S.
26. Cripps, A. W., and J. M. Kyd. 2007. Comparison of mucosal and parenteral immunisation in two animal models of pneumococcal infection: otitis media and acute pneumonia. *Vaccine* 25:2471-2477.
27. Daniels, C. C., P. Coan, J. King, J. Hale, K. A. Benton, D. E. Briles, and S. K. Hollingshead. 2010. The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. *Infect Immun* 78:2163-2172.
28. Denoel, P., M. T. Philipp, L. Doyle, D. Martin, G. Carletti, and J. T. Poolman. 2011. A protein-based pneumococcal vaccine protects rhesus macaques from pneumonia after experimental infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 29:5495-5501.

29. Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel, and J. P. Claverys. 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* 25:727-739.
30. Douglas, R. M., and H. B. Miles. 1984. Vaccination against *Streptococcus pneumoniae* in childhood: lack of demonstrable benefit in young Australian children. *J Infect Dis* 149:861-869.
31. Douglas, R. M., J. C. Paton, S. J. Duncan, and D. J. Hansman. 1983. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis* 148:131-137.
32. Eskola, J., T. Kilpi, A. Palmu, J. Jokinen, J. Haapakoski, E. Herva, A. Takala, H. Kayhty, P. Karma, R. Kohberger, G. Siber, and P. H. Makela. 2001. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 344:403-409.
33. Esposito, S., S. Tansey, A. Thompson, A. Razmpour, J. Liang, T. R. Jones, G. Ferrera, A. Maida, G. Bona, C. Sabatini, L. Pagni, E. A. Emini, W. C. Gruber, D. A. Scott, and N. Principi. 2010. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to those of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine given as a three-dose series with routine vaccines in healthy infants and toddlers. *Clin Vaccine Immunol* 17:1017-1026.
34. Ferreira, D. M., M. Darrieux, D. A. Silva, L. C. Leite, J. M. Ferreira, Jr., P. L. Ho, E. N. Miyaji, and M. L. Oliveira. 2009. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. *Clin Vaccine Immunol* 16:636-45.
35. Ferreira, D. M., K. C. Jambo, and S. B. Gordon. 2011. Experimental human pneumococcal carriage models for vaccine research. *Trends Microbiol*.
36. Finkelstein, J. A., J. P. Metlay, R. L. Davis, S. L. Rifas-Shiman, S. F. Dowell, and R. Platt. 2000. Antimicrobial use in defined populations of infants and young children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154:395-400.
37. Fireman, B., S. B. Black, H. R. Shinefield, J. Lee, E. Lewis, and P. Ray. 2003. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 22:10-16.
38. Freijd, A., L. Hammarstrom, M. A. Persson, and C. I. Smith. 1984. Plasma anti-pneumococcal antibody activity of the IgG class and subclasses in otitis prone children. *Clin Exp Immunol* 56:233-238.
39. Galan, J. E., K. Nakayama, and R. Curtiss, 3rd. 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* 94:29-35.
40. Giefing-Kroll, C., K. E. Jelencsics, S. Reipert, and E. Nagy. 2011. Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain-containing proteins. *Microbiology* 157:1897-909.
41. Giefing, C., K. E. Jelencsics, D. Gelbmann, B. M. Senn, and E. Nagy. 2010. The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP

- co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ in vitro. *Microbiology* 156:1697-1707.
42. Giefing, C., A. L. Meinke, M. Hanner, T. Henics, D. Bui Minh, D. Gelbmann, U. Lunderberg, B. Henriques Normark, A. Ortqvist, M. Kalin, A. von Gabain, and E. Nagy. 2008. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* 205:117-131.
  43. Godfroid, F., P. Hermand, V. Verlant, P. Denoel, and J. T. Poolman. 2011. Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens. *Infect Immun* 79:238-245.
  44. Grijalva, C. G., K. A. Poehling, J. P. Nuorti, Y. Zhu, S. W. Martin, K. M. Edwards, and M. R. Griffin. 2006. National impact of universal childhood immunization with pneumococcal conjugate vaccine on outpatient medical care visits in the United States. *Pediatrics* 118:865-873.
