

Comunicación breve

Distribución de serotipos de aislamientos invasivos de *Streptococcus pneumoniae* e identificación molecular de familias de proteínas de superficie (Psp A) para el desarrollo de una futura vacuna regional

RECIBIDO: 1/6/07

ACEPTADO: 13/9/07

Mayoral, C.^{1*} • Della Bianca, M.¹ • Baroni, M.R.¹ • Giani, R.¹ • Noroña, M.¹ • Regueira, M.² • Zalazar, F.¹

1. Laboratorio de Práctica Profesional, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas., Universidad Nacional del Litoral, Hospital "Dr. J.M. Cullen". Av. Freyre 2150, (S3000EOZ) Santa Fe, Argentina TE: 0342-4571170; 2 División Bacteriología. INEI. "Dr Carlos Malbrán", Velez Sarfield 563, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia: E-mail: cmayoral@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: La resistencia antimicrobiana del *Streptococcus pneumoniae* y su morbi-mortalidad, enfatizan la necesidad de vacunas antineumocócicas. Entre sus proteínas de superficie, las familias PspA están presentes en todos los serotipos y son altamente inmunogénicas. Existen 3 familias de PspA, capaces de generar anticuerpos con reacción cruzada entre ellas, generando una protección específica, lo que las convierte en candidatas ideales para una vacuna. Sin embargo, el desarrollo efectivo de una futura vacuna requiere más información acerca de la/s familia/s contenida/s en los aislamientos neumocócicos de las regiones donde va a ser utilizada. Nuestro objetivo fue estudiar los serotipos prevalentes e identificar molecularmente en aislamientos invasivos provenientes de niños de Santa Fe las familias de PsPA presentes en ellos. El

serotipo 14 fue predominante, seguido del 1, 6B, 18C, 7F, 19 F, 5. En éstos un 59,5% y un 16,5% fueron identificados como familias 1 y 2, respectivamente.

PALABRAS CLAVE: *Streptococcus pneumoniae*, distribución de serotipos, familias de PspA, vacunas conjugadas.

SUMMARY: Serotype distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates and molecular typing of pneumococcal surface protein A (PspA) families: towards a future regional vaccine.

Pneumococcal vaccines are being needed due to the increasing frequency of antimicrobial resistant by pneumococcal strains and its morbidity and mortality. PspA is a strongly immunogenic surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that elicits a serotype-independent protective immunity. So, it has been considered a

potential candidate for human vaccines. PspA can be divided into three families arising a family-specific protection. Effective development of a vaccine based on PspA requires more information about the PspA family of pneumococcal isolates in those regions where the vaccine will be used. Our objectives were to study the prevalence of serotypes in 101 pneumococcal invasive isolates from children of Santa Fe and to identify by PCR the distribution of PspA

families among these isolates to obtain useful information for a regional potential vaccine. Serotype 14 had the most frequency followed by 1, 6B, 18C, 7F, 19 F, 5. Pneumococcal isolates were classified as PspA family 1 (59,5 %) and family 2 (16,5 %), whereas 24 % of the isolates could not be typed.

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae*, distribución of serotypes, families of PspA, conjugated vaccines

Introducción

Streptococcus pneumoniae (Spn) posee un alto índice de morbi-mortalidad en niños y adultos en todo el mundo. Aproximadamente un millón de niños mueren anualmente por neumonías atribuibles a Spn (1). La mayoría de estas muertes ocurren en niños menores de un año de edad que viven en países en desarrollo (2,3)

La necesidad de contar con vacunas antineumocócicas ha sido enfatizada en las últimas décadas por el rápido aumento en el nivel de resistencia de los aislamientos de Spn, con múltiple-resistencia a los antibióticos (4). Lo ideal sería que estas vacunas pudieran proteger contra neumonía, meningitis, bacteriemia y otitis media en los niños más pequeños (5)

Debido a la alta tasa de colonización nasofaríngea del Spn, particularmente en niños, al método de transmisión (gotillas respiratorias), y también a que la colonización generalmente precede la infección, las vacunas óptimas serían aquellas que eviten la portación así como la enfermedad invasiva.

