

**Cristina Aparecida Borges Pereira Laval**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**Caracterização epidemiológica e padrões fenotípicos e  
genotípicos de isolados de meningites bacterianas  
em crianças no Estado de Goiás**

**Goiânia, março de 2003**

**Cristina Aparecida Borges Pereira Laval**

**Caracterização epidemiológica e padrões fenotípicos e  
genotípicos de isolados de meningites bacterianas  
em crianças no Estado de Goiás**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical, área de concentração em Epidemiologia.

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia S. S. de Andrade**

**Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Fabiana C. Pimenta**

**Goiânia, março de 2003**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela certeza da Sua presença em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo, Claudio Henrique Laval Silva, pelos ensinamentos, paciência, renúncia, dedicação e muito amor durante todas as fases desta conquista.

Aos meus pais, Franézio Rufino Pereira e Divina Borges Pereira, pelo incentivo, confiança, carinho e amor.

Às minhas filhas do coração, Érika e Beatriz, por personificarem a razão maior da existência humana.

À minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia S. S. Andrade pelo convite para participação neste trabalho, que me proporcionou a oportunidade de ampliar extraordinariamente os meus conhecimentos, vencer desafios e manusear ferramentas adequadas para as análises epidemiológicas em Saúde Pública. Além de orientadora, foi uma grande amiga, e por isso hoje eu a admiro ainda mais.

À minha co-orientadora Prof. Dr<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta pelo aporte imprescindível no entendimento e redação deste trabalho, pela paciência e companheirismo, e pelo desempenho na coordenação e acompanhamento das atividades de responsabilidade do Laboratório de Microbiologia do IPTSP em parceria com o Instituto Adolfo Lutz.

Ao Prof. Renato Maurício de Oliveira, pela amizade cotidiana e pelo esmeroso trabalho na coordenação do trabalho de campo desenvolvido junto à sua equipe.

A toda a equipe do trabalho de campo, pelo esforço e dedicação constantes.

À Prof. Simonne de Almeida Silva pela amizade e a incansável disposição de compartilhar conhecimentos e contribuir de forma decisiva na análise de dados.

Ao Prof. João Guimarães de Andrade pela valiosa contribuição na contextualização sobre vacinas.

Aos colegas de Mestrado, Claci Fátima W. Rosso, Cáritas M. Franco, Évily C. de Lima, Nazareth Elias Silva Nascimento, Solomar Martins Marques, Adriana Oliveira Guilarde e Eliane Terezinha Afonso, pelo incentivo, conhecimentos compartilhados e participação nas alegrias e nas dificuldades desta jornada.

À Lícia Kamila A. Melo, pela ajuda fundamental na organização dos bancos de dados e no aprendizado dos vários softwares utilizados.

À Dr<sup>a</sup> Luciana Leite Pineli Simões, pela colaboração na consistência dos dados e na pesquisa bibliográfica.

A todos os professores da Pós-Graduação pelos conhecimentos ministrados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Medicina Tropical, Saúde Coletiva e Dermatologia, na pessoa do Prof. Mauro Elias Mendonça, pela confiança e incentivo.

Ao Dr Clecildo José Barreto Bezerra, diretor do IPTSP, e à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela oportunidade deste trabalho.

Ao Dr Elias Rassi Neto, ex-Secretário Municipal de Saúde de Goiânia, pelo apoio ao Projeto e incentivo à minha participação.

Ao Prof. Dr. Otaliba Libânio de Moraes Neto, Secretário Municipal de Saúde de Goiânia, pela confiança, oportunidade, compreensão e apoio.

À Dr<sup>a</sup> Cristina M. C. Brandileone do Instituto Adolfo Lutz – SP pelo aporte laboratorial de sorotipagem com técnicas convencionais e com métodos de tipagem molecular (eletroforese de campo pulsado – PFGE) das cepas isoladas, além do fundamental suporte na análise de dados.

À Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Maia, Coordenadora do Programa Nacional de Imunizações (PNI), pelo fundamental apoio e colaboração em todas as fases desta investigação.

Aos colegas da Secretaria Municipal de Saúde pela amizade, incentivo, apoio, carinho e confiança em todas as fases deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na concretização deste trabalho, o meu reconhecimento e gratidão.

*Dedico este trabalho ao meu esposo e  
às minhas filhas*

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
DEDICATÓRIA.....	v
APRESENTAÇÃO.....	01
RESUMO.....	03
SUMMARY.....	05

### REVISÃO: Meningites bacterianas na era das vacinas conjugadas.

Resumo.....	08
Summary.....	09
Texto.....	10
Referências Bibliográficas.....	21

### ARTIGO: Caracterização epidemiológica e padrões fenotípicos e genotípicos de isolados de meningites bacterianas em crianças no Estado de Goiás.

Resumo.....	36
Summary.....	38
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	42
População e área de estudo.....	42
Definição de caso de meningite.....	43
Coleta de <i>swabs</i> de nasofaringe.....	44
Isolamento e identificação fenotípica.....	44
Caracterização genotípica.....	45
Análise de dados.....	47
Resultados.....	48
Discussão.....	50
Referências Bibliográficas.....	58
Tabelas e Figuras.....	73
ANEXOS.....	82

## APRESENTAÇÃO

As meningites bacterianas ainda representam importante causa de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos, principalmente em países em desenvolvimento, sendo o *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* os patógenos mais prevalentes.

A última década caracterizou-se pelo boom das vacinas conjugadas, lideradas pelo desenvolvimento da vacina contra o *H. influenzae* tipo b no início dos anos 90 e mais recentemente pelas vacinas heptavalente contra o pneumococo e anti-meningocócica sorogrupo C. Com a implementação destas vacinas, a epidemiologia destas bactérias tende a adquirir novos contornos, com redução importante das infecções invasivas (efeito direto) e também do estado de portador (efeito indireto). Além disso, a emergência e ampla distribuição geográfica de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos sinalizam uma necessidade crescente da utilização de uma metodologia mais “acurada” no estudo destas bactérias.

Neste contexto, novas estratégias de vigilância tornam-se imprescindíveis no conhecimento das cepas implicadas no desenvolvimento destas infecções, bem como sua emergência e distribuição clonal. A incorporação de técnicas de tipagem molecular fornece informações relevantes para a vigilância das doenças invasivas em menores de 5 anos, além de subsídios para avaliação da introdução de novas vacinas contra o pneumococo e o meningococo no cenário epidemiológico local. Dentre estas técnicas, destaca-se a eletroforese de campo pulsado (PFGE), amplamente utilizada por sua boa reprodutibilidade e alto poder discriminatório.

A presente dissertação de mestrado integra um Projeto Multicêntrico de base populacional de Vigilância do *S. pneumoniae* e *H. influenzae* em população pediátrica de Goiânia (Andrade 2002), iniciado em maio de 2000, e que vem estudando a colonização da nasofaringe pelo pneumococo, sorotipos prevalentes em crianças (Lima

2001) e o impacto da vacina conjugada do *H. influenzae* b nas meningites e pneumonias (Simões et al. 2002, Andrade et al. 2002). A dissertação está apresentada em dois manuscritos. O primeiro corresponde a uma **Revisão** que aborda as meningites bacterianas na era das vacinas conjugadas e está formatado para ser enviado à *Revista Panamericana de Salud Publica / Pan American Journal of Public Health*. O segundo manuscrito, redigido sob forma de **artigo científico**, apresenta os resultados da caracterização epidemiológica das meningites bacterianas hospitalizadas em Goiânia e dos padrões fenotípicos e genotípicos de seus agentes. O componente referente ao *Streptococcus pneumoniae* será submetido para publicação ao *Journal of Clinical Microbiology*. As respectivas versões em inglês constam dos anexos.

## Referências

- Andrade ALSS 2002. Insights into the Epidemiology of Pneumococcal Diseases in the Developing World: Goiânia, Brazil. In: Program & Abstracts Book of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, pg 19, Anchorage, Alaska, May 5 to 8, 2002. American Society for Microbiology, 2002. Disponível em: [http://www.isppd.org/program/ISPPD\\_ProgAbsF.pdf](http://www.isppd.org/program/ISPPD_ProgAbsF.pdf). Acessado em 28 de Abril de 2002.
- Lima EC, Prevalência de portador e sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe de crianças menores de 5 anos de Goiânia-Goiás. In: *Dissertação para obtenção de título de mestre*. 2001, Universidade Federal de Goiás: Goiânia.
- Simões LLP, Andrade ALSS, Laval CABP, Oliveira RM, Silva SAE, Martelli CMT, Davila SL, Almeida RM 2002. Effectiveness of *H. influenzae* b conjugate vaccine on meningitis in Central Brazil. *International Journal of Epidemiology*. XVI IEA World Congress of Epidemiology of the International Epidemiology Association. Oxford 2002.

## RESUMO

**Objetivo:** Descrever o perfil epidemiológico das meningites bacterianas em crianças menores de 5 anos, hospitalizadas em Goiânia e comparar os resultados de fenotipagem e tipagem molecular pela eletroforese de campo pulsado (PFGE) na caracterização dos *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* isolados simultaneamente da nasofaringe, líquido e/ou sangue.

**Material e Métodos:** Um Sistema de Vigilância prospectivo populacional, de meningites, foi implementado no município de Goiânia, após a introdução da vacina conjugada contra o *H. influenzae* b (Hib). No período de maio de 2000 a agosto de 2001, o sistema detectou 78 crianças com meningite bacteriana aguda. O diagnóstico clínico-laboratorial baseou-se nos critérios estabelecidos pela OMS. *Swabs* de nasofaringe foram coletados de 54 crianças para detecção de pneumococo e *H. influenzae*. Isolados recuperados de fluidos estéreis (líquor e sangue) e nasofaringe foram estudados do ponto de vista fenotípico (sorotipagem e resistência antimicrobiana) e de tipagem molecular pela PFGE.

**Resultados:** Sessenta e sete por cento dos casos de meningite ocorreram em crianças < 2 anos de idade. A identificação do agente etiológico pela cultura e/ou presença de antígeno no líquido foi de 60,3%. A meningite pelo *S. pneumoniae* foi a mais prevalente (26,9%), seguida pela *Neisseria meningitidis* (17,9%) e *H. influenzae* (16,7%). Três casos de meningite por *H. influenzae* “a” foram detectados. Em 12 (22,2%) das 54 crianças com coleta de *swab*, as bactérias foram isoladas concomitantemente em pelo menos dois sítios clínicos, sendo que em 5 crianças isolou-se o *H. influenzae* e em 7 o *S. pneumoniae*. Obteve-se 12 cepas de *H. influenzae*, com detecção de 3 padrões de restrição (A, B e C) pela PFGE. Foram isoladas 17 cepas de *S. pneumoniae*, com perfil de PFGE evidenciando 10 perfis genéticos. As cepas de *H. influenzae* apresentaram correlação genética entre isolados de um mesmo paciente e entre pacientes enquanto cepas de *S. pneumoniae* apresentaram correlação genética apenas intra-criança.

**Conclusão:** *S. pneumoniae* foi a bactéria predominante em crianças < de 5 anos. Nas meningites pelo *H. influenzae*, detectou-se proporção significativa do sorotipo “a”. A tipagem molecular pela PFGE adiciona informações relevantes para a epidemiologia das meningites por pneumococo e *H. influenzae*, especialmente quando incorporada aos sistemas de vigilância de meningites. A evidência do potencial da utilização da sorotipagem dos isolados de nasofaringe como preditor de cepas de fluidos estéreis de meningites merece ser investigada em estudos futuros.

**Palavras-chave:** meningites bacterianas, epidemiologia molecular, *H. influenzae* b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, vacinas conjugadas.

## SUMMARY

**Objective:** To describe the epidemiological pattern of bacterial meningitis among children less than 5 years old admitted in Goiânia and to compare the results provided by fenotyping and molecular typing using the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Haemophilus influenzae* (Hi) and *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal, and cerebral spinal fluids (CSF) and/or blood.

**Methods:** A population-based prospective surveillance on meningitis was implemented in the municipality of Goiânia, after the introduction of the conjugate Hi type b vaccine (Hib). Between May/2000 and August/2001, the ongoing system detected 78 children with acute bacterial meningitis. Clinical and laboratorial diagnosis followed the WHO guidelines. Nasopharyngeal swabs were collected from 54 children to identify pneumococci and Hi isolates. Bacterial recovered from sterile fluids (CSF and blood) and from nasopharyngeal were studied by fenotyping and PFGE.

**Results:** 66.7% of meningitis cases occurred among children less than 2 years old. The bacterial etiology was identified by CSF culture or presence of antigen in 60.3% of the cases. *S. pneumoniae* was the most prevalent bacterial, followed by the *Neisseria meningitidis* (17.9%) and Hi (16.7%). Three cases of meningitis by Hi serotype “a” were detected. Twelve (22.2%) out 54 children, had isolates simultaneously recovered from at least 2 clinical specimens; Hi was isolated in 5 children and *S. pneumoniae* in 7 children. The 12 strains of Hi corresponded to 3 pulsed-field gel electrophoresis patterns (A, B, C) whereas the 17 strains of pneumococcal yielded 10 patterns. Hi strains recovered from different sites presented genetic correlation “intra” and “inter” children whereas for pneumococcal strains the genetic relatedness was confirmed just for the same child.

**Conclusion:** *S. pneumoniae* was the most prevalent etiological agent of meningitis among children under 5 years old. A significant proportion of *H. influenzae* serotype “a” was detected. The PFGE adds valuable epidemiological knowledge for meningitis caused by *S. pneumoniae* and *H. influenzae*, especially when incorporated into the surveillance systems. The evidence of the potential role of serotyping of

nasopharyngeal isolates as a surrogate measure to ascertain the invasive strains causing meningitis deserves be further investigated.

**Key words:** acute bacterial meningitis, molecular epidemiology, *H. influenzae* b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, conjugate vaccines.

**REVISÃO**

**Meningites bacterianas na era das  
vacinas conjugadas**

a ser submetido à publicação na *Revista Panamericana de Salud Publica / Pan American Journal of Public Health*

## RESUMO

As meningites bacterianas constituem importante problema de saúde pública, contribuindo com altas taxas de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* são os principais agente etiológicos das meningites em países em desenvolvimento. Com o advento das vacinas conjugadas na última década, lideradas pelo desenvolvimento da vacina contra o *H. influenzae* tipo b e mais recentemente com as vacinas antipneumocócica heptavalente e antimeningocócica sorogrupo C, a epidemiologia destas bactérias tende a apresentar mudanças importantes, como a redução das doenças invasivas (efeito direto) e do estado de portador (efeito indireto). Esta revisão discute o impacto alcançado com a ampla utilização da vacina conjugada Hib, especialmente na América Latina, e o potencial das vacinas conjugadas contra o pneumococo e o meningococo, na redução das meningites em crianças menores de 5 anos. Discute também as limitações hoje existentes, tanto no desenvolvimento, como na disponibilização destas vacinas, e aborda novos candidatos às vacinas conjugadas, no estado atual do conhecimento. O grande desafio, sem dúvida, é a implementação destas vacinas em todo o mundo, principalmente em regiões em desenvolvimento.

**Palavras-chave:** vacinas conjugadas, vacina contra o Hib, vacinas pneumocócicas, vacinas antimeningocócicas, impacto da vacina Hib.

## SUMMARY

Acute bacterial meningitis represents a relevant cause in morbidity and mortality among children less than five years old, being *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* the most important agents of bacterial meningitis in developing countries. The development of the conjugate vaccines in the beginning of the 90's, especially the type b *H. influenzae* (Hib), and more recently the heptavalent pneumococcal and the serogroup C meningococcal vaccines, contributed directly to changes in the epidemiological profile of the invasive diseases (direct effect) and of the carriage status (indirect effect). This review discusses the impact of the Hib conjugate vaccine in countries of Latin America where the vaccine has been implemented and the potential of the pneumococcal and meningococcal conjugate vaccines on the reduction on meningitis worldwide. The paper also addresses the constraints about the development and delivery of these vaccines and reviews new candidate vaccines in the state-of-the-art. The greatest challenge, undoubtedly, is to implement the vaccines worldwide, mainly in the developing regions.

**Key words:** Conjugate vaccines, Hib conjugate vaccine, pneumococcal conjugate vaccine, meningococcal conjugate vaccine, impact of Hib conjugate vaccine.

## **Meningites bacterianas na era das vacinas conjugadas**

As meningites bacterianas constituem importante causa de morbidade e mortalidade na população pediátrica, principalmente em países em desenvolvimento (41, 71). Apesar da disponibilidade de antibióticos cada vez mais potentes, e unidades de cuidados intensivos mais sofisticadas, as taxas de mortalidade por meningite bacteriana ainda permanecem altas, com uma proporção significativa de seqüelas entre os sobreviventes (68, 74).

O advento das vacinas conjugadas na última década, representou um avanço incontestável, inaugurando uma nova era na história da vacinologia moderna. Ao contrário das primeiras vacinas de polissacarídes purificados, as vacinas conjugadas produzem uma resposta T-dependente e conseqüentemente indução de memória imunológica, conferindo proteção clínica em crianças menores de 2 anos (1, 37). Este grupo etário é considerado o de maior risco para as doenças invasivas causadas por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, os principais patógenos causadores de meningites bacterianas (41).

O desenvolvimento da vacina conjugada contra o *H. influenzae* b (Hib) no início dos anos 90, o seu licenciamento e a implementação na rotina dos serviços de saúde, contribuíram para mudanças importantes no perfil da epidemiologia das doenças invasivas causadas pelo Hib, em especial a meningite (2, 55). Mais recentemente, a vacina conjugada heptavalente contra o pneumococo e a vacina antimeningocócica do sorogrupo C foram licenciadas, enquanto as vacinas pneumocócicas 9-11 valente encontram-se em fase avançada de ensaios clínicos em vários países (30, 32, 80, 83, 98).