  45. Hanage, W. P., T. H. Kaijalainen, R. K. Syrjanen, K. Auranen, M. Leinonen, P. H. Makela, and B. G. Spratt. 2005. Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland. *Infect Immun* 73:431-435.
  46. Hava, D. L., and A. Camilli. 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 45:1389-1406.
  47. Hogenesch, H., A. Dunham, B. Hansen, K. Anderson, J. F. Maisonneuve, and S. L. Hem. 2011. Formulation of a killed whole cell pneumococcus vaccine - Effect of aluminum adjuvants on the antibody and IL-17 response. *J Immune Based Ther Vaccines* 9:5.
  48. Hollingshead, S. K., R. Becker, and D. E. Briles. 2000. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68:5889-5900.
  49. Holmlund, E., B. Quiambao, J. Ollgren, H. Nohynek, and H. Kayhty. 2006. Development of natural antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A and pneumolysin in Filipino pregnant women and their infants in relation to pneumococcal carriage. *Vaccine* 24:57-65.
  50. Iannelli, F., D. Chiavolini, S. Ricci, M. R. Oggioni, and G. Pozzi. 2004. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun* 72:3077-3080.
  51. Iannelli, F., M. R. Oggioni, and G. Pozzi. 2002. Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 284:63-71.
  52. Janulczyk, R., F. Iannelli, A. G. Sjolholm, G. Pozzi, and L. Bjorck. 2000. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem* 275:37257-37263.
  53. 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. 2010. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Med* 7.



54. Johnston, C., J. Hinds, A. Smith, M. van der Linden, J. Van Eldere, and T. J. Mitchell. 2010. Detection of large numbers of pneumococcal virulence genes in streptococci of the mitis group. *J Clin Microbiol* 48:2762-9.
55. Jomaa, M., S. Terry, C. Hale, C. Jones, G. Dougan, and J. Brown. 2006. Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 24:5133-5139.
56. Kanclerski, K., and R. Mollby. 1987. Production and purification of *Streptococcus pneumoniae* hemolysin (pneumolysin). *J Clin Microbiol* 25:222-225.
57. Kang, H. Y., and R. Curtiss, 3rd. 2003. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37:99-104.
58. Karma, P., J. Pukander, M. Sipila, M. Timonen, S. Pontynen, E. Herva, P. Gronroos, and H. Makela. 1985. Prevention of otitis media in children by pneumococcal vaccination. *Am J Otolaryngol* 6:173-184.
59. Kaur, R., J. R. Casey, and M. E. Pichichero. 2011. Serum Antibody Response to Five *Streptococcus pneumoniae* Proteins During Acute Otitis Media in Otitis-prone and Non-otitis-prone Children. *Pediatr Infect Dis J* 30:645-650.
60. Kieninger, D. M., K. Kueper, K. Steul, C. Juergens, N. Ahlers, S. Baker, K. U. Jansen, C. Devlin, W. C. Gruber, E. A. Emini, and D. A. Scott. 2010. Safety, tolerability, and immunologic noninferiority of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine given with routine pediatric vaccinations in Germany. *Vaccine* 28:4192-4203.
61. King, S. J. 2010. Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol Oral Microbiol* 25:15-24.
62. King, S. J., A. M. Whatmore, and C. G. Dowson. 2005. NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J Bacteriol* 187:5376-5386.
63. Klein, J. O. 1994. Otitis media. *Clin Infect Dis* 19:823-833.
64. Koskela, M., M. Leinonen, V. M. Haiva, M. Timonen, and P. H. Makela. 1986. First and second dose antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis* 5:45-50.
65. Lewis, D. J., Z. Huo, S. Barnett, I. Kromann, R. Giemza, E. Galiza, M. Woodrow, B. Thierry-Carstensen, P. Andersen, D. Novicki, G. Del Giudice, and R. Rappuoli. 2009. Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin. *PLoS ONE* 4:e6999.
66. Li, Y., S. Wang, G. Scarpellini, B. Gunn, W. Xin, S. Y. Wanda, K. L. Roland, and R. Curtiss, 3rd. 2009. Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:593-598.