Las primeras vacunas antineumocócicas, hechas con polisacáridos, tenían la limitación de que no eran protectoras en los niños menores de 2 años, que es el grupo

con la mayor incidencia de enfermedades invasivas, en parte debido a que generan una respuesta independiente de linfocitos T.

Desde hace varios años, existen vacunas formuladas con polisacáridos conjugados a proteínas no neumocócicas –la 7-valente (6) y la 9-valente– que protegen, tanto a los adultos como a los niños menores de 2 años y a los inmunodeprimidos, contra las infecciones invasivas neumocócicas. La primera, contra aquellas causadas por los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, con una eficacia del 58 al 93 % según la región geográfica de la población en estudio (7, 8, 9) y la segunda, también protege contra los serotipos mencionados, más los 1 y 5, logrando, en muchos países, una mayor protección que la primera. Más tarde, la industria de laboratorios medicinales se abocó a la producción de otra vacuna conjugada (11-valente) que aún no fue licenciada, que agrega los serotipos 3 y 7F a la 9-valente (10).

Con la introducción de la vacuna 7-valente, se observó, en muchos países, una disminución significativa del número de infecciones invasivas neumocócicas causadas por los serotipos contenidos en la misma, entre niños menores o igual a 24 meses de edad (11). Pero el alto costo limita su uso,

especialmente en aquellos países donde el índice de morbimortalidad es muy alto (12). Además, como existen 90 serotipos y éstos varían sustancialmente con la región geográfica del mundo, las vacunas óptimas tendrían que tener diferentes formulaciones acordes a los serotipos prevalentes de cada región.

Por otra parte, se comenzó a evaluar la posibilidad del uso de proteínas de superficie del Spn como componentes de vacunas, al tener las ventajas de ser fuertemente inmunogénicas (tanto en adultos como en niños), de inducir protección contra bacteriemia neumocócica y ser comunes a todos los serotipos, proveyendo así una protección menos costosa e independiente del serotipo (13-15). Entre ellas, ha adquirido interés PspA la cual, a pesar de presentar en su estructura una quinta parte de su molécula altamente variable (16) —lo que le confiere una marcada heterogeneidad cuando es analizada por anticuerpos monoclonales (17, 18)— genera anticuerpos que presentan reacción cruzada contra diferentes serotipos de Spn, convirtiéndose en un candidato ideal para el desarrollo de vacunas (15, 19, 20). La producción de estos anticuerpos anti-PspA, se observó tanto en humanos como en ratones (21, 22).

Existen 3 familias de PspA (familias 1, 2 y 3), con algunos dominios protéicos compartidos y otros diferentes (13, 16), divididas en *clades*, en base a las diferencias de las secuencias aminoacídicas. La familia 1 está compuesta de clades 1 y 2. La familia 2, de los clades 3, 4, y 5. Teniendo en cuenta esta diversidad y dado que, a fin de minimizar el costo de una vacuna, sería conveniente restringir el número de Antígenos incluidos en ella a aquellos determinantes más relevantes, el desarrollo efectivo de una vacuna conteniendo antígenos de PspA requiere más in-

formación acerca de las familias presentes en los aislamientos neumocócicos de las regiones donde la vacuna va a ser utilizada. En relación a esto, a excepción del trabajo de Mollerach y col. (23), realizado con aislamientos obtenidos en el período 1993-2000, no se han reportado en nuestro país comunicaciones sobre la identificación de estas familias, siendo la mayoría realizadas sobre serotipos frecuentes en otros países (24-29).