### *Vacina contra o H. influenzae tipo b*

Finlândia, Canadá, Islândia, Estados Unidos, Reino Unido, Israel e Austrália foram os primeiros países a utilizar amplamente a vacina Hib no final da década de 80 e início dos anos 90. Heath, em estudo de revisão sobre a eficácia da vacina Hib nesses países, mostrou espetacular redução da incidência das doenças invasivas causadas pelo *H. influenzae b* (46). Nos EUA, Adams et al. observaram diminuição de 82% na incidência de meningites causadas pelo *H. influenzae* entre 1985 e 1991, em estudo de tendência, com dados de vigilância prospectiva (2). Posteriormente, Dawson et al. em estudo retrospectivo, detectaram queda no número de casos de meningites por *H. influenzae b* de 73% para 69%, com o uso da vacina polissacarídea, e para 16%, em um período de 5 anos após a introdução da vacina conjugada (23).

Na América Latina, a vacina foi introduzida inicialmente no Uruguai, em 1994, e posteriormente na Costa Rica e Chile. Atualmente a vacina está incorporada aos programas de imunização de quase todos os países da América Latina (27). No Uruguai, a taxa de incidência de meningite por *H. influenzae b* caiu de 15,6 para 0,03 por 100.000 após 2 anos da introdução da vacina (78). No Brasil, a vacina conjugada Hib foi inicialmente introduzida em Curitiba em 1996, e após um ano de uso rotineiro, observou-se redução de 72% no risco de adquirir meningite (86). Em meados de 1999, a vacina foi implementada na rotina do Programa Nacional de Imunizações (PNI) em todo o país, e após 2 anos de utilização, Simões et al. em estudo prospectivo de vigilância populacional, mostraram uma redução de 78% no risco de aquisição de meningite por *H. influenzae b* em menores de 5 anos no Estado de Goiás (84). Da mesma forma, estudos conduzidos no Distrito Federal<sup>1</sup> e em Salvador, mostraram redução de 80% e 69% dos casos de meningite, respectivamente, após o primeiro ano de utilização da vacina (77). Os resultados do impacto da vacina na América Latina, encontram-se sumarizados na tabela abaixo, na qual observa-se variações de 40,0% a 95,6% na

---

<sup>1</sup> Freitas H. [Meningite por *Haemophilus influenzae b* no Distrito Federal. Aspectos epidemiológicos e impacto após introdução da vacina]. Dissertação para obtenção de título de mestre em Saúde Coletiva. [2000]. Localizado em: Universidade de Brasília, Brasília, DF.

redução das meningites por Hib, na dependência do período de avaliação pós-introdução da vacina. Vários fatores, entre eles a cobertura vacinal no período de avaliação, podem ter contribuído para a diversidade destes resultados.

**Impacto da vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* b nas meningites, em países da América Latina**

País	Autor, ano	Introdução da vacina	Faixa etária	Período após a introdução da vacina Hib	Coefficientes x10 <sup>5</sup> pré / pós-vacina	Redução (%) pós-vacina
Cuba	Dickinson et al. 2001 (25)	1999	< 5 anos	1 ano	13,6 / 7,6	52,8
Colômbia	Agudelo et al. 2000 (5)	1998	< 1 ano	1 ano	-	40,0
Uruguai	Ruocco et al. 1999 (78)	1994	< 5 anos	2 anos	15,6 / 2,7	82,7
	Landaverde et al. 1999 (54)	1994	Todas idades	6 meses	-	95,6
Chile	Diaz et al. 2001 (24)	1996	< 5 anos	2 anos	36,4 / 9,9	72,7
Brasil	Takemura & Andrade 2001(86)	1996	< 5 anos	1 ano	35,4 / 9,7	72,6
	Freitas 2000	1999	< 5 anos	1 ano	-	80,0
	Simões et al. 2002 (84)	1999	< 5 anos	2 anos	10,8 / 2,3	78,7
	Ribeiro et al. 2003 (77)	1999	< 5 anos	1 ano	2,6 / 0,8	69,0

- dados não disponíveis

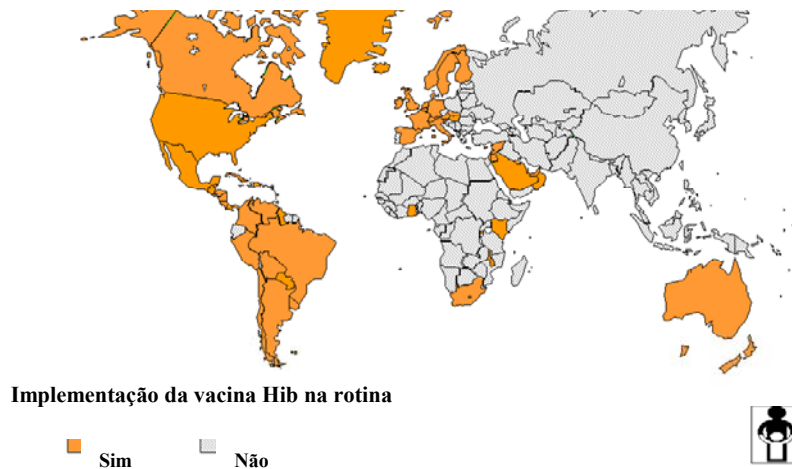
Fonte: Adaptado de Simões 2002 <sup>2</sup>

A diminuição significativa das meningites bacterianas causadas pelo Hib, deve-se não somente ao efeito direto da vacina na proteção individual, mas, sobretudo, à pronunciada habilidade desta vacina em promover redução da colonização na nasofaringe (4, 9, 34, 63, 85), diminuindo a transmissão do Hib, e assim, a incidência das meningites também nas crianças não vacinadas (efeito indireto da vacina - imunidade de grupo) (61).

Apesar da disponibilidade da vacina conjugada Hib e do expressivo impacto sobre as doenças invasivas nos países onde está sendo utilizada, estima-se que 132 milhões de crianças continuam sem acesso a esta vacina, a maioria delas de países pobres da África e Ásia (96). O mapa abaixo mostra a geografia atual da implementação da vacina Hib no mundo.

<sup>2</sup> Simões LLP. [Avaliação da vacina conjugada do *Haemophilus influenzae* b: aspectos epidemiológicos e impacto nas meningites em Goiás]. Dissertação para obtenção de título de mestre. [2002]. Localizado em: Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

**Países que utilizam a vacina Hib no  
sistema nacional de imunização (Março 2002)**



Fonte: modificado de WHO 2002

Importantes obstáculos têm impedido a introdução da vacina no continente africano e asiático. São essenciais as informações sobre a produção, o custo, as facilidades do uso em larga escala e, a segurança e eficácia da vacina nestes locais. Várias investigações têm mostrado que o fator mais importante para introduzir a vacinação em massa nesses países é o custo da vacina, enquanto a segurança e a eficácia, apesar de significantes, são fatores menos relevantes. A difícil situação econômica e financeira de muitos países da África, impede a ampliação dos gastos *per capita* em saúde, inviabilizando a introdução da vacina Hib (97). A maioria destes países da África e Ásia têm infra-estrutura médica e laboratorial deficitárias. Em alguns locais o *H. influenzae* b nunca foi isolado, dificultando o reconhecimento da doença invasiva como um importante problema de saúde pública. Adicionalmente, outros agravos à saúde competem com o *H. influenzae* b em termos de prioridade, como tuberculose, malária, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e a doença meningocócica. Apesar destas barreiras, os governantes desses países necessitam sensibilizar-se sobre a magnitude e os custos sociais das doenças causadas pelo Hib, maximizando esforços para introduzir a vacina nos programas de saúde (70, 94).

### *Vacina conjugada antipneumocócica*

A infecção pneumocócica causa um maior espectro de doenças que a infecção pelo Hib, incluindo doenças invasivas como pneumonia e meningite e, doenças não invasivas como a otite média aguda e sinusite; contribui também com os maiores índices de mortalidade e morbidade no mundo, principalmente em crianças menores de 5 anos (39, 62, 65). Anualmente ocorrem pelo menos 1,2 milhões de mortes por pneumonia, sendo 39% entre menores de 5 anos com 100.000 a 500.000 mortes por meningite pneumocócica (39).

O extraordinário sucesso obtido com a introdução da vacina contra o Hib estimulou o desenvolvimento da vacina antipneumocócica conjugada. Em fevereiro de 2000 o *Food and Drug Administration* aprovou uma vacina 7-valente para uso rotineiro em crianças americanas menores de 2 anos de idade. Apesar dos 90 sorotipos de *S. pneumoniae* identificados até o momento (47), esta vacina contém apenas 7 sorotipos – 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F – que no entanto, são responsáveis por 70 a 90% das doenças pneumocócicas invasivas em crianças nos EUA, Canadá, Oceania, África e Europa, e 70% dos pneumococos que causam otite média aguda nos EUA, Canadá e Europa (43, 44). Ensaios clínicos com a vacina 7-valente conduzidos nos EUA evidenciaram alto nível de proteção contra doença pneumocócica invasiva, e um estudo subsequente na Finlândia, evidenciou 50% a 60% de proteção contra otite pneumocócica, sorotipo específico (12, 29). No Brasil, a vacina heptavalente foi licenciada em fevereiro de 2001 (7), mas não faz parte da rotina do PNI. A vacina conjugada 9-valente, contém os sorotipos da 7-valente, além dos sorotipos 1 e 5 e está sendo avaliada em grandes ensaios clínicos na África do Sul e Gâmbia (49). A vacina 11-valente apresenta além dos sorotipos incluídos na vacina 9-valente, os sorotipos 3 e 7V, e atualmente está sendo avaliada em ensaios clínicos nas Filipinas, Israel, Argentina e Chile (51, 62, 98).

Neste contexto, enquanto para a vacina conjugada Hib o impacto esperado foi principalmente na redução do número de casos de meningite, com as vacinas

pneumocócicas espera-se principalmente reduzir os casos de pneumonia e otite média aguda, bem como a taxa de portador, o que certamente contribuirá com alterações significativas na epidemiologia das doenças pneumocócicas nesta década (11, 21, 22). Vários estudos têm estimado a proporção de sorotipos prevalentes em meningites e pneumonias que a vacina pneumocócica heptavalente cobriria (43, 44). DiFabio et al. estimaram uma cobertura de 64,4% (IC95% 60,7-67,8) dos sorotipos prevalentes nas meningites no Brasil (26). Resultados semelhantes foram encontrados (Brandileone et al., Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, observações não publicadas, 2003) analisando-se dados de 2 décadas de vigilância de pneumococos no Brasil, que mostraram que a vacina 7-valente cobriria 61% (IC95% 57,0-64,9) dos sorotipos detectados nas meningites em crianças menores de 2 anos, que foram o 1, 14, 19A, 19F, 5, 6A e 6B. Vale enfatizar a alta prevalência dos sorotipos 1 e 5 na América Latina, não contidos na vacina heptavalente, uma vez que a formulação da vacina foi concebida levando em conta os sorotipos invasivos mais prevalentes nos Estados Unidos. Eskola & Anttila em artigo de revisão, enfatizaram que estudos com a vacina 11-valente têm estimado uma cobertura de 73 a 92% contra as infecções invasivas causadas pelo pneumococo (30).

A eficácia da vacina antipneumocócica contra a meningite, necessita ser melhor avaliada. Ensaios clínicos conduzidos no estado da Califórnia, pelo grupo *Kaiser*, e em índios americanos Navajos, não detectaram nenhum caso de meningite no grupo vacinado. Entretanto, como o número de casos no grupo controle não foi ainda reportado (11, 66, 67), é provável que a eficácia da vacina heptavalente para a meningite pneumocócica, possa ser melhor avaliada através de estudos tipo meta-análise, que apresentam como vantagem, um maior tamanho da amostra e conseqüentemente, um maior poder estatístico do estudo para detectar diferenças na incidência de meningites entre os grupos vacinados e não vacinados. Alternativamente, estudos observacionais podem ser utilizados para avaliar a efetividade da vacina na redução das meningites, após o licenciamento e implementação da vacina.

Apesar da expectativa otimista do impacto da vacina conjugada contra o *S. pneumoniae*, algumas limitações devem ser ressaltadas em relação a implementação da

vacina na rotina dos serviços de saúde. Dentre elas, o alto custo para a utilização em saúde pública. Desta forma, novos candidatos à vacina antipneumocócica estão sendo testados atualmente quanto a imunogenicidade e segurança, incluindo-se neste escopo, as vacinas proteicas.

Sabe-se que além dos polissacarídeos capsulares, proteínas de superfície estão envolvidas na virulência do pneumococo, como por exemplo a proteína A (PspA) e a adesina A (PsaA). A proteína PspA, por exemplo, associada à aderência e invasão da mucosa da nasofaringe pelo pneumococo, interfere na estabilidade da cápsula, de acordo com a estrutura dos polissacarídeos. A presença de cápsulas estáveis do ponto de vista eletrostático, contribui para a seleção de sorotipos com maior ou menor habilidade de aderência (50). São quatro, as proteínas com potencial para uso em vacinas: PspA, pneumolisina, PsaA e a proteína de superfície C (PspC) (17). Em estudos experimentais realizados em camundongos, PsaA e PspC têm sido as proteínas mais eficazes na proteção contra o estado de portador. Individualmente, a proteína PsaA tem apresentado os melhores resultados para induzir proteção contra a colonização da nasofaringe. Entretanto, uma combinação de PspA e pneumolisina pode induzir maior imunidade à infecções pulmonares e possivelmente septicemia, do que a PspA isoladamente (17, 18).

As PspA têm sido agrupadas em 6 grupos distintos. De acordo com os padrões de reação cruzada detectada por anti-soros policlonais, estes grupos são classificados em 3 famílias. As principais famílias são a 1 e 2, que incluem mais de 98% das moléculas de PspA (19, 48). Recentemente, a segurança e imunogenicidade da PspA recombinante família 1 foi demonstrada em ensaio clínico fase I. Soro imune foi capaz de proteger camundongos de infecção fatal por pneumococo e soro humano foi protetor para infecção pneumocócica pelos sorotipos 3 e 6, que apresentavam PspA famílias 1 e 2. Estes achados, bem como a detecção de anticorpos contra PspA em soro humano dão suporte para incluir PspA como componente da vacina em humanos (17, 18, 57, 92). A distribuição dos isolados de pneumococos entre PspA das famílias 1 e 2 é semelhante na América do Norte e Europa. Estudos realizados na Colômbia sobre tipagem de PspA de isolados de doença invasiva e de portadores, mostraram que 98% dos pneumococos

pertencem às famílias 1 e 2 (91). Desta forma, uma vacina candidata incluindo essas 2 famílias, poderia cobrir com igual efetividade, isolados da América do Norte, Europa e América do Sul.

#### *Vacina conjugada antimeningocócica*

A meningite meningocócica representa importante problema de saúde pública no mundo, especialmente na África sub-Sahariana, ocorrendo de forma endêmica e em surtos epidêmicos a cada 2 anos (40, 82). A *N. meningitidis* é classificada em 12 grupos, de acordo com as propriedades químicas e antigênicas dos polissacárides capsulares. Porém, somente 5 sorogrupos são responsáveis pela maioria dos casos de doença meningocócica: A, B, C, Y e W135. A doença meningocócica causada pelos sorogrupos Y e W135 ocorre principalmente nos EUA (82). O sorogrupo A é responsável pela doença epidêmica na África (sub-Sahara) e em países em desenvolvimento. Os sorogrupos B e C respondem pela maioria das infecções nos países desenvolvidos, bem como em regiões em desenvolvimento, como o Brasil. No Reino Unido, 32% dos relatos de doença invasiva por *N. meningitidis* em 1996 foram associados ao sorogrupo C. O padrão de doença causada pelo sorogrupo B é tipicamente hiperendêmico ou esporádico em contraste com a natureza endêmica do sorogrupo A (37).

As vacinas polissacarídicas contra os sorogrupos A, C, Y e W135, amplamente utilizadas por vários anos com relativo sucesso em imunização em massa durante epidemias, são eficazes em crianças maiores e adultos, mas são pouco imunogênicas em crianças menores de 5 anos de idade (38, 53). O desenvolvimento e uso das vacinas conjugadas antimeningocócicas oferecem uma alternativa em relação às vacinas polissacarídicas. As vacinas conjugadas para *N. meningitidis* estão em vários estágios de desenvolvimento e de avaliação clínica. Além de serem mais imunogênicas que as polissacarídicas, induzem imunidade de grupo (99). A maioria dos esforços para o desenvolvimento de vacinas conjugadas recaiu primeiramente sobre os sorogrupos A e C, no final da década de 80. Estudos conduzidos em crianças em Gâmbia e Reino Unido

mostraram boa imunogenicidade e tolerabilidade da vacina conjugada bivalente A-C (31, 90). Recentemente, ensaios clínicos em crianças e adolescentes têm mostrado que a vacina antimeningocócica sorogrupo C é segura e imunogênica (14, 28, 76), além do que, induz memória imunológica (58).

Na África, um amplo projeto para eliminar a doença meningocócica epidêmica vem sendo proposto, baseado na utilização de duas vacinas. Uma delas, um produto heptavalente (DPT, hepatite B, Hib, meningocócica conjugada A-C) a ser usada no programa ampliado de imunizações, e uma outra, uma vacina monovalente contra o meningococo A, responsável por 85% da doença meningocócica na África, para ser utilizada na população de 1 a 29 anos (69). Ensaio de campo com ambas as vacinas deverão ser iniciados em breve.