67. Lock, R. A., J. C. Paton, and D. Hansman. 1988. Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 5:461-467.

68. Long, J. P., H. H. Tong, and T. F. DeMaria. 2004. Immunization with native or recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase affords protection in the chinchilla otitis media model. *Infect Immun* 72:4309-4313.
69. Lu, Y. J., J. Gross, D. Bogaert, A. Finn, L. Bagrade, Q. Zhang, J. K. Kolls, A. Srivastava, A. Lundgren, S. Forte, C. M. Thompson, K. F. Harney, P. W. Anderson, M. Lipsitch, and R. Malley. 2008. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog* 4:e1000159.
70. Lu, Y. J., L. Leite, V. M. Goncalves, O. Dias Wde, C. Liberman, F. Fratelli, M. Alderson, A. Tate, J. F. Maisonneuve, G. Robertson, R. Graca, S. Sayeed, C. M. Thompson, P. Anderson, and R. Malley. 2010. GMP-grade pneumococcal whole-cell vaccine injected subcutaneously protects mice from nasopharyngeal colonization and fatal aspiration-sepsis. *Vaccine* 28:7468-7475.
71. Lu, Y. J., P. Yadav, J. D. Clements, S. Forte, A. Srivastava, C. M. Thompson, R. Seid, J. Look, M. Alderson, A. Tate, J. F. Maisonneuve, G. Robertson, P. W. Anderson, and R. Malley. 2010. Options for inactivation, adjuvant, and route of topical administration of a killed, unencapsulated pneumococcal whole-cell vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 17:1005-1012.
72. MacLeod, C. M., and R. G. Hodges. 1945. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med* 82:445-465.
73. Malley, R., M. Lipsitch, A. Stack, R. Saladino, G. Fleisher, S. Pelton, C. Thompson, D. Briles, and P. Anderson. 2001. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infect Immun* 69:4870-4873.
74. Malley, R., S. C. Morse, L. C. Leite, A. P. Areas, P. L. Ho, F. S. Kubrusly, I. C. Almeida, and P. Anderson. 2004. Multiserotype protection of mice against pneumococcal colonization of the nasopharynx and middle ear by killed nonencapsulated cells given intranasally with a nontoxic adjuvant. *Infect Immun* 72:4290-4292.
75. Malley, R., K. Trzcinski, A. Srivastava, C. M. Thompson, P. W. Anderson, and M. Lipsitch. 2005. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4848-4853.
76. Maruyama, T., O. Taguchi, M. S. Niederman, J. Morser, H. Kobayashi, T. Kobayashi, C. D'Alessandro-Gabazza, S. Nakayama, K. Nishikubo, T. Noguchi, Y. Takei, and E. C. Gabazza. 2010. Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents: double blind, randomised and placebo controlled trial. *BMJ* 340:c1004.
77. McEllistrem, M. C., J. M. Adams, K. Patel, A. B. Mendelsohn, S. L. Kaplan, J. S. Bradley, G. E. Schutze, K. S. Kim, E. O. Mason, and E. R. Wald. 2005. Acute otitis media due to penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 40:1738-1744.
78. Medina, M., J. Villena, E. Vintini, E. M. Hebert, R. Raya, and S. Alvarez. 2008. Nasal immunization with *Lactococcus lactis* expressing the pneumococcal

- protective protein A induces protective immunity in mice. *Infect Immun* 76:2696-2705.
79. Mitchell, T. J., P. W. Andrew, F. K. Saunders, A. N. Smith, and G. J. Boulnois. 1991. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol Microbiol* 5:1883-1888.
  80. Moffitt, K. L., T. M. Gierahn, Y. J. Lu, P. Gouveia, M. Alderson, J. B. Flechtner, D. E. Higgins, and R. Malley. 2011. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microbe* 9:158-165.
  81. Moffitt, K. L., and R. Malley. 2011. Next generation pneumococcal vaccines. *Curr Opin Immunol* 23:407-413.
  82. Muralinath, M., M. J. Kuehn, K. L. Roland, and R. Curtiss, 3rd. 2011. Immunization with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*-derived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 79:887-894.