Considerando estos antecedentes, nuestro objetivo es estudiar la prevalencia de serotipos de Spn en aislamientos provenientes de niños internados por neumonía, meningitis y peritonitis e identificar las familias de PspA correspondientes a ellos, usando técnicas moleculares para obtener información útil para el desarrollo de una vacuna regional efectiva conteniendo determinantes antigénicos de PspA.

Materiales y Métodos

Muestras: Se obtuvieron 101 aislamientos de Spn, durante el período 2001 a 2006, provenientes de pacientes pediátricos menores de 5 años de edad, internados en el Hospital "Dr Orlando Alassia" (Santa Fe, Argentina) por: neumonía (n=75), meningitis (n=24) y peritonitis espontánea (n=2). Estos niños pertenecían a la ciudad de Santa Fe y zona de incumbencia.

Serotipificación: La serotipificación se realizó con la tradicional Técnica de Quellung, usando el esquema de Skov Sorensen (30).

Identificación molecular de familias de PspA: La identificación de las familias de PspA se realizó aplicando PCR con primers específicos de secuencia, en 42 de los 101 aislamientos.

Extracción de ADN bacteriano

Entre 5 y 10 colonias, a partir de cultivos de 18hs de *S. pneumoniae*, fueron resus-

pendidas en 100 µl de HCl-Tris buffer 0.1M, pH 8,0 y sometidas a ebullición durante 10 min. Luego de centrifugar 2 min a 10.000 g para eliminar restos celulares, se recuperó el sobrenadante conteniendo el ADN y se conservó a -20°C hasta su análisis (31).

Oligonucleótidos

Para la detección de la familia 1:

LSM12 (5' CCGGATCCAGCGTCGCTAT CTTAGGGGCTGGTT3') (16) y

SKH63 (5' TTTCTGGCTCATC/TAAGTGC TTTC3') (16).

Para la detección de la familia 2:

LSM12 y SKH52 (5' TGGGGGTGGAGTT TCTTCTCATCT3') (16).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se aplicó una multiplex PCR utilizando simultáneamente los primers específicos de ambas familias. La reacción de amplificación contuvo 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 0,1% Tritón X-100, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 200 µM c/u, 50 pmol de cada primer, 0.8 U de Go Taq DNA polimerasa, 1µl de ADN en estudio en un volumen final de 25 µl.

A las muestras negativas con multiplex PCR, se les realizó una PCR individual con una master mix específica para cada familia.

En ambas reacciones se procesaron paralelamente las siguientes muestras controles:

Controles positivos: preparaciones de ADN provenientes de las cepas de *S. pneumoniae* ATCC R36A y BG11703 correspondiente a la familia 1 y 2, respectivamente. (14).

Controles negativos: se utilizó agua en reemplazo de la muestra de ADN.

La amplificación fue realizada en un termociclador programable (Eppendorf Mastercycler Personal) en un total de 30 ciclos. Las condiciones de ciclado fueron: desna-

turalización inicial a 94°C durante 3 min seguida de 30 ciclos de 94°C, 30seg; 62°C, 30seg; 72°C, 2 min, con una extensión final a 72°C por 7 min.

Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en agarosa al 1,2 %/1X TAE buffer en presencia de 0.5 µg/ml bromuro de etidio a 5-10 V/cm durante 45 min. Se utilizó como marcador de PM, φX174 DNA/Hae III Markers (Promega). Luego el gel fue observado bajo iluminación UV.

Los productos amplificados tenían aproximadamente 1000 y 1200 bp, compatibles con los amplicones esperados para las familias PspA 1 y 2, respectivamente.

Resultados

Los resultados de la serotipificación de los 101 aislamientos neumocócicos se muestran en Tabla 1. En neumonía el más frecuente fue el serotipo 14, seguido de los serotipos 1, 6B y 19F. Por otra parte, en meningitis el serotipo prevalente fue el 14, mientras que, en frecuencia decreciente siguieron los serotipos 18C, 1 y 7F. Finalmente, si bien no podemos hablar de prevalencia ya que sólo se presentaron dos casos, los aislamientos obtenidos de pacientes con peritonitis, correspondieron a los serotipos 1 y 6B.