O Reino Unido foi o primeiro país onde a vacina conjugada contra o sorogrupo C foi incorporada à rotina do programa de imunização em novembro de 1999. Após a introdução da vacina em crianças e adolescentes até 18 anos de idade, observou-se redução expressiva da doença meningocócica causada pelo meningococo C (8, 75, 80). Recentemente, Trotter et al. mostraram que, com uma cobertura da vacina de 89%, houve uma redução de 80% na incidência de meningites pelo sorogrupo C e o número de mortes caiu de 78 para 8, no mesmo período (89). No Brasil, a vacina contra o meningococo sorogrupo C foi licenciada em outubro de 2001 (7), mas não faz parte do calendário do Programa Nacional de Imunizações.

O meningococo B constitui um problema relevante nas Américas e Europa, pela alta frequência que causa doença invasiva nestas regiões, e pela não disponibilidade de vacina efetiva até o momento (60, 81). A obtenção de uma vacina contra o meningococo sorogrupo B é tarefa bem mais difícil. A similaridade entre a estrutura polissacáride da cápsula e carboidratos amplamente distribuídos no organismo humano faz com que este antígeno seja autolimitado, ou seja, pobremente imunogênico. Além disto, o uso deste polissacarídeo em uma vacina, pode suscitar a produção de auto-anticorpos (33, 45). Uma alternativa seria a utilização de uma proteína da membrana externa do

meningococo. Entretanto, apesar dessas vacinas induzirem resposta de anticorpos bactericida e protegerem contra o desenvolvimento de doença meningocócica (10, 59, 64, 87) elas não protegem contra as várias cepas heterólogas conhecidas (73). Muitas proteínas não reconhecidas no passado foram descobertas durante o projeto genoma de sequência do meningococo B (72, 88). Algumas destas proteínas induzem anticorpos protetores contra o meningococo sorogrupo B. Assim, temos um novo candidato a vacina contra *N. meningitidis* B, que certamente será segura e capaz de promover ampla proteção homóloga e heteróloga.

### *Considerações Finais*

Neste cenário epidemiológico de pós-introdução da vacina conjugada Hib nas rotinas dos programas de imunização, o grande desafio está no aprimoramento dos sistemas de vigilância. Considerando-se a expressiva diminuição das doenças invasivas bem como do estado de portador do Hib, é fundamental a utilização de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, com o objetivo de detectar precocemente a emergência de outros sorotipos não contidos na vacina contra o *H. influenzae*, inclusive os não tipáveis e isolados do *S. pneumoniae* que poderiam ocupar o nicho ecológico deixado pelo Hib (3, 20, 42, 56, 93). O monitoramento de possíveis falhas vacinais (13, 16), da reemergência de casos da doença invasiva pelo Hib, a despeito de uma boa cobertura vacinal (35), e da suscetibilidade antimicrobiana do *H. influenzae*, incluindo os “não b” (6, 36, 79), e do *S. pneumoniae* (15, 52, 95) são também fundamentais nesta era pós-vacina.

A garantia da incorporação de novas informações epidemiológicas pode ser alcançada com a utilização de técnicas de tipagem molecular na caracterização dos sorotipos invasivos e colonizantes, permitindo desta forma, avaliações sistemáticas da vacina Hib e das futuras vacinas conjugadas do *S. pneumoniae* e da *N. meningitidis*, quando amplamente disponíveis e utilizadas.

## **Agradecimentos**

Este estudo recebeu apoio financeiro da *Pan American Health Organization/PAHO – Division of Immunization and Vaccine/World Health Organization*, Bill e Melinda Gates-Children's Vaccine Program, do CNPq (processo: 520399/00-5) e da Secretaria de Saúde do Município de Goiânia.

## Referências Bibliográficas:

1. Ada G. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 2001; 345(14): 1042-1053.
2. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell ER, Broome CV, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 1993; 269(2): 221-226.
3. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyeh M, Carroll K, et al. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics* 2001; 108(1): E18.
4. Adegbola RA, Mulholland EK, Secka O, Jaffar S, Greenwood BM. Vaccination with a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *H. influenzae* type b among Gambian children. *J Infect Dis* 1998; 177(6): 1758-1761.
5. Agudelo CI, Munoz N, De la Hoz F. [Rapid assessment of the impact of *Haemophilus influenzae* vaccine serotype b in Colombia. Public Health Laboratories]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2000; 8(3): 181-184.
6. Andrade ALSS, Brandileone MC, DiFabio JL, Oliveira RM, Silva SA, Baiocchi SSA, et al. *Haemophilus influenzae* resistance in Latin America: Systematic review of surveillance data. *Microb Drug Resist* 2001; 7(4): 375-389.
7. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde do Brasil [Internet site]. Available: <http://www.anvisa.br> Accessed 25 October 2002.

8. Balmer P, Borrow R, Miller E. Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. *J Med Microbiol* 2002; 51(9): 717-722.
9. Barbour ML, Mayon-White RT, Coles C, Crook DW, Moxon ER. The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1995; 171(1): 93-98.
10. Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 1991; 338(8775): 1093-1096.
11. Black SB, Shinefield HR, Hansen J, Elvin L, Laufer D, Malinoski F. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(12): 1105-1107.
12. Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(3): 187-195.
13. Booy R, Heath PT, Slack MP, Begg N, Moxon ER. Vaccine failures after primary immunisation with *Haemophilus influenzae* type-b conjugate vaccine without booster. *Lancet* 1997; 349(9060): 1197-1202.
14. Bramley JC, Hall T, Finn A, Buttery RB, Elliman D, Lockhart S, et al. Safety and immunogenicity of three lots of meningococcal serogroup C conjugate vaccine administered at 2, 3 and 4 months of age. *Vaccine* 2001; 19(20-22): 2924-2931.
15. Brandileone MC, DiFabio JL, Vieira VS, Zanella RC, Casagrande ST, Pignatari AC, et al. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus*

- pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist* 1998; 4(3): 209-217.
16. Breukels MA, Spanjaard L, Sanders LA, Rijkers GT. Immunological characterization of conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in infants. *Clin Infect Dis* 2001; 32(12): 1700-1705.
  17. Briles DE, Hollingshead S, Brooks-Walter A, Nabors GS, Ferguson L, Schilling M, et al. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine* 2000; 18(16): 1707-1711.
  18. Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, et al. 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* 2000; 182(6): 1694-1701.
  19. Briles DE, Hollingshead SK, Swiatlo E, Brooks-Walter A, Szalai A, Virolainen A, et al. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 1997; 3(4): 401-408.
  20. Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Renna G, Tozzi AE, Garlaschi ML, Mastrantonio P. Characterization of non-type B *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. The HI Study Group. *J Clin Microbiol* 2000; 38(12): 4649-4652.
  21. Dagan R, Sikuler-Cohen M, Zamir O, Janco J, Givon-Lavi N, Fraser D. Effect of a conjugate pneumococcal vaccine on the occurrence of respiratory infections and antibiotic use in day-care center attendees. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(10): 951-958.

22. Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174(6): 1271-1278.
23. Dawson KG, Emerson JC, Burns JL. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18(9): 816-822.
24. Diaz JM, Catalan L, Urrutia MT, Prado V, Ledermann W, Mendoza C, et al. [Trends of etiology of acute bacterial meningitis in Chilean children from 1989 to 1998. Impact of the anti-*H influenzae* type b vaccine]. *Rev Med Chil* 2001; 129(7): 719-726.
25. Dickinson FO, Perez AE, Galindo MA, Quintana I. [Impact of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Cuba]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2001; 10(3): 169-173.
26. Di Fabio JL, Castaneda E, Agudelo CI, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(10): 959-967.
27. Di Fabio JL, de Quadros C. Considerations for combination vaccine development and use in the developing world. *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 4: S340-345.
28. English M, MacLennan JM, Bowen-Morris JM, Deeks J, Boardman M, Brown K, et al. A randomised, double-blind, controlled trial of the immunogenicity and

- tolerability of a meningococcal group C conjugate vaccine in young British infants. *Vaccine* 2000; 19(9-10): 1232-1238.
29. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344(6): 403-409.
  30. Eskola J, Anttila M. Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 543-551.
  31. Fairley CK, Begg N, Borrow R, Fox AJ, Jones DM, Cartwright K. Conjugate meningococcal serogroup A and C vaccine: reactogenicity and immunogenicity in United Kingdom infants. *J Infect Dis* 1996; 174(6): 1360-1363.
  32. FDA. Food and Drugs Administration. First pneumococcal vaccine approved for infants and toddlers [Internet site]. Available: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00716.html>. Accessed 28 November 2001.
  33. Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol* 1987; 138(12): 4402-4407.
  34. Forleo-Neto E, de Oliveira CF, Maluf EM, Bataglin C, Araujo JM, Kunz LF, Jr., et al. Decreased point prevalence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) oropharyngeal colonization by mass immunization of Brazilian children less than 5 years old with hib polyribosylribitol phosphate polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in combination with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine. *J Infect Dis* 1999; 180(4): 1153-1158.

35. Galil K, Singleton R, Levine OS, Fitzgerald MA, Bulkow L, Getty M, et al. Reemergence of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in a well-vaccinated population in remote Alaska. *J Infect Dis* 1999; 179(1): 101-106.
36. Gazagne L, Delmas C, Bingen E, Dabernat H. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3629-3635.
37. Goldblatt D. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 1998; 47(7): 563-567.
38. Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. IV: Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med* 1969; 129(6): 1367-1384.
39. Greenwood B. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354(1384): 777-785.
40. Greenwood BM. The epidemiology of acute bacterial meningitis in tropical Africa. In: Williams JD, Burnie J, eds. Bacterial meningitis. London: Academic Press, 1987: 61-91.
41. Hausdorff W. *Haemophilus*, meningococcus and pneumococcus: comparative epidemiologic patterns of disease. *Int J Clin Pract Suppl* 2001; (118): 2-4.
42. Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357(9260): 950-952.

43. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use: I. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 100-121.
44. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use: II. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 122-140.
45. Hayrinen J, Jennings H, Raff HV, Rougon G, Hanai N, Gerardy-Schahn R, et al. Antibodies to polysialic acid and its N-propyl derivative: binding properties and interaction with human embryonal brain glycopeptides. *J Infect Dis* 1995; 171(6): 1481-1490.
46. Heath PT. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: a review of efficacy data. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(9 Suppl): S117-122.
47. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10): 2759-2762.
48. Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2000; 68(10): 5889-5900.
49. Huebner RE, Mbelle N, Forrest B, Madore DV, Klugman KP. Immunogenicity after one, two or three doses and impact on the antibody response to coadministered antigens of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants of Soweto, South Africa. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21(11): 1004-1007.
50. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65(2): 187-207.

51. Klugman KP. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1(2): 85-91.
52. Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo TS, et al. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 78-86.
53. Krause G, Blackmore C, Wiersma S, Lesneski C, Gauch L, Hopkins RS. Mass vaccination campaign following community outbreak of meningococcal disease. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(12): 1398-1403.
54. Landaverde M, Di Fabio JL, Ruocco G, Leal I, de Quadros C. [Introduction of a conjugate vaccine against Hib in Chile and Uruguay]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 1999; 5(3): 200-206.
55. Levine OS, Schwartz B, Pierce N, Kane M. Development, evaluation and implementation of *Haemophilus influenzae* type b vaccines for young children in developing countries: current status and priority actions. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(9 Suppl): S95-113.
56. Lipsitch M. Bacterial vaccines and serotype replacement: lessons from *Haemophilus influenzae* and prospects for *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(3): 336-345.
57. McCool TL, Cate TR, Moy G, Weiser JN. The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage. *J Exp Med* 2002; 195(3): 359-365.
58. MacLennan JM, Shackley F, Heath PT, Deeks JJ, Flamank C, Herbert M, et al. Safety, immunogenicity, and induction of immunologic memory by a serogroup

- C meningococcal conjugate vaccine in infants: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000; 283(21): 2795-2801.
59. Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 1992; 340(8827): 1074-1078.
  60. Morbidity Mortality Weekly Report. Summary of notifiable diseases, United States, 1998. [Internet site]. Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm4654.pdf>. Accessed 13 January 2003.
  61. Moulton LH, Chung S, Croll J, Reid R, Weatherholtz RC, Santosham M. Estimation of the indirect effect of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in an American Indian population. *Int J Epidemiol* 2000; 29(4): 753-756.
  62. Mulholland K. Strategies for the control of pneumococcal diseases. *Vaccine* 1999; 17 Suppl 1: S79-84.
  63. Murphy TV, Pastor P, Medley F, Osterholm MT, Granoff DM. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Pediatr* 1993; 122(4): 517-523.
  64. Noronha CP, Struchiner CJ, Halloran ME. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case-control study. *Int J Epidemiol* 1995; 24(5): 1050-1057.
  65. Obaro SK, Monteil MA, Henderson DC. The pneumococcal problem. *BMJ* 1996; 312(7045): 1521-1525.
  66. O'Brien KL, Bronsdon MA, Carlone GM, et al. Effect of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal (NP) carriage among

- Navajo and White Mountain Apache (N/WMA) infants. In: Abstracts of the Society for Pediatric Research, Baltimore, MD, USA. 2001; abstract 1463.
67. O'Brien KL, Moulton L, Reid R, et al. Invasive disease efficacy of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine among Navajo and White Mountain Apache (N/WMA) children. In: Abstracts of the Society for Pediatric Research, Baltimore, MD, USA. 2001; abstract 1371.
68. Oostenbrink R, Maas M, Moons KG, Moll HA. Sequelae after bacterial meningitis in childhood. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(5): 379-382.
69. Pan American Health Organization. Meningococcal conjugate vaccines for Africa. In: Abstracts of Conference on Vaccines, Prevention and Public Health: a vision for the future. Washington, DC, USA: PAHO; 2002; abstract page 21.
70. Peltola H. Burden of meningitis and other severe bacterial infections of children in Africa: implications for prevention. *Clin Infect Dis* 2001; 32(1): 64-75.
71. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(2): 302-317.
72. Pizza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000; 287(5459): 1816-1820.
73. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Agents Dis* 1995; 4(1): 13-28.

74. Quagliarello VJ, Scheld WM. Treatment of bacterial meningitis. *N Engl J Med* 1997; 336(10): 708-716.
75. Rappuoli R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. *Vaccine* 2001; 19(17-19): 2319-2322.
76. Rennels MB, Edwards KM, Keyserling HL, Reisinger K, Blatter MM, Quataert SA, et al. Safety and immunogenicity of four doses of *Neisseria meningitidis* group C vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(2): 153-159.
77. Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM, Lima JB, Gouveia EL, Petersen M, et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. *J Infect Dis* 2003; 187(1): 109-116.
78. Ruocco G, Curto S, Savio M, Laurani H, Frocht R. [Vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Uruguay: experience and impact]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 1999; 5(3): 197-199.
79. Sader HS, Gales AC, Granacher TD, Pfaller MA, Jones RN. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates in Latin America: results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-98). *Braz J Infect Dis* 2000; 4(5): 245-254.
80. Salisbury D. Introduction of a conjugate meningococcal type C vaccine programme in the UK. *J Paediatr Child Health* 2001; 37(5): S34-36.
81. Scholten RJ, Bijlmer HA, Poolman JT, Kuipers B, Caugant DA, Van Alphen L, et al. Meningococcal disease in The Netherlands, 1958-1990: a steady increase

- in the incidence since 1982 partially caused by new serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*. *Clin Infect Dis* 1993; 16(2): 237-246.
82. Schwartz B, Moore PS, Broome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2 Suppl: S118-124.
  83. Shinefield H. Pneumococcal conjugate vaccine and ongoing lessons. *Int J Clin Pract Suppl* 2001; (118): 23-25.
  84. Simões LLP, Andrade ALSS, Laval CABP, Oliveira RM, Silva SAE, Martelli CMT, et al. Effectiveness of *H. influenzae* b conjugate vaccine on meningitis in Central Brazil. In: International Journal of Epidemiology. XVI IEA World Congress of Epidemiology of the International Epidemiology Association. Oxford; 2002.
  85. Takala AK, Eskola J, Leinonen M, Kayhty H, Nissinen A, Pekkanen E, et al. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1991; 164(5): 982-986.
  86. Takemura NS, Andrade SM. Meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b em cidades do estado do Paraná, Brasil. *J Pediatr* (Rio J) 2001; 77(5): 387-392.
  87. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* 1999; 281(16): 1520-1527.
  88. Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 2000; 287(5459): 1809-1815.

89. Trotter CL, Ramsay ME, Kaczmarek EB. Meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England and Wales: coverage and initial impact of the campaign. *Commun Dis Public Health* 2002; 5(3): 220-225.
90. Twumasi PA, Jr., Kumah S, Leach A, O'Dempsey TJ, Ceesay SJ, Todd J, et al. A trial of a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in African infants. *J Infect Dis* 1995; 171(3): 632-638.
91. Vela Coral MC, Fonseca N, Castaneda E, Di Fabio JL, Hollingshead SK, Briles DE. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(5): 832-836.
92. Virolainen A, Russell W, Crain MJ, Rapola S, Kayhty H, Briles DE. Human antibodies to pneumococcal surface protein A in health and disease. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(2): 134-138.
93. Waggoner-Fountain LA, Hendley JO, Cody EJ, Perriello VA, Donowitz LG. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin Infect Dis* 1995; 21(5): 1322-1324.
94. Wenger JD, DiFabio J, Landaverde JM, Levine OS, Gaafar T. Introduction of Hib conjugate vaccines in the non-industrialized world: experience in four 'newly adopting' countries. *Vaccine* 1999; 18(7-8): 736-742.
95. Wolf B, Rey LC, Brisse S, Moreira LB, Milatovic D, Fleer A, et al. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(5): 757-765.