  83. Musher, D. M., H. M. Phan, and R. E. Baughn. 2001. Protection against bacteremic pneumococcal infection by antibody to pneumolysin. *J Infect Dis* 183:827-830.
  84. Nabors, G. S., P. A. Braun, D. J. Herrmann, M. L. Heise, D. J. Pyle, S. Gravenstein, M. Schilling, L. M. Ferguson, S. K. Hollingshead, D. E. Briles, and R. S. Becker. 2000. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine* 18:1743-1754.
  85. Nayak, A. R., S. A. Tinge, R. C. Tart, L. S. McDaniel, D. E. Briles, and R. Curtiss, 3rd. 1998. A live recombinant avirulent oral *Salmonella* vaccine expressing pneumococcal surface protein A induces protective responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 66:3744-3751.
  86. Nelson, A. L., A. M. Roche, J. M. Gould, K. Chim, A. J. Ratner, and J. N. Weiser. 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* 75:83-90.
  87. Novakova, L., S. Bezouskova, P. Pompach, P. Spidlova, L. Saskova, J. Weiser, and P. Branny. 2010. Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 192:3629-3638.
  88. Ogunniyi, A. D., R. L. Folland, D. E. Briles, S. K. Hollingshead, and J. C. Paton. 2000. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68:3028-3033.
  89. Ogunniyi, A. D., M. Grabowicz, D. E. Briles, J. Cook, and J. C. Paton. 2007. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 75:350-357.
  90. Ortqvist, A., J. Hedlund, L. A. Burman, E. Elbel, M. Hofer, M. Leinonen, I. Lindblad, B. Sundelof, and M. Kalin. 1998. Randomised trial of 23-valent

- pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in prevention of pneumonia in middle-aged and elderly people. Swedish Pneumococcal Vaccination Study Group. *Lancet* 351:399-403.
91. Paton, J. C., B. Rowan-Kelly, and A. Ferrante. 1984. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 43:1085-1087.
  92. Paton, J. C., I. R. Toogood, R. A. Cockington, and D. Hansman. 1986. Antibody response to pneumococcal vaccine in children aged 5 to 15 years. *Am J Dis Child* 140:135-138.
  93. Poehling, K. A., P. G. Szilagyi, C. G. Grijalva, S. W. Martin, B. LaFleur, E. Mitchel, R. D. Barth, J. P. Nuorti, and M. R. Griffin. 2007. Reduction of frequent otitis media and pressure-equalizing tube insertions in children after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 119:707-715.
  94. Price, K. E., and A. Camilli. 2009. Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 191:2163-8.
  95. Prymula, R., P. Peeters, V. Chrobok, P. Kriz, E. Novakova, E. Kaliskova, I. Kohl, P. Lommel, J. Poolman, J. P. Prieels, and L. Schuerman. 2006. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and nontypable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet* 367:740-748.
  96. Prymula, R., and L. Schuerman. 2009. 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix. *Expert Rev Vaccines* 8:1479-1500.
  97. Rahav, G., Y. Toledano, D. Engelhard, A. Simhon, A. E. Moses, T. Sacks, and M. Shapiro. 1997. Invasive pneumococcal infections. A comparison between adults and children. *Medicine (Baltimore)* 76:295-303.
  98. Rapola, S., V. Jantti, M. Eerola, P. H. Makela, H. Kayhty, and T. Kilpi. 2003. Anti-PsaA and the risk of pneumococcal AOM and carriage. *Vaccine* 21:3608-3613.
  99. Rapola, S., T. Kilpi, M. Lahdenkari, A. K. Takala, P. H. Makela, and H. Kayhty. 2001. Do antibodies to pneumococcal surface adhesin prevent pneumococcal involvement in acute otitis media? *J Infect Dis* 184:577-581.
  100. Rayner, C. F., A. D. Jackson, A. Rutman, A. Dewar, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, P. J. Cole, and R. Wilson. 1995. Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun* 63:442-447.
  101. Ren, B., M. A. McCrory, C. Pass, D. C. Bullard, C. M. Ballantyne, Y. Xu, D. E. Briles, and A. J. Szalai. 2004. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol* 173:7506-7512.