La figura 1 es una imagen representativa de los resultados de identificación por PCR de las familias de PspA correspondientes a los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* de nuestra región. A partir de los datos de la Tabla 2, surge que, hasta el momento, un 59,5 % de los aislamientos correspondieron a la familia 1 y un 16,5 % a la familia 2. Además, en un 24 % de los aislamientos no se pudo determinar la familia por el protocolo usado en este trabajo. Hemos encontrado asociaciones con algunos de los serotipos estudiados. Hasta el momento, los

serotipos 1, 5 y 15 B presentaron únicamente familia 1. En los serotipos 14, 6B, 6A se detectaron genes correspondientes a ambas familias y algunos aislamientos correspondientes a éstos no fueron tipables.

Discusión

La necesidad de superar las limitaciones de las vacunas antineumocócicas polisacáridas, pobremente inmunogénicas en la población de riesgo, condujo al desarrollo de las vacunas conjugadas. Éstas generan inmunidad en niños pequeños, debido a que el polisacárido adquiere, mediante el acoplamiento covalente con una proteína transportadora, el carácter inmunogénico de la misma, permitiendo su reconocimiento por el sistema inmunológico linfocitos T-dependiente.

Si bien la vacuna conjugada heptavalente es inmunógena en la población pediátrica lactante, protegería solo el 56 % y 66 % de las infecciones invasivas en niños menores de 2 y 6 años, respectivamente, en nuestro país (8).

Considerando las ventajas de elaborar vacunas basadas en proteínas de superficie del Spn (son potentes inmunógenos tanto en adultos como en niños, inducen protección contra bacteriemia neumocócica y son comunes a todos los serotipos), se están realizando trabajos a nivel mundial para lograr la identificación de las familias de PspA contenidas en los aislamientos prevalentes en distintos países.

Con estos antecedentes, nos abocamos a estudiar los genes de familias de PspA presentes en aislamientos regionales. Si bien ya había un trabajo realizado por la Dra Mollerach y cols., en aislamientos de todo el país, éste fue hecho en un período distinto al nuestro. Tal vez por eso existen algunas diferencias con nuestros datos, en la prevalencia de algunos serotipos hallados: los

serotipos 9N, 15C, 16F, 19A y 23F no han sido encontrados en nuestro período y, por el contrario, ellos no identificaron las familias de PspA en los serotipos 8, 15A, 15B, 22F y 33F, que hallamos en nuestros aislamientos.

Nuestros resultados evidenciaron, de manera similar a lo reportado por otros autores (23, 24) que los aislamientos de nuestra zona presentaron una mayor frecuencia de familia 1 respecto a la 2. De los 40 aislamientos estudiados por Vela y cols. 62,5 % fueron PspA familia 1, y 35 %, familia 2 (24). De los 149 aislamientos caracterizados por Mollerach y cols., 54,4 % fueron PspA familia 1 y 41,6 %, familia 2 (23). Por el contrario, Hollingshead y cols. (26) y Pimenta y cols. (28) en EEUU y Brasil, respectivamente, obtuvieron mayor prevalencia de la familia 2. En Alemania, Heeg y cols. obtuvieron igual proporción de ambas familias en aislamientos a partir de meningitis (32). En nuestro estudio, los serotipos 1 y 5 presentaron únicamente familia 1, coincidentemente con Mollerach y Vela (23, 24). Ambos serotipos, no incluidos en la vacuna 7-valente, son altamente frecuentes en la población pediátrica de Sud America, no así en Norte América. En el serotipo 6B de los aislamientos del presente trabajo, al igual que en el artículo de Mollerach (23), se detectaron genes correspondientes a ambas familias y no tipables, a diferencia de lo reportado por Vela (24), donde todos los serotipos 6B fueron familia 1.