96. World Health Organization. Vaccines & Surveillance [Internet site]. Available: <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/HibVacUseMar02.htm>  
Accessed 20 November 2002.
97. World Health Organization. Expert review of a tool for rapidly assessing *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease burden [Internet site]. Geneva, October 2000. Available: <http://www.who.int/vaccines - documents /Docs PDF 01/www 604.pdf>. Accessed 14 November 2002.
98. World Health Organization. Report of a meeting on priorities for pneumococcal and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine development and introduction [Internet site]. Geneva, February 2000. Available: <http://www.who.int/vaccines- documents/DocsPDF01/www530.pdf>. Accessed 20 November 2002.
99. Zollinger WD, in New Generation Vaccines, Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds. Deker, New York, 1997, p. 469; Peltola H, *Drugs* 1998; 55(3): 347.

**ARTIGO**

**Caracterização epidemiológica e padrões fenotípicos e  
genotípicos de isolados de meningites bacterianas  
em crianças no Estado de Goiás**

componente do *Streptococcus pneumoniae* a ser submetido ao *Journal of Clinical Microbiology*

## RESUMO

**Objetivo:** Descrever o perfil epidemiológico das meningites bacterianas em crianças menores de 5 anos, hospitalizadas em Goiânia e comparar os resultados de fenotipagem e tipagem molecular pela eletroforese de campo pulsado (PFGE) na caracterização dos *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* isolados simultaneamente da nasofaringe, líquido e/ou sangue.

**Material e Métodos:** Um Sistema de Vigilância prospectivo populacional, de meningites, foi implementado no município de Goiânia, após a introdução da vacina conjugada contra o *H. influenzae* b (Hib). No período de maio de 2000 a agosto de 2001, o sistema detectou 78 crianças com meningite bacteriana aguda. O diagnóstico clínico-laboratorial baseou-se nos critérios estabelecidos pela OMS. *Swabs* de nasofaringe foram coletados de 54 crianças para detecção de pneumococo e *H. influenzae*. Isolados recuperados de fluidos estéreis (líquor e sangue) e nasofaringe foram estudados do ponto de vista fenotípico (sorotipagem e resistência antimicrobiana) e de tipagem molecular pela PFGE.

**Resultados:** Sessenta e sete por cento dos casos de meningite ocorreram em crianças < 2 anos de idade. A identificação do agente etiológico pela cultura e/ou presença de antígeno no líquido foi de 60,3%. A meningite pelo *S. pneumoniae* foi a mais prevalente (26,9%), seguida pela *Neisseria meningitidis* (17,9%) e *H. influenzae* (16,7%). Três casos de meningite por *H. influenzae* “a” foram detectados. Em 12 (22,2%) das 54 crianças com coleta de *swab*, as bactérias foram isoladas concomitantemente em pelo menos dois sítios clínicos, sendo que em 5 crianças isolou-se o *H. influenzae* e em 7 o *S. pneumoniae*. Obteve-se 12 cepas de *H. influenzae*, com detecção de 3 padrões de restrição (A, B e C) pela PFGE. Foram isoladas 17 cepas de *S. pneumoniae*, com perfil de PFGE evidenciando 10 perfis genéticos. As cepas de *H. influenzae* apresentaram correlação genética entre isolados de um mesmo paciente e entre pacientes enquanto cepas de *S. pneumoniae* apresentaram correlação genética apenas intra-criança.

**Conclusão:** *S. pneumoniae* foi a bactéria predominante em crianças < de 5 anos. Nas meningites pelo *H. influenzae*, detectou-se proporção significativa do sorotipo “a”. A tipagem molecular pela PFGE adiciona informações relevantes para a epidemiologia das meningites por pneumococo e *H. influenzae*, especialmente quando incorporada aos sistemas de vigilância de meningites. A evidência do potencial da utilização da sorotipagem dos isolados de nasofaringe como preditor de cepas de fluidos estéreis de meningites merece ser investigada em estudos futuros.

**Palavras-chave:** meningites bacterianas, epidemiologia molecular, *H. influenzae* b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, vacinas conjugadas.

## SUMMARY

**Objective:** To describe the epidemiological pattern of bacterial meningitis among children less than 5 years old admitted in Goiânia and to compare the results provided by fenotyping and molecular typing using the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Haemophilus influenzae* (Hi) and *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal, and cerebral spinal fluids (CSF) and/or blood.

**Methods:** A population-based prospective surveillance on meningitis was implemented in the municipality of Goiânia, after the introduction of the conjugate Hi type b vaccine (Hib). Between May/2000 and August/2001, the ongoing system detected 78 children with acute bacterial meningitis. Clinical and laboratorial diagnosis followed the WHO guidelines. Nasopharyngeal swabs were collected from 54 children to identify pneumococci and Hi isolates. Bacterial recovered from sterile fluids (CSF and blood) and from nasopharyngeal were studied by fenotyping and PFGE.

**Results:** 66.7% of meningitis cases occurred among children less than 2 years old. The bacterial etiology was identified by CSF culture or presence of antigen in 60.3% of the cases. *S. pneumoniae* was the most prevalent bacterial, followed by the *Neisseria meningitidis* (17.9%) and Hi (16.7%). Three cases of meningitis by Hi serotype “a” were detected. Twelve (22.2%) out 54 children, had isolates simultaneously recovered from at least 2 clinical specimens; Hi was isolated in 5 children and *S. pneumoniae* in 7 children. The 12 strains of Hi corresponded to 3 pulsed-field gel electrophoresis patterns (A, B, C) whereas the 17 strains of pneumococcal yielded 10 patterns. Hi strains recovered from different sites presented genetic correlation “intra” and “inter” children whereas for pneumococcal strains the genetic relatedness was confirmed just for the same child.

**Conclusion:** *S. pneumoniae* was the most prevalent etiological agent of meningitis among children under 5 years old. A significant proportion of *H. influenzae* serotype “a” was detected. The PFGE adds valuable epidemiological knowledge for meningitis caused by *S. pneumoniae* and *H. influenzae*, especially when incorporated into the surveillance systems. The evidence of the potential role of serotyping of

nasopharyngeal isolates as a surrogate measure to ascertain the invasive strains causing meningitis deserves be further investigated.

**Key words:** acute bacterial meningitis, molecular epidemiology, *H. influenzae* b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, conjugate vaccines.

## **Caracterização epidemiológica e padrões fenotípicos e genotípicos de isolados de meningites bacterianas em crianças no Estado de Goiás**

### **Introdução**

Apesar do extraordinário avanço alcançado na última década no diagnóstico e terapêutica das doenças infecciosas, as meningites bacterianas ainda contribuem como causa relevante de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento (Peltola 2000, Kaslow & Moser 2000, Peterson et al. 2001, Hausdorff 2001). Em 1998, de um milhão e meio de óbitos devido a doenças imunopreveníveis, em crianças de todo o mundo, 143.000 foram por meningite, sendo que 97,2% ocorreram em países em desenvolvimento (DiFabio & Quadros 2001). *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* são os principais responsáveis pelas meningites bacterianas, variando sua incidência, segundo a idade e a localização geográfica (Hausdorff 2001). O *H. influenzae* b (Hib) continua sendo o mais importante causador de meningite bacteriana em menores de 5 anos, nos países onde a vacina conjugada Hib não foi implementada (Shann & Steinhoff 1999, Peltola 2000, Reingold 2000). Em recente revisão sistemática de dados de vigilância laboratorial na América Latina, o *H. influenzae* b foi isolado em 1215 casos de meningites no período de 1993 a 1998 (Andrade et al. 2001). Por outro lado, a emergência de cepas de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* com resistência antimicrobiana, inclusive no Brasil, é crescente e preocupante (Hortal et al. 2001, Andrade et al. 2001, Karlowsky et al. 2002, McEllistrem et al. 2002, Reis et al. 2002, Reis et al. 2002a).

*H. influenzae*, *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* têm em comum polissacárides capsulares (embora de estruturas diferentes) que atuam tanto na determinação da virulência, como na indução da formação de anticorpos específicos. A primeira geração de vacinas contra estes microrganismos, consistia no desenvolvimento de polissacárides purificados, incapazes de produzir uma resposta T-dependente e conseqüentemente o

desenvolvimento de memória imunológica, não conferindo proteção satisfatória em crianças menores de 2 anos (Goldblatt 1998, Ada 2001), grupo etário considerado de maior risco para as doenças invasivas causadas por aqueles agentes (Hausdorff 2001). A última década caracterizou-se pelo boom das vacinas conjugadas, lideradas pelo desenvolvimento da vacina conjugada Hib, no início dos anos 90. Mais recentemente, no final da última década, a vacina heptavalente contra o pneumococo, contendo os sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F e a vacina antimeningocócica do sorogrupo C foram disponibilizadas comercialmente, apoiadas por ensaios clínicos realizados em vários países que evidenciaram a segurança e eficácia (Eskola & Anttila 1999, Black et al. 2000, English et al. 2000, Bramley et al. 2001, Eskola et al. 2001, Rennels et al. 2001).

Com a implementação da vacina conjugada para o Hib, houve uma expressiva diminuição das doenças invasivas, bem como redução da colonização do *H. influenzae* b na nasofaringe (Takala et al. 1991, Barbour et al. 1995, Adegbola et al. 1998, Forleo-Neto et al. 1999). Este fato poderia possibilitar a ocupação do nicho ecológico deixado pelo *H. influenzae* tipo b, por outros sorotipos, incluindo os não tipáveis (NT) e mesmo pelo *S. pneumoniae* (Waggoner-Fountain et al. 1995, Lipsitch 1999, Cerquetti et al. 2000, Adderson et al. 2001, Hausdorff et al. 2001). Adicionalmente, no contexto atual de pós vacinação, a queda abrupta da incidência de meningites bacterianas pelo *H. influenzae* b tende a diminuir o valor preditivo dos testes diagnósticos, aumentando a probabilidade de falsos resultados (Ramsay et al. 2001).

Assim, o avanço no conhecimento da epidemiologia do *H. influenzae* e do *S. pneumoniae*, requer novas estratégias de vigilância incorporando abordagens diagnósticas de alta acurácia e alto poder discriminatório na caracterização dos sorotipos invasivos e também dos colonizantes, tendo em vista os efeitos direto e indireto da vacinação. Os métodos de fenotipagem baseiam-se na expressão gênica, incluindo perfil bioquímico, tipos de bacteriófagos, presença de antígenos na superfície das células e perfil de suscetibilidade antimicrobiana. Estas propriedades podem variar por alterações nas condições de crescimento, fase de desenvolvimento e mutação

espontânea, conferindo a estes métodos um menor poder discriminatório (Farber 1996, Tenover et al. 1997). Por outro lado, os métodos de tipagem molecular (genotipagem), como por exemplo, a eletroforese de campo pulsado (PFGE) analisam o DNA genômico e, portanto, menos sujeitos a variações. O DNA bacteriano pode ser alterado por inserções, deleções, ou por mutações aleatórias que podem criar ou eliminar sítios de restrição de endonuclease, modificando o padrão de genotipagem. Assim, métodos moleculares como a PFGE, que utilizam enzimas de restrição com poucos sítios de clivagem, apresentam um poder discriminatório maior do que os métodos de fenotipagem (Sader et al. 1995, Farber 1996, Tenover et al. 1997).

Após a introdução da vacina conjugada Hib no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Brasil, em 1999, um sistema de vigilância prospectivo populacional, de meningites, foi implementado no município de Goiânia. O presente estudo descreve o perfil epidemiológico das meningites bacterianas em crianças menores de 5 anos, detectadas por este sistema de vigilância. Um componente molecular foi adicionado para avaliar o aporte genético pela PFGE na caracterização dos isolados sorotipáveis e não sorotipáveis do *H. influenzae* e *S. pneumoniae* recuperados simultaneamente da nasofaringe, líquido e/ou sangue das crianças com meningite bacteriana.

## **Material e Métodos**

### *População e área de estudo*

O delineamento deste estudo descritivo, consiste de uma série de casos com finalidade de vigilância (Grimes & Schulz 2002) e integra o componente de meningites bacterianas do **Projeto Multicêntrico de Vigilância do *S. pneumoniae* e *H. influenzae*** que vem sendo desenvolvido desde maio de 2000 no município de Goiânia (Andrade 2002, Simões 2002). Nesta investigação, um sistema de vigilância ativa, prospectiva,

populacional, foi implementado com o objetivo de aumentar a acurácia do diagnóstico de meningites bacterianas em crianças menores de 5 anos admitidas em 11 hospitais pediátricos do município. Goiânia é responsável pelo atendimento de 70% dos casos de meningite de todo o Estado de Goiás. A população de crianças menores de 5 anos é estimada em 491.463 habitantes (IBGE 2002). Em julho de 1999 a vacina conjugada contra o *H. influenzae* tipo b foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações. Dados do Ministério da Saúde registraram uma cobertura de 90% para o Estado, durante o período de estudo. As vacinas conjugadas anti *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* sorogrupo C, recém licenciadas para uso no Brasil, respectivamente em fevereiro e outubro de 2001 (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde do Brasil), ainda não fazem parte do calendário oficial de imunização do Ministério da Saúde.

O protocolo da investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da UFG e pelo Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP) atendendo à resolução 196/96. Consentimento informado por escrito para participação no estudo foi obtido dos responsáveis pela criança, que responderam a um questionário para avaliação de possíveis fatores de risco (ver em Anexos).

#### *Definição de caso de meningite*

O diagnóstico de meningite bacteriana aguda seguiu os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde do Brasil (World Health Organization 1999, Ministério da Saúde do Brasil 1999). Caso confirmado foi definido pelo isolamento da bactéria ou detecção de antígeno (aglutinação em látex ou contraímuno eletroforese) em líquido ou sangue. A suspeita clínica de meningite sem a detecção do agente específico mediante a presença de líquido turvo, e ainda, proteinorraquia  $\geq 100\text{mg/dl}$ , ou glicorraquia  $\leq 40\text{mg/dl}$ , ou leucorraquia  $\geq 100$  células/ $\text{mm}^3$  com  $\geq 80\%$  de neutrófilos, foi definido como meningite bacteriana inespecífica (MBA).

### *Coleta de swabs de nasofaringe*

*Swabs* de nasofaringe (narina direita e esquerda) foram coletados através da introdução de *transwab* ultrafino, flexível, em cada uma das narinas da criança, à aproximadamente 2/3 da distância entre o nariz e o lóbulo da orelha, na direção horizontal. Ao encontrar resistência na parede posterior da nasofaringe, foram realizados movimentos rotatórios. Os *transwabs* foram acondicionados em meio para transporte (Medical Wire & Equipment Corsham, UK) e enviados para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

### *Isolamento e identificação fenotípica bacteriana*

As análises laboratoriais de líquido e sangue seguiram as recomendações da OMS (World Health Organization 1999) e foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Goiás (LACEN). O líquido coletado após punção lombar foi imediatamente semeado em meio de cultura ágar chocolate, incubado em jarra de anaerobiose, com tensão de CO<sub>2</sub> de 5 a 10% obtida com chama de vela, a 37°C por 48 horas e gotejado em lâminas de vidro para a bacterioscopia. A amostra foi dividida em 2 alíquotas, sendo uma delas utilizada para exames citoquímicos. Nos casos de cultura negativa, o líquido foi submetido à pesquisa de antígenos pela contraímunoeletroforese e pela aglutinação do látex (BioMérieux). Sangue coletado em volume de um a três mL foi inoculado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com anticoagulante SPS (Polianetol Sulfonato de Sódio) e incubado à 37°C por 5 dias com repiques diários, em ágar chocolate. As colônias desenvolvidas foram submetidas à coloração de Gram e identificação bioquímica.

Os *swabs* foram semeados em ágar sangue suplementado com gentamicina e em ágar chocolate com bacitracina, para pesquisa de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* respectivamente. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, com tensão de

CO<sub>2</sub> de 5 a 10% obtida com chama de vela, a 37°C por 24 a 48 horas (WHO & CDC 1994).

As colônias suspeitas de *Haemophilus* foram submetidas à coloração de Gram e às provas de requerimento de fator V e X, satelitismo e série bioquímica. Os biotipos de *H. influenzae* foram determinados de acordo com a produção da urease, ornitina descarboxilase e prova do indol. A sorotipagem foi realizada em paralelo, empregando os anti-soros anti-Hi (a-f) simultaneamente. As colônias com características de *S. pneumoniae* foram submetidas à coloração de Gram e às provas de susceptibilidade à optoquina (Yagupsky et al. 1998), oxacilina e solubilidade em bile (Ruoffs et al. 1995). A sorotipagem foi baseada na reação de Quellung (Lund & Henrichsen 1978), com anti-soros específicos produzidos pelo *Statens Seruminstitut* (Copenhague, Dinamarca). As bactérias isoladas foram armazenadas em leite desnatado a -20°C e/ou liofilizadas. As provas de susceptibilidade (NCCLS 2001, NCCLS 2001a) e sorotipagem do *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, foram realizados no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

#### *Caracterização genotípica dos isolados*

A tipagem genética de isolados de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* detectados em dois ou três sítios da mesma criança foi realizada por eletroforese em campo pulsado (PFGE) no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, por um dos investigadores do projeto. Neste método de análise utiliza-se enzimas de restrição com poucos sítios de clivagem, resultando em um menor número de fragmentos de DNA. Estes fragmentos (bandas) são separados em eletroforese de campo pulsado, de acordo com a carga elétrica e peso molecular.