  102. Ren, B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead, and D. E. Briles. 2004. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun* 72:114-122.

103. Rioux, S., C. Neyt, E. Di Paolo, L. Turpin, N. Charland, S. Labbe, M. C. Mortier, T. J. Mitchell, C. Feron, D. Martin, and J. T. Poolman. 2011. Transcriptional regulation, occurrence and putative role of the Pht family of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 157:336-348.
104. Robbins, J. B., R. Austrian, C. J. Lee, S. C. Rastogi, G. Schiffman, J. Henrichsen, P. H. Makela, C. V. Broome, R. R. Facklam, R. H. Tiesjema, and et al. 1983. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 148:1136-1159.
105. Robinson, K. A., W. Baughman, G. Rothrock, N. L. Barrett, M. Pass, C. Lexau, B. Damaske, K. Stefonek, B. Barnes, J. Patterson, E. R. Zell, A. Schuchat, C. G. Whitney, and N. Active Bacterial Core Surveillance / Emerging Infections Program. 2001. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 285:1729-35.
106. Roche, A. M., S. J. King, and J. N. Weiser. 2007. Live attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains induce serotype-independent mucosal and systemic protection in mice. *Infect Immun* 75:2469-2475.
107. Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, and H. R. Masure. 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 25:819-829.
108. Rubin, J. L., L. J. McGarry, D. R. Strutton, K. P. Klugman, S. I. Pelton, K. E. Gilmore, and M. C. Weinstein. 2010. Public health and economic impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in the United States. *Vaccine* 28:7634-7643.
109. Sampson, J. S., Z. Furlow, A. M. Whitney, D. Williams, R. Facklam, and G. M. Carlone. 1997. Limited diversity of *Streptococcus pneumoniae* psaA among pneumococcal vaccine serotypes. *Infect Immun* 65:1967-1971.
110. Shaper, M., S. K. Hollingshead, W. H. Benjamin, Jr., and D. E. Briles. 2004. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun* 72:5031-5040.
111. Shapiro, E. D., A. T. Berg, R. Austrian, D. Schroeder, V. Parcells, A. Margolis, R. K. Adair, and J. D. Clemens. 1991. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 325:1453-1460.
112. Simberkoff, M. S., A. P. Cross, M. Al-Ibrahim, A. L. Baltch, P. J. Geiseler, J. Nadler, A. S. Richmond, R. P. Smith, G. Schiffman, D. S. Shepard, and et al. 1986. Efficacy of pneumococcal vaccine in high-risk patients. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 315:1318-1327.
113. Simell, B., T. Jaakkola, M. Lahdenkari, D. Briles, S. Hollingshead, T. M. Kilpi, and H. Kayhty. 2006. Serum antibodies to pneumococcal neuraminidase NanA in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. *Clin Vaccine Immunol* 13:1177-9.

114. Sims, R. V., W. C. Steinmann, J. H. McConville, L. R. King, W. C. Zwick, and J. S. Schwartz. 1988. The clinical effectiveness of pneumococcal vaccine in the elderly. *Ann Intern Med* 108:653-657.
115. Steinfort, C., R. Wilson, T. Mitchell, C. Feldman, A. Rutman, H. Todd, D. Sykes, J. Walker, K. Saunders, P. W. Andrew, G. J. Boulnois, and P. J. Cole. 1989. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium *in vitro*. *Infect Immun* 57:2006-2013.
116. Tai, S. S. 2006. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit Rev Microbiol* 32:139-153.
117. Tart, R. C., L. S. McDaniel, B. A. Ralph, and D. E. Briles. 1996. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J Infect Dis* 173:380-386.
118. Teele, D. W., J. O. Klein, L. Bratton, G. R. Fisch, O. R. Mathieu, P. J. Porter, S. G. Starobin, L. D. Tarlin, and R. P. Younes. 1981. Use of pneumococcal vaccine for prevention of recurrent acute otitis media in infants in Boston. The Greater Boston Collaborative Otitis Media Study Group. *Rev Infect Dis* 3 Suppl:S113-118.