En cuanto a los aislamientos en los cuales no se pudo identificar la familia de PspA, hubo diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores. Hollingshead y cols. (27) obtuvieron un 0,2 %, mientras que Pimenta y cols., un 20,2 % (28). En el presente trabajo, en un 24 % no se detectaron los genes correspondientes a las familias 1 y 2.

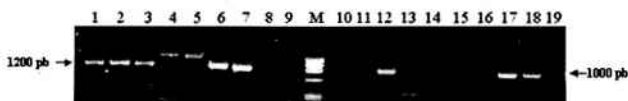
Tabla 1.
Distribución de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* según patología.

Serotipos	Neumonía	Meningitis	Peritonitis	Total (%)
14	25	6	0	31 (30,69%)
1	15	3	1	19 (18,81%)
6B	7	2	1	10 (9,90%)
18C	3	4	0	7 (6,93 %)
19F	5	1	0	6 (5,94 %)
7F	2	3	0	5 (4,95 %)
6A	3	1	0	4 (3,96 %)
5	4	0	0	4 (3,96 %)
15B	2	1	0	3 (2,97 %)
3	1	1	0	2 (1,98 %)
12F	2	0	0	2 (1,98 %)
23B	1	1	0	2 (1,98 %)
9 V	2	0	0	2 (1,98 %)
4	1	0	0	1 (0,99 %)
19A	0	1	0	1 (0,99 %)
33F	1	0	0	1 (0,99 %)
22F	1	0	0	1 (0,99 %)
Total	75	24	2	101 (100%)

Tabla 2.
Streptococcus pneumoniae: familias 1 y 2 de PspA en 42 de los 101 aislamientos serotipificados en Tabla 1.

Serotipos	Nº aislamientos	Familia 1	Familia 2	No tipables
14	10	3	3	4
1	7	7	-	-
6B	4	1	2	1
19F	4	3	-	1
7F	13	-	12	1
6A	3	2	1	-
5	2	2	-	-
12F	2	1	-	1
4	1	-	1	-
15B	2	2	-	-
18C	1	1	-	-
9V	1	1	-	-
33F	1	-	-	1
7F	1	-	-	1
8	1	-	-	1
15A	1	1	-	-
Total	42	25	7	10

Figura 1. Imagen típica de una electroforesis en Agarosa al 1,2 % de productos de PCR de los genes de PspA de distintos aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*. Calles 1-3, 6,7, 12,15 y 17-19: PspA Familia 1; Calles 4,5 y 8: PspA Familia 2; Calles 9-11, 14 y 16: Sin identificar; Calle M: Marcador de Tamaño Molecular (f X174 DNA/Hae III, Promega Corp.,USA).



De los aislamientos en los cuales no se identificaron algunas de las familias de PspA, los serotipos 6B, 7F, y 14 coinciden con los no tipables por Mollerach y cols. (23).

La distribución de las familias no estuvo asociada a ningún grupo etario ni a alguna patología, observación que también la reporta Brandileone y cols., de Brasil (29).

Debemos remarcar que nuestros resultados de identificación molecular de familias de PspA han sido obtenidos a partir de 42 de los 101 aislamientos iniciales. En estos momentos, y en la continuidad de este plan de trabajo, nos abocamos al análisis molecular de las cepas remanentes, tratando de optimizar condiciones a fin de minimizar el número de aislamientos no tipables con la metodología empleada (modificaciones en el programa de ciclado, así como la evaluación de oligonucleótidos cebadores alternativos).

Conclusión

Es un hecho comprobado que la cobertura de las actuales vacunas neumocócicas conjugadas no es muy alta, por no incluir todos los serotipos prevalentes en nuestro país. En consecuencia, la importancia de nuestros resultados radica en la determinación de la prevalencia de serotipos aislados en nuestra zona, así como en la identificación de las familias de PspA presentes en

los mismos. Esto es un valioso aporte para la formulación de una futura vacuna regional basada en la utilización de PspA como inmunógeno, porque protegería contra más serotipos y a todos los grupos etarios que la clásica 7-valente, previniendo las infecciones invasivas con una mayor eficacia, lo cual sería un factor importante para disminuir la tasa de morbi-mortalidad del Spn y su actual resistencia a los antimicrobianos.