As cepas de *H. influenzae* foram cultivadas em ágar chocolate e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5-10%) por 18 horas. Uma suspensão de células foi preparada em solução fisiológica a 0,85% até atingir uma densidade óptica de 650nm (OD<sub>650nm</sub>) e foram preparados discos com agarose de baixo ponto de fusão (1,5%). A lise celular foi realizada com tampão de lise EC (1M NaCl; 100mM EDTA; 6mM Tris-HCl; 0,5%

polioxietileno cetil éter; 0,5% desoxicolato de sódio; 0,5% N-laurilsarcocina; pH 7,6) contendo lisozima (1mg/mL) e 20µg/mL RNase, com incubação a 37°C por 18 horas. Após este período, foram incubados em tampão ES (0,5M EDTA; N-laurilsarcocina; pH 8,5) suplementado com 100µg de proteinase K a 50°C por 24 horas. Os discos foram lavados com solução tampão TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 7,6) a temperatura ambiente por 30 minutos, 5 vezes. Os discos de agarose, contendo o DNA, foram incubados em tampão da enzima por 20 minutos e colocados nos orifícios do gel de agarose a 1%. O DNA foi digerido com 12U da enzima *Sma*I. A eletroforese foi realizada com tampão Tris-borato EDTA 0,5Mm (TBE) empregando o equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad), a temperatura de 14°C durante 23 horas, em campo elétrico de 5v/cm com pulsos de 1 a 20 segundos. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5mg/L durante 30 minutos, visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado (Soares et al. 1993, Curran et al. 1994).

As cepas de *S. pneumoniae* foram repicadas em ágar sangue e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5-10%) por 18 horas. Em seguida, obteve-se uma suspensão bacteriana de 10<sup>9</sup> células/mL e os discos preparados com agarose de baixo ponto de fusão. Após a solidificação, foram incubados em tampão de lise (1M NaCl; 100mM EDTA ; 6mM Tris-HCl; 0,5% polioxietileno cetil éter; 0,5% desoxicolato de sódio; 0,5% N-laurilsarcocina; pH 7,6) contendo lisozima (1mg/mL) e 50µg de RNase a 37°C por 5 horas. Posteriormente, foram incubados em tampão ES (0,5M EDTA; N-lauril sarcocina; pH8,5) suplementados com 100µg de proteinase K a 50°C por 18 horas. Os discos foram lavados com tampão TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 7,6) a temperatura ambiente por 30 minutos, 5 vezes. Os discos de agarose, contendo o DNA, foram incubados em tampão da enzima por 20 minutos e colocados nos orifícios do gel de agarose a 1%. O DNA foi digerido com 15U da enzima *Sma*I a temperatura ambiente por 18 horas. A eletroforese foi realizada com tampão Tris-borato EDTA 0,5 Mm (TBE) empregando o equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad), à temperatura de 14°C durante 23 horas, em campo elétrico de 6v/cm com pulsos de 1 a 30 segundos. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5mg/L durante 50 minutos, visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado (Soares et al. 1993).

## Análise de dados

A análise de dados foi realizada com o pacote estatístico EpiInfo, versão 6.04. Teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar diferenças entre proporções e o teste t de *Student* para avaliar diferenças entre médias. As médias das características citoquímicas foram avaliadas após a retirada dos valores extremos. Prevalências e respectivos intervalos de 95% de confiança (IC 95%) foram estimados. Valores de *p* menores de 5% e IC 95% não sobreponíveis foram considerados resultados estatisticamente significantes.

A interpretação dos padrões da PFGE seguiram os critérios propostos por Tenover (Tenover et al. 1995, Tenover et al. 1997): (i) **cepas geneticamente indistinguíveis**, quando os isolados apresentaram padrão de restrição com o mesmo número e tamanho de fragmentos (bandas) de DNA. A interpretação epidemiológica foi de que os isolados representavam a mesma cepa; (ii) **cepas provavelmente relacionadas**, quando os isolados apresentaram 2 ou 3 bandas diferentes no padrão do PFGE, resultante de um único evento genético; (iii) **cepas possivelmente relacionadas**, quando os isolados apresentaram entre 4 a 6 bandas diferentes no padrão do PFGE, consistentes com 2 eventos genéticos independentes. Nesta situação os isolados podem pertencer a uma mesma linhagem genética, não sendo provavelmente relacionados; (iv) **cepas não relacionadas**, quando os isolados apresentaram mais de 6 bandas diferentes no padrão do PFGE, consistentes com 3 ou mais eventos genéticos independentes. Os eventos genéticos aqui referidos, podem ser de mutação com adição ou perda de um sítio de restrição, ou de inserção ou deleção de DNA, estes não contendo sítios de restrição. O padrão de restrição do DNA de isolados foram designados com letras, **A**, **B**, **C**, etc, cada uma referente a um perfil específico de restrição enzimática. O perfil de isolados geneticamente indistinguíveis foram designados com letras iguais. Cepas provavelmente e possivelmente relacionadas geneticamente, foram designadas com letras iguais acrescidas de um número, **A1 A2**, **B1 B2**, **C1 C2**, etc. Os padrões referentes aos isolados não relacionados foram designados com letras diferentes.

## Resultados

Durante 16 meses de investigação (maio/2000-agosto/2001) o sistema de vigilância implementado pelo estudo detectou 78 casos de meningite bacteriana aguda em crianças menores de 5 anos, admitidas em seis hospitais de Goiânia: Hospital Materno Infantil, Hospital de Doenças Tropicais, Hospital da Criança, Hospital Infantil de Campinas, Instituto Goiano de Pediatria e Pronto Socorro Infantil de Goiânia. As principais variáveis clínico-epidemiológicas das crianças encontram-se na Tabela 1. A maioria dos casos (66,7%) ocorreu em menores de 2 anos de idade. Para as meningites bacterianas com agente etiológico especificado, a média de idade foi de 18,1 meses, enquanto para as inespecíficas, foi de 26,1, diferença não estatisticamente significativa. Houve predomínio do sexo masculino ( $p < 0,05$ ). Das crianças pertencentes à faixa etária alvo da vacinação (2 meses a 2 anos de idade), 9,1% não haviam recebido nenhuma dose da vacina conjugada Hib. A letalidade geral foi de 18,2%, sendo 23,1%, 28,6% e 7,1% respectivamente por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*. A letalidade incluindo somente as meningites bacterianas inespecíficas (MBA) foi de 12,0%, não diferindo da letalidade de 18,2% por todas as causas.

A identificação do agente etiológico pela cultura e/ou presença de antígeno no líquido foi de 60,3% (IC 95% 48,5-71,2). A meningite por *S. pneumoniae* foi a mais prevalente (26,9%), seguida das meningites por *N. meningitidis* (17,9%) e *H. influenzae* (16,7%). Das 21 meningites por *S. pneumoniae*, 10 casos foram diagnosticados pela cultura de líquido, 8 pela aglutinação em látex e em 3 casos, a detecção ocorreu em ambas as técnicas. Dos 14 casos de *N. meningitidis*, 11 foram detectados pela cultura de líquido, com concomitância de resultado com a aglutinação em látex em 1 caso. Em dois casos a *N. meningitidis* foi detectada concomitantemente pela aglutinação em látex e pela contraímunoelctroforese (CIE). Um caso foi detectado somente pela hemocultura. Dos 13 casos de meningite por *H. influenzae*, 9 foram identificados pela cultura de líquido, 3 pela aglutinação em látex e 1 pela CIE. Coletas de sangue e de swabs de nasofaringe foram realizadas em 54 crianças, a despeito dos 78 casos de meningite bacteriana detectados, por dificuldades operacionais do Sistema de Vigilância, quando a

criança era internada no período noturno. A prevalência de portadores de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* na nasofaringe foi 31,5% e 18,5%, respectivamente (Tabelas 1 e 3).

Quanto às características citoquímicas do líquido, os níveis de glicose foram mais baixos nas meningites específicas (média = 21,1mg/dL) do que nas inespecíficas (média = 51,9mg/dL). Os valores de proteínas foram em média maiores nas meningites específicas (94,5mg/mm<sup>3</sup>) do que nas inespecíficas (73,0mg/mm<sup>3</sup>). Variáveis clínicas como duração da doença antes da internação, uso de antimicrobiano prévio e ocorrência de óbito, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Tabela 2).

Dos 14 casos de meningite por *N. meningitidis*, 10 (71,4%) foram causados pelo sorogrupo B e 4 (28,6%) pelo sorogrupo C.

Dos 13 casos de meningite por *H. influenzae*, 9 (69,2%) ocorreram em crianças menores de 2 anos de idade, com média de idade de 7 meses. Destas nove crianças, uma não era vacinada e oito haviam recebido pelo menos uma dose da vacina conjugada Hib. O sorotipo b foi responsável por 76,9% dos casos, nos quais ocorreram três óbitos. O sorotipo “a” foi detectado em 3 casos (Tabela 4).

*S. pneumoniae* foi isolado do líquido de 13 crianças, sendo que apenas uma apresentava idade superior a 2 anos. A média de idade foi de 12,5 meses (desvio padrão = 14,3). Observou-se um predomínio do sexo masculino, diferentemente do observado nas meningites por *H. influenzae*, nas quais não houve diferença significativa entre os sexos. Os sorotipos predominantes foram 14 (30,8%) e 6B (23,1%). Três crianças que apresentaram meningite pelos sorotipos 6B, 19F e 10A evoluíram para o óbito (Tabela 5).

O isolamento de *H. influenzae* ocorreu simultaneamente em dois ou mais sítios de 5 crianças de diferentes cidades do Estado, obtendo-se 12 isolados de biotipos I e II, e sorotipos a, b e NT (Tabela 6). A análise genotípica pela PFGE, detectou 3 padrões diferentes: **A**, **B** e **C** (Figura 1). O padrão **A** foi caracterizado por 10 fragmentos de restrição com pesos moleculares de 242,5 a 48,5Kb. Com relação ao perfil **B**, foram detectadas 9 bandas (1018,5 a 48,5 Kb). Um único isolado de *H. influenzae* foi

caracterizado com o padrão **C** (8 fragmentos de restrição), representando uma cepa isolada de líquido, resistente à ampicilina. Apesar dos 3 padrões obtidos pela PFGE diferirem em apenas um ou dois fragmentos, podendo, portanto, serem classificados como cepas relacionadas, o peso molecular dos fragmentos foi diferente. As cepas isoladas do líquido e sangue do caso 1 foram indistinguíveis geneticamente da cepa da nasofaringe do caso 2 e das cepas recuperadas do líquido e sangue do caso 9 (padrão **A**), sendo os 3 casos oriundos de diferentes municípios do Estado. O padrão fenotípico destas cepas foi o mesmo (sorotipo b, biótipo I). O *H. influenzae* não tipável (NT) isolado da nasofaringe do caso 1 apresentou o mesmo perfil genético (padrão **B**) dos isolados de líquido e sangue dos casos 3 e 13, e da nasofaringe do caso 3, caracterizados como sorotipo “a”. Estas cepas foram procedentes de regiões geográficas distintas. O padrão genotípico **B** apresentou biótipo II, sorotipo “a” ou NT.

Sete crianças procedentes de diferentes municípios apresentaram o *S. pneumoniae* em dois ou mais sítios, correspondendo a 17 isolados que foram identificados em 7 sorotipos, com predomínio do 6B (29,4%) e do 14 (23,5%) (Tabela 7). Os isolados foram caracterizados em 10 perfis genotípicos, representados pelas letras de **D** a **M**, com uma elevada diversidade no número e tamanho dos fragmentos de restrição (Figura 2). Os perfis **J**, **K** e **L** representam cepas resistentes à penicilina.

## Discussão

Este estudo conduzido 2 anos após a introdução da vacina Hib, detectou 78 casos de meningite bacteriana, dos quais 17% foram por *H. influenzae* (13% pelo sorotipo b) e 27% pelo *S. pneumoniae*. Nos Estados Unidos da América (EUA), onde a vacina conjugada Hib foi implementada no início dos anos 90, o *H. influenzae* b representa, atualmente, 2% dos casos de meningite bacteriana aguda, enquanto o *S. pneumoniae* responde por quase 40% dos casos (Hausdorff 2001). O declínio das infecções causadas pelo *H. influenzae* b tem sido evidenciado em vários países onde a vacina foi amplamente introduzida nos programas de imunização, inclusive na América

Latina (Ruocco et al. 1999, Landaverde et al. 1999, Agudelo et al. 2000, Takemura & Andrade 2001, Simões et al. 2002, Ribeiro et al. 2003).

A ocorrência de 3 casos do sorotipo “a” do *H. influenzae* ocorridos em curto período, ressalta a importância da implementação do monitoramento das meningites após a introdução da vacina. De fato, o aumento de casos de *H. influenzae* não b em doença invasiva tem sido detectada nos EUA e Europa, onde a vacina foi introduzida há mais de uma década (Waggoner-Fountain et al. 1995, Heath et al. 2001, Omikunle et al. 2002). No Brasil, resultados de vigilância laboratorial conduzida pelo Instituto Adolfo Lutz referente às duas décadas que antecederam a introdução da vacina Hib conjugada, mostraram que o sorotipo “a” foi detectado em apenas 0,5% de 3.402 cepas de *H. influenzae*, 90% delas recuperadas do liquor (Zanella et al. 2002). Recentemente, um estudo de vigilância de meningites por *H. influenzae* realizado em Salvador, mostrou que o risco de adquirir meningite pelo sorotipo “a” aumentou consideravelmente, com coeficientes de incidência aumentando de 0,02 para 0,16 casos por 100.000, após o primeiro ano de utilização da vacina anti Hib (Ribeiro et al. 2003).

Apenas duas das 13 crianças com meningite pelo *H. influenzae* estavam adequadamente vacinadas, considerando-se o número de doses da vacina e a idade da criança (sorotipo “a” e sorotipo “b”). A possibilidade de falha da vacina Hib e óbito em uma destas crianças provavelmente foi em decorrência da criança ser portadora de Síndrome de Down. Entretanto, uma cepa de *H. influenzae* b, com este mesmo perfil genotípico (perfil A), foi isolada de uma criança de 8 meses, procedente de outro município, não vacinada, que também apresentou evolução fatal. Esta cepa também foi encontrada na nasofaringe de outra criança. Falhas da vacina podem ocorrer em decorrência de níveis insuficientes de anticorpos protetores e/ou fatores inerentes ao hospedeiro (Holmes et al. 1991, Moxon et al. 1999, Breukels et al. 2001). A proteção sorológica contra a doença invasiva é obtida a partir de concentrações acima de 0,15 µg de anticorpos enquanto a proteção duradoura é alcançada com valores acima de 1,0 µg (Anderson 1984, Eskola et al. 1987, PAHO & WHO 2001).

Além da reconhecida eficácia da vacina Hib na redução dos casos de doença invasiva e do estado de portador (Takala et al. 1991, Barbour et al. 1995, Adegbola et al. 1998, Forleo-Neto et al. 1999), discute-se a possibilidade de que outros sorotipos não b do *H. influenzae* e o *S. pneumoniae* possam ocupar o nicho ecológico deixado pelo Hib (Waggoner-Fountain et al. 1995, Lipsitch 1999, Cerquetti et al. 2000, Adderson et al. 2001, Hausdorff et al. 2001). Não foi observado neste estudo diferença estatisticamente significativa entre a prevalência de meningite por *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Entretanto, Simões et al. em estudo realizado no Estado de Goiás, mostraram um aumento na incidência de meningite por *S. pneumoniae*, inclusive em um período que antecedeu à introdução da vacina. Este fato, portanto, não estaria relacionado à vacinação, mas, provavelmente, à incorporação de métodos diagnósticos de maior acurácia, a partir de 1998, no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Goiás (LACEN) (Simões et al. 2002). A alta letalidade do *H. influenzae* de 23% detectada neste estudo, observada após um ano da introdução da vacina, pode ser justificada entre outras causas, em decorrência do pequeno número de isolados. Dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) mostram que nos últimos dois anos que antecederam a introdução da vacina, a letalidade por meningites causadas pelo *H. influenzae* no Brasil, variou de 14,9 a 18,0%, com um coeficiente de incidência variando de 7,1 a 9,4 por 100.000 crianças menores de 5 anos, no mesmo período.

Dos 13 casos de meningite bacteriana pelo *S. pneumoniae*, 10 foram por sorotipos contidos na vacina heptavalente (Prevnar<sup>IM</sup> Wyeth Lederle), recentemente licenciada para uso no Brasil. Desta forma, pode-se estimar que a implementação da vacina, implicaria em uma cobertura de 76,9% (IC95% 46,2-95,0) desses sorotipos, semelhante às coberturas esperadas para os casos de meningite do Brasil (DiFabio et al. 2001, Reis et al. 2002, Brandileone et al. 2003). Um dado interessante foi a detecção do *S. pneumoniae* sorotipo 10A em um caso de meningite bacteriana com evolução fatal. No Brasil, resultados de vigilância laboratorial incluindo 3.714 *S. pneumoniae* isolados de crianças com meningite nos últimos 20 anos, mostraram baixa frequência deste sorotipo (Brandileone et al. 2003).