119. Teele, D. W., J. O. Klein, C. Chase, P. Menyuk, and B. A. Rosner. 1990. Otitis media in infancy and intellectual ability, school achievement, speech, and language at age 7 years. Greater Boston Otitis Media Study Group. *J Infect Dis* 162:685-694.
120. 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. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498-506.
121. Tong, H. H., D. Li, S. Chen, J. P. Long, and T. F. DeMaria. 2005. Immunization with recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase NanA protects chinchillas against nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 73:7775-7778.
122. Villena, J., M. Medina, R. Raya, and S. Alvarez. 2008. Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* confers protection against respiratory pneumococcal infection. *Can J Microbiol* 54:845-853.
123. Wang, S., Y. Li, H. Shi, W. Sun, K. L. Roland, and R. Curtiss, 3rd. 2011. Comparison of a regulated delayed antigen synthesis system with *in vivo*-inducible promoters for antigen delivery by live attenuated *Salmonella* vaccines. *Infect Immun* 79:937-949.
124. Whalan, R. H., S. G. Funnell, L. D. Bowler, M. J. Hudson, A. Robinson, and C. G. Dowson. 2006. Distribution and genetic diversity of the ABC

- transporter lipoproteins PiuA and PiaA within *Streptococcus pneumoniae* and related streptococci. *J Bacteriol* 188:1031-1038.
125. Whalan, R. H., S. G. Funnell, L. D. Bowler, M. J. Hudson, A. Robinson, and C. G. Dowson. 2005. PiuA and PiaA, iron uptake lipoproteins of *Streptococcus pneumoniae*, elicit serotype independent antibody responses following human pneumococcal septicaemia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43:73-80.
  126. White, P., A. Hermansson, C. Svanborg, D. Briles, and K. Prellner. 1999. Effects of active immunization with a pneumococcal surface protein (PspA) and of locally applied antibodies in experimental otitis media. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 61:206-211.
  127. Whitney, C. G., M. M. Farley, J. Hadler, L. H. Harrison, N. M. Bennett, R. Lynfield, A. Reingold, P. R. Cieslak, T. Pilishvili, D. Jackson, R. R. Facklam, J. H. Jorgensen, and A. Schuchat. 2003. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 348:1737-1746.
  128. Wiertsema, S., K. Corscadden, L. A. Kirkham, E. Mowe, S. Vijayasekaran, H. Coates, T. Mitchell, W. Thomas, and P. Richmond. 2001. Serum IgG levels to pneumococcal and H. influenzae vaccine candidate protein antigens are not impaired in children with RAOM, 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, New Orleans, U.S.
  129. Wu, H. Y., M. H. Nahm, Y. Guo, M. W. Russell, and D. E. Briles. 1997. Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 175:839-846.
  130. Xin, W., Y. Li, H. Mo, K. L. Roland, and R. Curtiss, 3rd. 2009. PspA family fusion proteins delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium extend and enhance protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 77:4518-4528.
  131. Yuste, J., S. Khandavilli, N. Ansari, K. Muttardi, L. Ismail, C. Hyams, J. Weiser, T. Mitchell, and J. S. Brown. 2010. The effects of PspC on complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae* vary with strain background and capsular serotype. *Infect Immun* 78:283-292.
  132. Zhang, J. R., K. E. Mostov, M. E. Lamm, M. Nanno, S. Shimida, M. Ohwaki, and E. Tuomanen. 2000. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102:827-837.
  133. Zumach, A., M. N. Chenault, L. J. Anteunis, and E. Gerrits. 2011. Speech perception after early-life otitis media with fluctuating hearing loss. *Audiol Neurootol* 16:304-314.
  134. Zumach, A., E. Gerrits, M. Chenault, and L. Anteunis. 2010. Long-term effects of early-life otitis media on language development. *J Speech Lang Hear Res* 53:34-43.
  135. Zysk, G., R. J. Bongaerts, E. ten Thoren, G. Bethe, R. Hakenbeck, and H. P. Heinz. 2000. Detection of 23 immunogenic pneumococcal proteins using convalescent-phase serum. *Infect. Immun.* 68:3740-3743.