Agradecimientos

A la Dra Stella Virgolini y Laura Zurbriegen, del Hospital "Dr Alassia", por proveernos los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*. Este trabajo fue realizado en parte, con fondos de la Universidad Nacional del Litoral a través de la Programación CAI+D 2006.

Bibliografía

1. Pneumococcal vaccines - Who Position Paper. 1999. Wkly Epidemiol Rec 74: 177-183.
2. Sniadack, DH.; Schwartz, B.; Lipman, H.; Bogaerts, J.; Butler, JC.; Dagan, R.; Echaniz - Aviles, N.; Lloyd - Evans, A.; Fenoll, N.; Girgis, I.; Henrichsen, J.; Klugman, K. 1995. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: Geographic and temporal differences in serotype and serogroup

- distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: Implications for vaccine strategies. *Pediatric Infectious Disease Journal* **14**, 6: 503-510.
3. Shann, F. 1986. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatric Infectious Disease Journal* **5**, 2: 247-253
 4. Echaniz – Avilés, G.; Velásquez – Meza, ME.; Carnilla – Barajas, MN.; Soto –Noguerón, A.; Di Fabio, JL.; Solórzano – Santos, F. et al. 1998. Predominance of the multiresistant 23F international clone of *Streptococcus pneumoniae* among isolates from Mexico. *Microb Drug Resist* **4**, 3: 241-246.
 5. Briles, D.E.; Hollingshead, S.K.; Nabors, G.S.; Paton, J.C.; Brooks – Walter, A. 2000. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* **8**, 19 Suppl 1:S 87-95.
 6. Darkes, M.J.; Plosker, G.L. 2002. Pneumococcal conjugate vaccine (Pnevna; PNCRM7): a review of its use in the prevention of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Pediatr Drugs* **4**, 9: 609-30.
 7. Gilmour, R. 2005. EpiReview: Invasive pneumococcal disease. 2002. N S W, Public Health Bull. 16:26-30
 8. Di Fabio, JL.; Castañeda, E.; Agudelo, Cl.; et al. 2001. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva - Vigía Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigía Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatric Infectious Disease Journal* **20**, 10: 959-67
 9. Tarallo, L.; Tancredi, F.; Schito, G.; Marchese, A.; Bella, A. 2006. Italian Pneumonet Group (Società Italiana Pediatria and Associazione Italiana Studio Antimicrobici e Resistenze) Active surveillance of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in Italian children. *Vaccine* **24**, 47: 6938-6943.
 10. Nurkka, A.; Joensuu, J.; Henckaerts, I.; Peeters, P.; Poolman, J.; Kilpi, T.; Kayhty, H. 2004. Immunogenicity and Safety of the Eleven Valent Pneumococcal Polysaccharide - Protein D Conjugate Vaccine in Infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*. **23**, 11: 1008-1014.
 11. Kaplan, SL.; Mason, EO. Jr.; Wald, ER.; Schutze, GE.; Bradley, JS.; Tan, TQ.; et al. 2004. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* **113**, 3: 617-618.
 12. Lieu, T.; Ray, G.; Black, S.; et al. 2000. Projected cost - effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination of healthy infants and young children. *JAMA* **283**, 11: 1460-1468.
 13. Paton, JC.; Berry, AM.; Lock, RA. 1997. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. *Microb. Drug Resist* **3**, 1: 1-10.
 14. McDaniel LS, Sheffield JS, Swiatlo E, Yother J, Crain MJ, Briles DE. 1992. Molecular localization of variable and conserved regions of *pspA* and identification of additional *PspA* homologous sequences in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **13**, 4: 261-269.
 15. Briles, DE.; Tart, RC.; Swiatlo, E.; et al. 1998. Pneumococcal diversity considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (*PspA*). *Clin Microbiol Rev* **11**, 4: 645-57.
 16. Swiatlo, E.; Brooks-Walter, A.; Briles, DE.; McDaniel, LS. 1997. Oligonucleotides identify conserved and variable regions of *pspA* and *pspA*-like sequences of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **188**, 2: 279-84.
 17. Hollingshead, SK.; Becker, R.; Briles, DE. 2000. Diversity of *PspA*: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun* **68**, 10: 5889-5900.
 18. McDaniel, LS.; Sheffield, JS.; Delucchi, P.; Briles, DE. 1991. *PspA*, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae* is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun* **59**, 1: 222-228.