A resistência antimicrobiana do *S. pneumoniae* tem sido associada aos sorotipos 6B, 14, 19F e 23F (Porat et al. 2001, Richter et al. 2002). Com exceção do 19F, todos estes sorotipos foram detectados neste estudo. A maioria dos pneumococos foram sensíveis à penicilina, bem como os *H. influenzae* à ampicilina. No Brasil, uma investigação de meningites de base populacional, conduzida na cidade de Salvador por Reis et al., mostrou que 94% dos pneumococos resistentes à penicilina, isolados de crianças menores de 5 anos, eram dos sorotipos 6B, 14, 19F e 23F e que 6,7% dos isolados de *H. influenzae* eram resistentes à ampicilina e cloranfenicol (Reis et al. 2002, Reis et al 2002a). Estudos que utilizaram PFGE para caracterizar cepas de pneumococos obtidas de diferentes regiões geográficas do país, também evidenciaram a associação do sorotipo 14 com a resistência intermediária à penicilina, evidenciando uma disseminação clonal (Brandileone et al. 1998). Ko et al. através de uma investigação de casos de meningite pneumocócica na cidade de Salvador, encontrou 13% de isolados de *S. pneumoniae* com resistência intermediária à penicilina, com predominância do sorotipo 14. Através do método de *BOX PCR* (genotipagem), foi demonstrado que os isolados sorotipo 14 eram geneticamente relacionados e apresentavam padrão de *BOX PCR* similar ao de isolados de *S. pneumoniae* de outras cidades brasileiras (Ko et al. 2000).

Enquanto em países industrializados existe uma notabilidade da qualidade dos programas de vigilância, com altas taxas de detecção do microrganismo, em regiões em desenvolvimento, a identificação do agente etiológico no líquido e/ou sangue ainda permanece como um dos desafios para os sistemas de vigilância das meningites bacterianas. Uso prévio de antimicrobianos, procedimentos técnicos inadequados de coleta, transporte e processamento dos espécimes clínicos, são fatores que interferem no isolamento microbiano. Mesmo em vigência de vigilância intensificada, o isolamento bacteriano e/ou presença de antígeno nas meningites com líquido turvo não tem sido alto. Neste contexto, Gomez et al. obtiveram 28,4% de confirmação etiológica após implementação de vigilância populacional prospectiva, na República Dominicana (Gomez et al. 2000). Neste estudo, o rendimento de 60,3% da detecção bacteriana no líquido, poderia estar subestimado considerando-se os 21% de casos que referiram uso prévio de antimicrobiano. No Brasil, esta informação não está disponível na maioria dos

casos de meningite (Weiss et al. 2001). Apesar dos 19,2% de casos sem esta informação, não houve diferença estatisticamente significativa desta variável em relação às meningites específicas e inespecíficas, neste estudo.

A última década caracterizou-se pela “molecularização” da epidemiologia e neste vácuo emergiram várias técnicas de tipagem molecular com o objetivo de caracterizar isolados sorotipáveis e não sorotipáveis (Kaslow & Moser 2000). O delineamento deste estudo permitiu que se comparasse o padrão fenotípico e genotípico entre cepas colonizadoras e invasivas de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* de uma mesma criança. O racional assumido para escolha da PFGE neste estudo levou em conta alguns aspectos: (i) alto poder discriminatório deste sistema de tipagem; (ii) possibilidade de reduzir alguns problemas que ocorrem nas análises de microrestrição enzimática, nas quais o DNA é digerido em inúmeros fragmentos resultando em centenas de bandas no gel; (iii) ser considerado o padrão ouro para a caracterização de *H. influenzae*, principalmente os não tipáveis (Pettigrew et al. 2002). Uma limitação do método é o tempo requerido para a realização da análise além do custo relativamente alto do equipamento. Desta forma, a inclusão deste método nas rotinas dos laboratórios de microbiologia não é custo-eficiente, sendo mais adequado a utilização desta técnica pelos laboratórios de referência e de pesquisa.

A análise genética pela PFGE realizada neste estudo, confirmou a identidade de bactérias isoladas dos diferentes sítios clínicos, mostrando que o microrganismo se dissemina a partir da nasofaringe. No entanto, a evidência da correlação genética das cepas colonizadoras e invasivas de *H. influenzae* foi pequena, sendo o isolado colonizante menos preditivo da cepa invasiva, diferentemente do observado em outros cenários epidemiológicos. Estudo conduzido por Saito et al. mostrou esta similaridade de perfis genotípicos de *H. influenzae* isolados de diferentes sítios de uma mesma criança (Saito et al. 1999). Neste estudo chama a atenção, a similaridade do perfil genético obtido pela PFGE do *H. influenzae* NT isolado da nasofaringe de uma criança, com 4 cepas invasivas de sorotipo “a”. A emergência de clones com elevada virulência de *H. influenzae* não b, tem resultado em um aumento de doenças invasivas por outros sorotipos de *H. influenzae*, principalmente “a”, “e” e “f” (Omikunle et al. 2002).

Hipóteses que poderiam explicar estes achados seriam a perda capsular do *H. influenzae* decorrente de mecanismo de recombinação pela transformação bacteriana ou a não expressão capsular (Ogilvie et al. 2001). Esta última possibilidade encontra respaldo nos estudos de Falla et al. que utilizando a técnica de PCR, detectaram isolados não capsulados que apresentavam o gene capsular. Uma das explicações plausíveis seria uma possível deleção do gene *bexA*, responsável pela expressão capsular do *H. influenzae* (Falla et al. 1994).

A característica clonal de dispersão do *H. influenzae* inter e intra indivíduos, observada neste estudo, tem sido descrita por outros autores (Weinberg et al. 1989, Smith-Vaughan et al. 1998, Raymond et al. 2001). Em estudo realizado em isolados de adenóide e da parede lateral do nariz de crianças com rinosinusite, a caracterização genotípica de 18 pares bacterianos (*Moraxella catarrhalis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*), revelou similaridade de 16 (89,0%) pares, mostrando que as bactérias que causam rinosinusite aguda são detectadas concomitantemente na nasofaringe e parede lateral do nariz das crianças. O perfil protéico de proteínas da membrana externa de 14 pares de *H. influenzae* NT isolados da nasofaringe e de secreção do ouvido de crianças com otite média, mostrou a similaridade das proteínas em 10 pares (Villasenor-Sierra & Santos 1999). Almeida confirmou a característica clonal de *H. influenzae* invasivos, resistentes à ampicilina e/ou cloranfenicol, pela constatação de dois tipos genéticos predominantes no Brasil. Entretanto, a presença de subtipos indica que a população bacteriana pode estar envolvida em processos de transformação genética (Almeida 2001).

Enquanto para o *H. influenzae* observou-se perfis genotípicos idênticos inter e intra criança, para o *S. pneumoniae* observou-se identidade apenas intra criança. Ou seja, os 10 perfis genotípicos de pneumococos não se repetiram de um caso para outro. Relatos prévios têm descrito uma boa concordância entre os sorotipos e os genótipos de pneumococos isolados de líquido (Enright et al. 1999). No entanto, informações referentes à relação entre pneumococos recuperados de nasofaringe e de líquido no mesmo indivíduo são escassas. Perfis diferentes de PFGE foram detectados para os *S. pneumoniae* pertencentes ao mesmo sorotipo, por exemplo, o tipo 14 (casos 17 e 19),

isolados de diferentes crianças. A genotipagem pela PFGE de *S. pneumoniae* invasivos, isolados no Brasil, mostra elevada diversidade cromossomal, com inúmeros tipos e subtipos (Brandileone et al. 1998). Esta diversidade genética do *S. pneumoniae* colonizador e invasivo também tem sido observada por outras técnicas moleculares (Wolf et al. 2000). Este estudo fornece evidências de que isolados de nasofaringe estão diretamente implicados na patogênese das meningites em crianças (casos 14 e 19), embora, nem sempre, os isolados de portador foram geneticamente relacionados com os isolados causando doença invasiva (casos 15 e 16). Este fato pode ser explicado em parte, pela substituição da cepa colonizadora do pneumococo disseminada para o sangue, por cepas com grande diversidade genética (Gray et al. 1980, Smith et al. 1993). De fato, tem-se evidenciado, que a diversidade genética do pneumococo é maior entre cepas colonizadoras do que entre as invasivas (Robinson et al. 2001). Este padrão genotípico do pneumococo, foi também descrito por Doit et al. que mostraram a heterogeneidade genética das cepas de *S. pneumoniae* isoladas de líquido de diferentes pacientes com meningite (Doit et al. 2000).

Investigações em crianças com infecção do trato respiratório inferior têm evidenciado o valor preditivo de isolados colonizadores de pneumococo e de *H. influenzae* na determinação do agente causal da doença invasiva (Shann et al. 1984, Mastro et al. 1993, Ussery et al. 1996, Joloba et al. 2001). A OMS, em seus protocolos de vigilância, e respaldada por estudos realizados em diversos continentes, tem preconizado o monitoramento das taxas de resistência de isolados de nasofaringe de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* de crianças com infecções respiratórias como preditores da resistência em situação de doença (WHO & CDC 1994; Mastro et al. 1993, Dagan et al. 1996, Ostroff et al. 1996, Lehmann et al. 1997, Rowe et al. 2000, Robinson et al. 2001). No entanto, para as meningites bacterianas, há carência de estudos sobre a correlação entre cepas colonizadoras e invasivas. Recentemente, Lucher et al. conduziram um estudo em área rural do Alasca, demonstrando através de técnicas de tipagem molecular, que cepas de *H. influenzae* b causando doença invasiva, a despeito da ampla vacinação contra o Hib, não podiam ser distinguíveis geneticamente de cepas de portador em crianças vacinadas (Lucher et al. 2002).

O delineamento deste estudo permitiu aventar a hipótese da similaridade do *S. pneumoniae* da nasofaringe com os isolados do liquor e sangue. Para o *H. influenzae* esta similaridade foi menor. Estudos futuros com um maior número de amostras poderão ser úteis para testar estas hipóteses. Adicionalmente, a caracterização genotípica incorporada ao Sistema de Vigilância poderá auxiliar no monitoramento da emergência e dispersão clonal destas bactérias, bem como dos mecanismos implicados na resistência antimicrobiana. Este monitoramento poderá fornecer subsídios para ações específicas de Saúde Pública, visando o controle das meningites em menores de 5 anos e a implementação de novas vacinas no contexto epidemiológico atual.

## **Agradecimentos**

Este estudo recebeu apoio financeiro da *Pan American Health Organization/PAHO – Division of Immunization and Vaccine/World Health Organization*, Bill e Melinda Gates-Children's Vaccine Program, do CNPq (processos: 520399/00-5; 520580/00-1 e 300443/97-3) e da Secretaria de Saúde do Município de Goiânia.

## Referências Bibliográficas

- Ada G 2001. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 345: 1042-1053.
- Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyeh M, Carroll K, Mottice S, Korgenski EK, Christenson JC, Pavia AT 2001. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics* 108 (1): E18.
- Adegbola RA, Mulholland EK, Secka O, Jaffar S, Greenwood BM 1998. Vaccination with a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *H. influenzae* type b among Gambian children. *J Infect Dis* 177: 1758-1761.
- Agudelo CI, Munoz N, De la Hoz F 2000. [Rapid assessment of the impact of *Haemophilus influenzae* vaccine serotype b in Colombia. Public Health Laboratories]. *Rev Panam Salud Publica* 8: 181-184.
- Almeida SCG, Epidemiologia Molecular do *Haemophilus influenzae* b resistente a ampicilina e/ou cloranfenicol, isolado no Brasil, no período de 1996-1999. In: *Dissertação para obtenção de título de mestre*. 2001, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo: São Paulo
- Anderson P 1984. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 149: 1034-1035.
- Andrade ALSS 2002. Insights into the Epidemiology of Pneumococcal Diseases in the Developing World: Goiânia, Brazil. In: Program & Abstracts Book of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, pg 19,

Anchorage, Alaska, May 5 to 8, 2002. American Society for Microbiology, 2002. Disponível em: [http://www.isppd.org/program/ISPPD\\_ProgAbsF.pdf](http://www.isppd.org/program/ISPPD_ProgAbsF.pdf). Acessado em 28 de Abril de 2002.

Andrade ALSS, Brandileone MC, DiFabio JL, Oliveira RM, Silva SA, Baiocchi SSA, Martelli CMT 2001. *Haemophilus influenzae* resistance in Latin America: Systematic review of surveillance data. *Microb Drug Resist* 7: 375-389.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em <http://www.anvisa.br> Acessado em 25 de Outubro de 2002.

Barbour ML, Mayon-White RT, Coles C, Crook DW, Moxon ER 1995. The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 171: 93-98.

Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, Elvin L, Ensor KM, Hackell J, Siber G, Malinoski F, Madore D, Chang I, Kohberger R, Watson W, Austrian R, Edwards K 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.

Bramley JC, Hall T, Finn A, Buttery RB, Elliman D, Lockhart S, Borrow R, Jones IG 2001. Safety and immunogenicity of three lots of meningococcal serogroup C conjugate vaccine administered at 2, 3 and 4 months of age. *Vaccine* 19: 2924-2931.

Brandileone C, Andrade ALSS, DiFabio JL, Guerra ML, Austrian R 2003. Appropriateness of the pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact on age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis* (in press).

- Brandileone MC, Di Fabio JL, Vieira VS, Zanella RC, Casagrande ST, Pignatari AC, Tomasz A 1998. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist* 4: 209-217.
- Breukels MA, Spanjaard L, Sanders LA, Rijkers GT 2001. Immunological characterization of conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in infants. *Clin Infect Dis* 32: 1700-1705.
- Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Renna G, Tozzi AE, Garlaschi ML, Mastrantonio P 2000. Characterization of non-type b *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. The HI Study Group. *J Clin Microbiol* 38: 4649-4652.
- Curran R, Hardie KR, Towner KJ 1994. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of insertion mutations in the transferrin-binding system of *Haemophilus influenzae* type b. *J Med Microbiol* 41: 120-126.
- Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Yagupsky P 1996. Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J Infect Dis* 174: 1352-1355.
- Di Fabio JL, Castaneda E, Agudelo CI, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, Echaniz-Aviles G, Noemi M, Barajas C, Heitmann I, Hormazabal JC, Brandileone MC, Dias Vieira VS, Regueira M, Ruvinski R, Corso A, Lovgren M, Talbot JA, De Quadros C 2001. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J* 20: 959-967.

- Di Fabio JL, de Quadros C 2001. Considerations for combination vaccine development and use in the developing world. *Clin Infect Dis* 33 Suppl 4: S340-345.
- Doit C, Picard B, Loukil C, Geslin P, Bingen E 2000. Molecular epidemiology survey of penicillin-susceptible and resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from patients with meningitis in France. *J Infect Dis* 181: 1971-1978.
- English M, MacLennan JM, Bowen-Morris JM, Deeks J, Boardman M, Brown K, Smith S, Buttery J, Clarke J, Quataert S, Lockhart S, Moxon ER 2000. A randomised, double-blind, controlled trial of the immunogenicity and tolerability of a meningococcal group C conjugate vaccine in young British infants. *Vaccine* 19: 1232-1238.
- Enright MC, Fenoll A, Griffiths D, Spratt BG 1999. The three major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* are the most common clones recovered in recent cases of meningitis in Spain. *J Clin Microbiol* 37: 3210-3216.
- Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, Takala A, Kayhty H, Karma P, Kohberger R, Siber G, Makela PH 2001. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 344: 403-409.
- Eskola J, Anttila M 1999. Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 18: 543-551.
- Eskola J, Peltola H, Takala AK, Kayhty H, Hakulinen M, Karanko V, Kela E, Rekola P, Ronnberg PR, Samuelson JS, Gordon LK, Mäkelä PH 1987. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy. *N Engl J Med* 317: 717-722.

- Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 32: 2382-2386.
- Farber FM 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J Food Protection* 59(10): 1091-1101.
- Forleo-Neto E, de Oliveira CF, Maluf EM, Bataglin C, Araujo JM, Kunz LF, Jr., Pustai AK, Vieira VS, Zanella RC, Brandileone MC, Mimica LM, Mimica IM 1999. Decreased point prevalence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) oropharyngeal colonization by mass immunization of Brazilian children less than 5 years old with Hib polyribosylribitol phosphate polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in combination with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine. *J Infect Dis* 180: 1153-1158.
- Goldblatt D 1998. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 47: 563-567.
- Gomez E, Peguero M, Sanchez J, Castellanos PL, Feris J, Pena C, Brudzinski-LaClaire L, Levine OS 2000. Population-based surveillance for bacterial meningitis in the Dominican Republic: implications for control by vaccination. *Epidemiol Infect* 125: 549-554.
- Gray BM, Converse III GM, Dillon Jr HC 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 142: 923-933.
- Grimes DA, Schulz KF 2002. Descriptive studies: what they can and cannot do. *Lancet* 359: 145-149.
- Hausdorff W 2001. *Haemophilus*, meningococcus and pneumococcus: comparative epidemiologic patterns of disease. *Int J Clin Pract Suppl* (118): 2-4.

- Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR 2001. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 357: 950-952.
- Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, Slack MP, Fogarty J, Moloney AC, Ramsay ME, Moxon ER 2001. Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatr Infect Dis J* 20: 300-305.
- Holmes SJ, Lucas AH, Osterholm MT, Froeschle JE, Granoff DM 1991. Immunoglobulin deficiency and idiotype expression in children developing *Haemophilus influenzae* type b disease after vaccination with conjugate vaccine. The Collaborative Study Group. *JAMA* 266: 1960-1965.
- Hortal M, Lovgren M, de la Hoz F, Agudelo CI, Brandileone MC, Camou T, Casagrande S, Castaneda E, Corso A, Echaniz G, Hormazabal JC, Pace J, Palacio R, Perez-Giffoni G, Ruvinsky R, Di Fabio JL 2001. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six Latin American countries: 1993-1999 surveillance. *Microb Drug Resist* 7: 391-401.
- IBGE 2002. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/ibge/estatistica/populacao/censo2000/>. Acessado em 14 de Maio de 2002.
- Joloba ML, Bajaksouzian S, Palavecino E, Whalen C, Jacobs MR 2001. High prevalence of carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children in Kampala Uganda. *Int J Antimicrob Agents* 17: 395-400.
- Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Karginova EA, Jones ME, Thornsberry C, Sahm DF 2002. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus*

*influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a beta-lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. *J Clin Microbiol* 40: 1063-1066.