19. Crain, MJ.; Waltman, II WD.; Turner, JS.; Yother, J.; Talkington, DF.; McDaniel, LS.; Gray, BM.; Briles, DE. 1990. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **58**, 10: 3293-3299.
20. Briles, DE.; Hollingshead, S.; Brooks – Walter, A.; Nabors, GS.; Ferguson, L.; Schilling, M. et al. 2000. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine* **18**, 16: 1707-1711.
21. Nabors, GS.; Braun, PA.; Herrmann, DJ. 2000. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies. *Vaccine* **18**, 17: 1743-54.
22. Tart, RC.; McDaniel, LS.; Ralph, BA.; Briles, DE. 1996. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J Infect Dis* **173**, 2: 380-386.
23. Mollerach, M.; Regueira, M.; Bonofiglio, L.; Callejo, R.; Pace, J.; Di Fabio, JL.; Hollingshead, SK. Briles DE and *Streptococcus pneumoniae* working Group. 2004. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinean children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. *Epidemiol Infect* **132**, 2: 177-184.
24. Vela Coral, MC.; Fonseca, N.; Castañeda, E.; Di Fabio, JL.; Hollingshead, SK. Briles. DE. 2001. Pneumococcal surface protein A of invasive isolates from Colombian children. *Emerg Infect Dis* **7**, 5: 832-836.
25. Miyaji, EN.; Ferreyra, DM.; Lopes, AP.; Brandileone, MC.; Dias, WO.; Leite, LC. 2002. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. *Infect Immun* **70**, 9: 5086-5090.
26. Hollingshead, SK.; Baril, L.; Ferro, S.; King, J.; Coan, P. Briles DE. 2006. Pneumococcal Proteins Epi Study Group. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *J Med Microbiol* **55**, 2: 215-221
27. Ogunniyi, AD.; Grabowicz, M. Briles DE, Cook J, Paton JC. 2007. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *S pneumoniae*. *Infect Immun*. **75**, 1: 350-357.
28. Pimenta, FC.; Ribeiro – Dias, F.; Brandileone, MC.; Miyaji, EN.; Leite, LC.; Sgambatti de Andrade, AL. 2006. Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. *J Clin Microbiol* **44**, 8: 2838-2843.
29. Brandileone, MC.; Andrade, AL.; Teles, EM.; Zanella, RC.; Yara, TI.; Di Fabio, JL.; Hollingshead, SK. 2004. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. *Vaccine* **22**, 29-30: 3890-3896.
30. Sorensen, UBS. 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* **31**, 8: 2097-2100.
31. Mayoral, C.; Noroña, M.; Baroni, MR.; Giani, R.; Zalazar, F. 2005. Evaluation of a nested - PCR assay for *Streptococcus pneumoniae* detection in pediatric patients with community - acquired pneumonia. *Rev Arg Microbiol* **37**, 4: 184-188.
32. Heeg, C.; Franken, C.; van der Linden, M.; Al-Lahham, A.; Reinert, RR. 2007. Genetic diversity of pneumococcal surface protein A of *Streptococcus pneumoniae* meningitis in German children. *Vaccine* **25**, 6: 1030-5.