Kaslow RA, Moser SA 2000. Role of microbiology in epidemiology: before and beyond 2000. *Epidemiol Rev* 22(1):131-5.

Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo TS, Pinheiro RM, Salgado K, Ribeiro Dourado CM, Tavares-Neto J, Rocha H, Galvao Reis M, Johnson WD, Jr., Riley LW 2000. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis* 30: 78-86.

Landaverde M, Di Fabio JL, Ruocco G, Leal I, de Quadros C 1999. [Introduction of a conjugate vaccine against Hib in Chile and Uruguay]. *Rev Panam Salud Publica* 5: 200-206.

Lehmann D, Gratten M, Montgomery J 1997. Susceptibility of pneumococcal carriage isolates to penicillin provides a conservative estimate of susceptibility of invasive pneumococci. *Pediatr Infect Dis J* 16: 297-305.

Lipsitch M 1999. Bacterial vaccines and serotype replacement: lessons from *Haemophilus influenzae* and prospects for *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis* 5: 336-345.

Lucher LA, Reeves M, Hennessy T, Levine OS, Popovic T, Rosenstein N, Parkinson AJ 2002. Reemergence, in Southwestern Alaska, of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease due to strains indistinguishable from those isolated from vaccinated children. *J Infect Dis* 186: 958-965.

- Lund E, Henrichsen J 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In Academic Press, London, pages 241-262.
- Mastro TD, Nomani NK, Ishaq Z, Ghafoor A, Shaukat NF, Esko E, Leinonen M, Henrichsen J, Breiman RF, Schwartz B, et al. 1993. Use of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in Pakistan for surveillance for antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J* 12: 824-830.
- McEllistrem MC, Mendelsohn AB, Pass M, Elliott JA, Whitney CG, Albanese BA, Harrison LH 2002. Distribution of penicillin-nonsusceptible pneumococcal clones in the Baltimore metropolitan area and variables associated with drug resistance. *Clin Infect Dis* 34: 704-707.
- Ministério da Saúde do Brasil 1999. Meningite por *Haemophilus influenzae*. In: *Guia de Vigilância Epidemiológica*, 4ª edição, Ministério da Saúde do Brasil, Brasília-DF.
- Moxon ER, Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, Slack MP, Ramsay ME 1999. 4th European conference on vaccinology: societal value of vaccination. The impact of Hib conjugate vaccines in preventing invasive *H. influenzae* diseases in the UK. *Vaccine* 17 Suppl 3: S11-13.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2001. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2001a. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

- Ogilvie C, Omikunle A, Wang Y, St Geme IJ, 3rd, Rodriguez CA, Adderson EE 2001. Capsulation loci of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 184: 144-149.
- Omikunle A, Takahashi S, Ogilvie CL, Wang Y, Rodriguez CA, St Geme JW, 3rd, Adderson EE 2002. Limited genetic diversity of recent invasive isolates of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 40: 1264-1270.
- Ostroff SM, Harrison LH, Khallaf N, Assaad MT, Guirguis NI, Harrington S, el-Alamy M 1996. Resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates recovered in Egypt from children with pneumonia. The Antimicrobial Resistance Surveillance Study Group. *Clin Infect Dis* 23: 1069-1074.
- Pan American Health Organization & World Health Organization 2001. *Haemophilus influenzae* type b: epidemiology and prevention. Disponível em [http://www.paho.org/English/HVP/HVI/hvp\\_hib\\_epidprev.htm](http://www.paho.org/English/HVP/HVI/hvp_hib_epidprev.htm). World Health Assembly, May, 2001. Acessado em 24 de Outubro de 2002.
- Peltola H 2000. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 13: 302-317.
- Peterson LR, Hamilton JD, Baron EJ, Tompkins LS, Miller JM, Wilfert CM, Tenover FC, Thomson Jr RB Jr 2001. Role of clinical microbiology laboratories in the management and control of infectious diseases and the delivery of health care. *Clin Infect Dis* 32(4):605-11.

- Pettigrew MM, Foxman B, Ecevit Z, Marrs CF, Gilsdorf J 2002. Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 40: 660-662.
- Porat N, Trefler R, Dagan R 2001. Persistence of two invasive *Streptococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in southern Israel. *J Clin Microbiol* 39: 1827-1832.
- Ramsay M, Slack M, Kaczmarek E 2001. Surveillance of *Haemophilus influenzae* infection. Surveillance data for assessing impact of vaccination are valid. *BMJ* 322: 613-614.
- Raymond J, Armand-Lefevre L, Moulin F, Dabernat H, Commeau A, Gendrel D, Berche P 2001. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children living in an orphanage. *Pediatr Infect Dis J* 20: 779-784.
- Reingold AL 2000. Infectious disease epidemiology in the 21st century: will it be eradicated or will it reemerge? *Epidemiol Rev* 22: 57-63.
- Reis JN, Cordeiro SM, Coppola SJ, Salgado K, Carvalho MG, Teixeira LM, Thompson TA, Facklam RR, Reis MG, Ko AI 2002. Population-based survey of antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in Salvador, Brazil. *J Clin Microbiol* 40: 275-277.
- Reis JN, Lima JB, Ribeiro GS, Corderio SM, Salgado K, Reis MG, Ko AI 2002a. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* isolated during population-based surveillance for meningitis in Salvador, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3641-3643.

- Rennels MB, Edwards KM, Keyserling HL, Reisinger K, Blatter MM, Quataert SA, Madore DV, Chang I, Malinoski FJ, Hackell JG, Paradiso PR 2001. Safety and immunogenicity of four doses of *Neisseria meningitidis* group C vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatr Infect Dis J* 20: 153-159.
- Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM, Lima JB, Gouveia EL, Petersen M, Salgado K, Silva HR, Zanella RC, Almeida SC, Brandileone MC, Reis MG, Ko AI 2003. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. *J Infect Dis* 187: 109-116.
- Richter SS, Heilmann KP, Coffman SL, Huynh HK, Brueggemann AB, Pfaller MA, Doern GV 2002. The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. *Clin Infect Dis* 34: 330-339.
- Robinson DA, Edwards KM, Waites KB, Briles DE, Crain MJ, Hollingshead SK 2001. Clones of *Streptococcus pneumoniae* isolated from nasopharyngeal carriage and invasive disease in young children in central Tennessee. *J Infect Dis* 183: 1501-1507.
- Rowe AK, Deming MS, Schwartz B, Wasas A, Rolka D, Rolka H, Ndoyo J, Klugman KP 2000. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in the Central African Republic. *Pediatr Infect Dis J* 19: 438-444.
- Ruocco G, Curto S, Savio M, Laurani H, Frocht R 1999. [Vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Uruguay: experience and impact]. *Rev Panam Salud Publica* 5: 197-199.

Ruoffs KL, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH 1995. *Streptococcus*. *Man Clin Microbiol* 6: 299-307.

Sader H, Hollis RJ, Pfaller MA 1995. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med* 15(2): 407-431.

Saito M, Umeda A, Yoshida S 1999. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 37: 2142-2147.

Shann F, Steinhoff MC 1999. Vaccines for children in rich and poor countries. *Lancet* 354 Suppl 2: SII7-11.

Shann F, Gratten M, Germer S, Linnemann V, Hazlett D, Payne R 1984. Aetiology of pneumonia in children in Goroka Hospital, Papua New Guinea. *Lancet* 2: 537-541.

Simões LLP, Avaliação da vacina conjugada do *Haemophilus influenzae* b: aspectos epidemiológicos e impacto nas meningites em Goiás. In: *Dissertação para obtenção de título de mestre*. 2002, Universidade Federal de Goiás: Goiânia.

Simões LLP, Andrade ALSS, Laval CABP, Oliveira RM, Silva SAE, Martelli CMT, Davila SL, Almeida RM 2002. Effectiveness of *H. influenzae* b conjugate vaccine on meningitis in Central Brazil. *International Journal of Epidemiology*. XVI IEA World Congress of Epidemiology of the International Epidemiology Association. Oxford 2002.

Smith T, Lehmann D, Montgomery J, Gratten M, Riley ID, Alpers MP 1993. Acquisition and invasiveness of different serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in young children. *Epidemiol Infect* 111: 27-39.

- Smith-Vaughan HC, Sriprakash KS, Leach AJ, Mathews JD, Kemp DJ 1998. Low genetic diversity of *Haemophilus influenzae* type b compared to nonencapsulated *H. influenzae* in a population in which *H. influenzae* is highly endemic. *Infect Immun* 66: 3403-3409.
- Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis* 168: 158-163.
- Takala AK, Eskola J, Leinonen M, Kayhty H, Nissinen A, Pekkanen E, Makela PH 1991. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis* 164: 982-986.
- Takemura NS, Andrade SM 2001. Meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b em cidades do estado do Paraná, Brasil. *J Pediatr (Rio J)* 77: 387-392.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 426-439.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Ussery XT, Gessner BD, Lipman H, Elliott JA, Crain MJ, Tien PC, Parkinson AJ, Davidson M, Facklam RR, Breiman RF 1996. Risk factors for nasopharyngeal carriage of resistant *Streptococcus pneumoniae* and detection of a multiply

- resistant clone among children living in the Yukon-Kuskokwim Delta region of Alaska. *Pediatr Infect Dis J* 15: 986-992.
- Villasenor-Sierra A, Santos JI 1999. Outer membrane protein profiles of paired nasopharyngeal and middle ear isolates of nontypable *Haemophilus influenzae* from Mexican children with acute otitis media. *Clin Infect Dis* 28: 267-273.
- Waggoner-Fountain LA, Hendley JO, Cody EJ, Perriello VA, Donowitz LG 1995. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin Infect Dis* 21: 1322-1324.
- Weinberg GA, Ghafoor A, Ishaq Z, Nomani NK, Kabeer M, Anwar F, Burney MI, Qureshi AW, Musser JM, Selander RK, et al. 1989. Clonal analysis of *Hemophilus influenzae* isolated from children from Pakistan with lower respiratory tract infections. *J Infect Dis* 160: 634-643.
- Weiss DP, Coplan P, Guess H 2001. Epidemiology of bacterial meningitis among children in Brazil, 1997-1998. *Rev Saude Publica* 35: 249-255.
- Wolf B, Rey LC, Brisse S, Moreira LB, Milatovic D, Fler A, Roord JJ, Verhoef J 2000. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 46: 757-765.
- World Health Organization 1999. Laboratory Manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Disponível em <http://www.who.int/emc-documents/meningitis/does/whocdscsredc997.pdf>. Acessado em 24 de Janeiro de 2002.
- World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention 1994. Manual for the national surveillance of antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* and *H.*

*influenzae*: epidemiological and microbiological methods. Programme for the control of acute respiratory infections. Geneva. Centers for Disease Control. Atlanta. Disponível em [http://who.int/child-adolescent-health/New\\_publications/CHILD\\_HEALTH/bact.htm](http://who.int/child-adolescent-health/New_publications/CHILD_HEALTH/bact.htm). Acessado em 28 de Novembro de 2001.

Yagupsky P, Porat N, Fraser D, Prajgrod F, Merires M, McGee L, Klugman KP, Dagan R 1998. Acquisition, carriage, and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in southern Israel. *J Infect Dis* 177: 1003-1012.

Zanella RC, Casagrande ST, Bokermann S, Almeida SC, Brandileone MC 2002. Characterization of *Haemophilus influenzae* isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 1999. *Microb Drug Resist* 8: 67-72.

**Tabela 1**

Características clínico-epidemiológicas dos 78 casos de meningite bacteriana aguda. Goiânia, maio/2000-agosto/2001.

Características	n	%	IC 95%
Idade			
2 – 6 meses	22	28,2	18,6 – 39,5
7 – 23 meses	30	38,5	27,7 – 50,2
24 – 59 meses	26	33,3	23,0 – 44,9
<i>média (desvio padrão)</i>	<i>20,7 (18,2)</i>		
Sexo			
Masculino	52	66,7	55,1 – 76,9
Feminino	26	33,3	23,0 – 44,9
Vacina Hib <sup>a</sup>			
0	22	32,4	21,5 – 44,8
1	14	20,6	11,7 – 32,1
2	12	17,6	9,5 – 28,8
3	20	29,4	19,0 – 41,7
Antibiótico prévio <sup>b</sup>			
Sim	25	39,7	27,6 – 52,8
Não	38	60,3	47,2 – 72,4
Procedência <sup>c</sup>			
Capital	24	31,2	21,1 – 42,7
Interior	53	68,8	57,2 – 78,9
Agente etiológico <sup>d</sup>			
<i>S. pneumoniae</i>	21	26,9	17,5 – 38,2
<i>N.meningitidis</i>	14	17,9	10,2 – 28,3
<i>H. influenzae</i>	13	16,7	9,2 – 26,8
Meningite inespecífica <sup>e</sup>	26	33,4	23,0 – 44,9
Outros	4	5,1	1,4 – 12,6
Óbito <sup>f</sup>			
Sim	14	18,2	10,3 – 28,6
Não	63	81,8	71,4 – 89,7

<sup>a</sup> 10 sem informações; <sup>b</sup> 15 sem informações; <sup>c</sup> 1 sem informação;

<sup>d</sup> cultura de líquido ou sangue ou presença de antígeno no líquido; <sup>e</sup> clinicamente compatível com meningite, líquido turvo e citoquímica característica de meningite bacteriana (WHO 1999); <sup>f</sup> 1 sem informação

**Tabela 2**

Características laboratoriais e clínicas, segundo diagnóstico etiológico

<b>Características</b>	<b>MB específica</b> n=52		<b>MB inespecífica</b> n=26		<b>p<sup>a</sup></b>
	<i>média</i>	<i>desvio padrão (dp)</i>	<i>média</i>	<i>desvio padrão (dp)</i>	
<b>Laboratoriais (líquor)</b>					
Leucócitos (69) <sup>b</sup>	2103,6	2537,2	1483,4	1539,1	0,61
Polimorfonucleares (70) <sup>b</sup>	83,8	16,3	77,8	15,1	0,15
Glicose (76) <sup>b</sup>	21,1	25,4	51,9	23,1	0,00
Proteínas (70) <sup>b</sup>	94,5	40,5	73,0	36,8	0,03
<b>Clínicas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
Duração da doença					
≤ 48 horas	32	61,5	13	50	0,33
≥ 48 horas	20	38,5	13	50	
Uso de antimicrobiano prévio à internação <sup>c</sup>					
Sim	14	34,1	11	50	0,22
Não	27	65,9	11	50	
Óbito <sup>d</sup>					
Sim	11	21,2	3	12	0,33
Não	41	78,8	22	88	

<sup>a</sup> valor de p; <sup>b</sup> valores entre parênteses representam o número de casos após a exclusão dos valores extremos; <sup>c</sup> 11 casos de MB específica e 4 de MB inespecífica sem informação; <sup>d</sup> 1 caso de MB inespecífica sem informação

**Tabela 3**

*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* isolados em amostras de líquido, sangue e swab de nasofaringe dos casos de meningite bacteriana.

Agente etiológico	Líquor <sup>a</sup>			Sangue <sup>b</sup>			Swab de nasofaringe <sup>c</sup>		
	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%
<i>S. pneumoniae</i>	21	26,9	17,5 – 38,2	6	11,1	4,2 – 22,6	17	31,5	19,5 – 45,5
<i>H. influenzae</i>	13	16,7	9,2 – 26,8	4	7,4	2,0 – 17,9	10	18,5	9,2 – 31,4
<i>N. meningitidis</i>	13	16,7	9,2 – 26,8	2	3,7	0,4 – 12,7	–	–	–
Negativo/outros	31	39,7	28,8 – 51,5	42	77,8	64,4 – 87,9	31	57,4	43,2 – 70,8

<sup>a</sup> 78 casos com cultura ou presença de antígeno no líquido (látex ou CIE); <sup>b</sup> 54 casos com hemocultura;

<sup>c</sup> 54 crianças com pesquisa de *H. influenzae* e *S. pneumoniae* em nasofaringe.

**Tabela 4**

Características básicas, sorotipo capsular e antecedentes vacinais de 13 casos de meningite bacteriana por *Haemophilus influenzae*

Caso	Data de nascimento	Idade em meses	Sexo	Data de internação	Tempo de internação em dias	Sorotipo	Vacina Hib		Óbito
							Nº doses	Data das doses	
1	25/09/1999	8	M	12/06/2000	04	b	0	NA	Sim
2	23/04/1997	37	M	14/06/2000	27	b	0	NA	Não
3	02/06/1999	13	F	02/07/2000	10	a	3	04/08/1999 26/10/1999 04/01/2000	Não
4	14/12/1997	31	F	14/07/2000	10	b	0	NA	Não
5	27/07/2000	2	M	16/10/2000	11	b	1	30/09/2000	Não
6	22/07/2000	3	M	22/10/2000	9	b	1	05/10/2000	Não
7	08/09/2000	5	M	14/02/2001	—	b	2	—	Não
8	24/11/2000	3	M	10/03/2001	—	b	1	—	Sim
9	30/06/1999	22	F	27/05/2001	01	b	3	06/09/1999 16/11/1999 17/01/2000	Sim
10	30/07/1998	33	F	23/05/2001	15	b	0	NA	Não
11	09/03/2001	4	M	24/07/2001	21	a	2	15/05/2001 16/07/2001	Não
12	27/04/2001	3	F	31/07/2001	01*	b	1	27/06/2001	Não
13	14/12/1996	51	M	19/03/2001	17	a	0	NA	Não

— informações não disponíveis; M: sexo masculino; F: sexo feminino; NA: não aplica; \* criança transferida

**Tabela 5**

Características básicas e sorotipos identificados na cultura de líquido de 13 crianças com meningite por *Streptococcus pneumoniae*

Caso	Idade em meses	Sexo	Sorotipos	Tempo de internação em dias	Óbito
14	58	M	9V	12	Não
15	8	M	6B	01	Sim
16	5	M	6B	16	Não
17	10	M	14	01	Não
18	10	M	23F	15	Não
19	4	M	14	13	Não
20	8	M	19A	21	Não
21	17	M	10A	05	Sim
22	7	M	14	01*	Não
23	7	M	18B	01*	Não
24	18	M	14	13	Não
25	5	M	19F	01	Sim
26	5	M	6B	11	Não

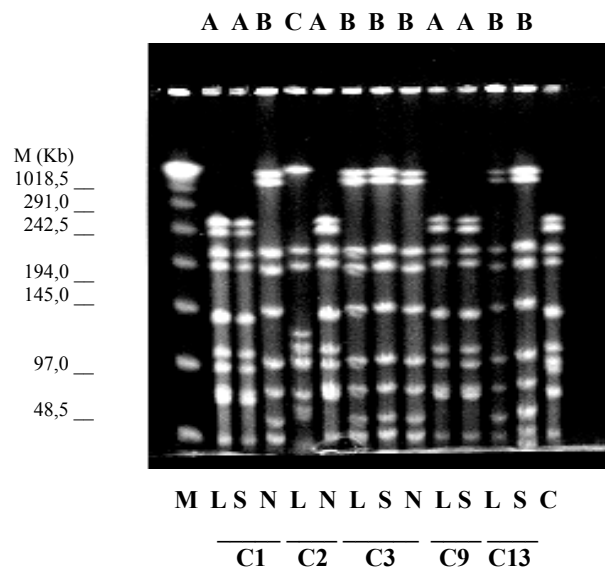
\* criança transferida

**Tabela 6**

Perfil fenotípico e de *PFGE*<sup>a</sup> de isolados de líquor, sangue e nasofaringe de 5 crianças com meningite bacteriana por *Haemophilus influenzae*

Caso <sup>b</sup>	Procedência	Espécime clínico	Fenótipo			Perfil PFGE	Doses vacina Hib
			biotipo	sorotipo	resistência (ampicilina)		
1	Araçú	Líquor	I	b	S	A	0
		Sangue	I	b	S	A	
		Nasofaringe	II	NT <sup>c</sup>	S	B	
2	Goiânia	Líquor	II	b	R	C	0
		Nasofaringe	I	b	S	A	
3	Aparecida	Líquor	II	a	S	B	3
		Sangue	II	a	S	B	
		Nasofaringe	II	a	S	B	
9	Santa Rosa	Líquor	I	b	S	A	3
		Sangue	I	b	S	A	
13	Goiânia	Líquor	II	a	S	B	0
		Sangue	II	a	S	B	

<sup>a</sup> *pulsed field gel electrophoresis*; <sup>b</sup> numeração dos casos referente à Tabela 3; <sup>c</sup> NT: *H. influenzae* não tipável; S: sensível à ampicilina; R: resistente à ampicilina



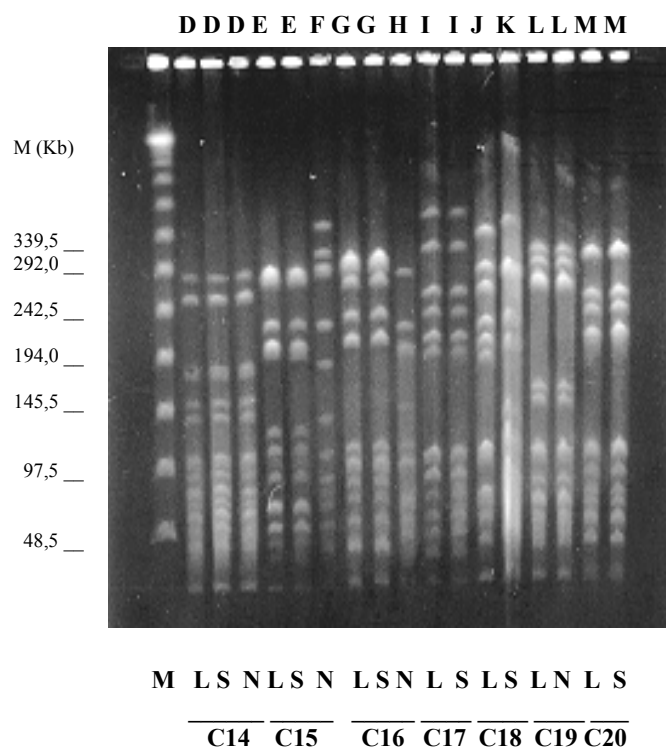
**Figura 1:** Perfis de PFGE dos isolados de *Haemophilus influenzae* de 5 crianças (C1 a C13) com meningite bacteriana. As cepas foram isoladas de líquido (coluna L), sangue (coluna S) e nasofaringe (coluna N). Coluna M, peso molecular (**Kb**) e coluna C, cepa controle. A foto mostra 3 perfis distintos: **A**, **B** e **C**. O **A** foi caracterizado em cepas invasivas das crianças 1 e 9, que apresentaram meningite causada pelo sorotipo b e na nasofaringe da criança 2. O **B** foi identificado de cepas invasivas e colonizadoras da criança 3, na nasofaringe da criança 1 e nas cepas invasivas da criança 13. As crianças 3 e 13 apresentaram meningite pelo sorotipo “a”. O perfil **C** corresponde à cepa isolada de líquido da criança 2, que apresentou meningite pelo sorotipo b.

**Tabela 7**

Sorotipo, resistência antimicrobiana e perfil de *PFGE*<sup>a</sup> de isolados de líquor, sangue e nasofaringe de 7 crianças com meningite bacteriana por *Streptococcus pneumoniae*

Caso <sup>b</sup>	Procedência	Fluido	Sorotipo	Resistência (oxacilina)	Perfil de PFGE
14	Goiânia	Líquor	9V	S	D
		Sangue	9V	S	D
		Nasofaringe	9V	S	D
15	Goianápolis	Líquor	6B	S	E
		Sangue	6B	S	E
		Nasofaringe	6A	S	F
16	Aparecida de Goiânia	Líquor	6B	S	G
		Sangue	6B	S	G
		Nasofaringe	6B	S	H
17	Trindade	Líquor	14	S	I
		Sangue	14	S	I
18	São Luis dos Montes Belos	Líquor	Pool H	R	J
		Sangue	23F	R	K
19	Goiânia	Líquor	14	R	L
		Nasofaringe	14	R	L
20	Goiânia	Líquor	19A	S	M
		Sangue	19A	S	M

<sup>a</sup> *pulsed field gel electrophoresis*; <sup>b</sup> numeração dos casos referente à Tabela 4;  
S: sensível à oxacilina; R: resistente à oxacilina



**Figura 2:** Padrões de PFGE dos isolados de 7 crianças (C14 a C20) com meningite bacteriana causada por *Streptococcus pneumoniae*. Letras de **D** a **M** no topo da figura são os 10 perfis genéticos detectados pela PFGE. Coluna M representa o peso molecular; letras L, S e N representam isolados de líquido, sangue e nasofaringe, respectivamente.

## **ANEXOS**

**Progress towards meningitis prevention  
in the conjugate vaccine era**

a ser submetido à *Revista Panamericana de Salud Publica / Pan American Journal of  
Public Health*

## SUMMARY

Acute bacterial meningitis represents a relevant cause in morbidity and mortality among children less than five years old, being *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* the most important agents of bacterial meningitis in developing countries. The development of the conjugate vaccines in the beginning of the 90's, especially the type b *H. influenzae* (Hib), and more recently the heptavalent pneumococcal and the serogroup C meningococcal vaccines, contributed directly to changes in the epidemiological profile of the invasive diseases (direct effect) and of the carriage status (indirect effect). This review discusses the impact of the Hib conjugate vaccine in countries of Latin America where the vaccine has been implemented and the potential of the pneumococcal and meningococcal conjugate vaccines on the reduction on meningitis worldwide. The paper also addresses the constraints about the development and delivery of these vaccines and reviews new candidate vaccines in the state-of-the-art. The greatest challenge, undoubtedly, is to implement the vaccines worldwide, mainly in the developing regions.

**Key words:** Conjugate vaccines, Hib conjugate vaccine, pneumococcal conjugate vaccine, meningococcal conjugate vaccine, impact of Hib conjugate vaccine.

## **Progress towards meningitis prevention in the conjugate vaccine era**

Acute bacterial meningitis represents a relevant cause in morbidity among pediatric population, especially in developing countries (42, 69). Despite the increasing availability of potent antimicrobials and sophisticated intensive care units, mortality rates of bacterial meningitis still reach high levels leading to significant neurological sequelae (66, 72).

The advent of the conjugate vaccines in the last decade represented a remarkable achievement, launching a new era in the history of the modern vaccinology. In contrast to the first generation of the purified polysaccharides vaccines, the conjugate vaccines turn out a T-dependent response and development of immunological memory leading to a clinical protection in children less than 2 years old (1, 38). This age group is at high risk for invasive diseases caused by the three most important agents of bacterial meningitis: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* (42).

The development of the conjugate vaccine against the type b *H. influenzae* (Hib) in the beginning of the 90's and its implementation at routine immunization level, contributed directly to changes in the epidemiological profile of the invasive diseases caused by Hib in some developed countries, especially the meningitis (2, 54). More recently, the pneumococcal heptavalent conjugate vaccine and the serogroup C meningococcal conjugate vaccine were licensed for commercial use, while the 9-11

valent pneumococcal vaccines are under advanced stage of field trials in many countries (31, 33, 81, 78, 95).

### **H. influenzae type b vaccine**

Finland, Canada, Iceland, United States, United Kingdom, Israel and Australia were the first countries to use the Hib vaccine in large scale at the end of the 80's and beginning of the 90's. Heath, in a review about the efficacy of the Hib vaccine in these countries, showed a spectacular reduction of the invasive disease incidence due to *H. influenzae* b (47). In the USA, Adams et al. observed a decrease of 82% on *H. influenzae* meningitis between 1985 and 1991 by using national surveillance data (2). Dawson et al., in a retrospective study, detected a fall on the number of meningitis cases by *H. influenzae* b, from 73% to 69%, with the polysaccharide vaccine, and to 16%, in a 5-year-period after the introduction of the conjugate vaccine (24).

In Latin America (LA), the conjugate vaccine was first introduced in Uruguay in 1994, followed by Costa Rica and Chile, and, is currently incorporated into the immunization programs of almost all LA countries (28). In Uruguay, the incidence rate of Hib meningitis fell from 15.6 to 0.03 per 100,000 after 2 years of the vaccine introduction (76). In Brazil, the vaccine was introduced in Curitiba (Southern Brazil) in 1996, and, after a year of routine use, a 72% reduction was observed on the risk of meningitis (84). The nationwide immunization in Brazil has begun in middle 1999, and, after 2 years, Simões et al., in a prospective population surveillance carried out in Goiás State (Central Brazil) showed a 78% decline on the risk of meningitis by *H. influenzae* b

in children under 5 years of age (82). Furthermore, studies conducted in Brasília<sup>3</sup> and Salvador detected a reduction of meningitis cases from 80% and 69.9%, respectively, after the first year of the initiation of Hib vaccination (75). The impact of the Hib vaccine on reduction of meningitis in Latin America countries after the introduction of the Hib vaccine in the region ranged from 40.0% to 95.6%, according to different time-period of assessment (table).

**Impact of *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine on meningitis in Latin America countries**

Country	Author, year	Vaccine introduction	Age group	Timing after Hib vaccine introduction	Coefficients x10 <sup>5</sup> pre / post vaccine	% Decrease post vaccine
Cuba	Dickinson et al. 2001 (26)	1999	< 5 years	1 year	13.6 / 7.6	52.8
Colombia	Agudelo et al. 2000 (5)	1998	< 1 year	1 year	-	40.0
Uruguay	Ruocco et al. 1999 (76)	1994	< 5 years	2 years	15.6 / 2.7	82.7
	Landaverde et al. 1999 (53)	1994	All ages	6 months	-	95.6
Chile	Diaz et al. 2001 (25)	1996	< 5 years	2 years	36.4 / 9.9	72.7
Brazil	Takemura & Andrade 2001 (84)	1996	< 5 years	1 year	35.4 / 9.7	72.6
	Freitas 2000	1999	< 5 years	1 year	-	80.0
	Simões et al. 2002 (82)	1999	< 5 years	1 year	10.8 / 2.3	78.7
	Ribeiro et al. 2003 (75)	1999	< 5 years	1 year	2.6 / 0.8	69.0

<sup>a</sup> not reported

Source: Adapted of Simões 2002<sup>4</sup>

<sup>b</sup> metropolitan area of Santiago

<sup>c</sup> incidence in non-exposed to vaccine

<sup>d</sup> incidence in exposed to vaccine

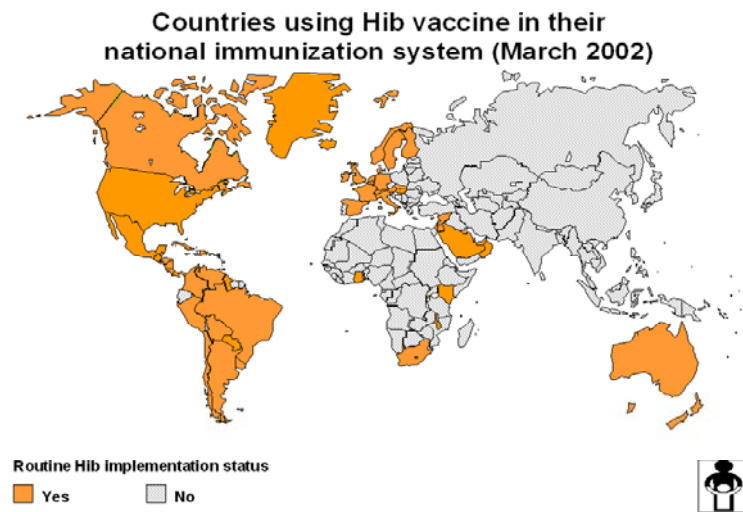
<sup>e</sup> reference: Wenger et al 2000

The significant decline of bacterial meningitis caused by Hib are due not only to the direct effect of the vaccine on individual protection, but also to the reduction of colonization in nasopharynx (4, 9, 35, 61, 83), decreasing the transmission of Hib and therefore the incidence of meningitis by *H. influenzae* b in vaccine recipients as well as in non-vaccinated children (indirect effect of the vaccine – herd immunity) (59).

<sup>3</sup> Freitas H. [Meningite por *Haemophilus influenzae* b no Distrito Federal. Aspectos epidemiológicos e impacto após introdução da vacina]. Dissertação para obtenção de título de mestre em Saúde Coletiva. [2000]. Located at: Universidade de Brasília, Brasília, DF.

<sup>4</sup> Simões LLP. [Avaliação da vacina conjugada do *Haemophilus influenzae* b: aspectos epidemiológicos e impacto nas meningites em Goiás]. Dissertação para obtenção de título de mestre. [2002]. Located at: Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

Despite the availability of the Hib conjugate vaccine and its impressive impact on invasive diseases in countries where it has been implemented, about 132 million children have no access to this vaccine, the majority of them from poor countries in Africa and Asia (93). The map below shows the current geography of the Hib vaccine implementation in the world.



Important obstacles have hampered the introduction of the vaccine in African and Asian continents. Information about the production, the estimated costs, the use of the vaccine in large scale, safety and efficacy of the vaccine on these regions are essential. Various investigations have shown the cost to be the most critical issue to introduce the vaccination in these countries, whereas safety and efficacy, although significant, are less relevant. The unfavorable economic and financial situation in many

countries in Africa have impeded the increasing of per capita expenses in health, turning out to be unfeasible the introduction of the Hib vaccine (94). Most countries in Africa have limited medical and laboratory support, making difficult the proper identification of etiologic agents related to invasive diseases. Moreover, other complex health subjects, like tuberculosis, malaria, HIV and meningococcal disease, compete against *H. influenzae* b in terms of priority. To overcome these barriers the public health policy makers need to be aware about the magnitude and the social costs of the Hib diseases, maximizing efforts to incorporate the vaccine in the routine of the health services (68, 90).

#### *Pneumococcal conjugate vaccine*

In comparison to Hib, *Streptococcus pneumoniae* is related to a broader range of disorders, including invasive (pneumonia and meningitis), and non-invasive diseases (acute otitis media and sinusitis). It also contributes to the highest levels of mortality and morbidity in the world, especially in children under 5 years old (40, 60, 63); at least 1,2 million deaths occur annually due to pneumonia, being 39% among children less than 5 years, with 100,000 to 500,000 deaths by pneumococcal meningitis (40).

The success achieved by the Hib immunization has stimulated the development of the pneumococcal conjugate vaccine. On February 2000 the *Food and Drug Administration* approved the use of seven-valent conjugate vaccine for American children under 2 years old. Among the 90 *S. pneumoniae* serotypes identified so far (48), the formulation of the vaccine contains only 7 serotypes – 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F

e 23F – but these are responsible for 70% to 90% of invasive diseases in children in the USA, Canada, Africa and Europe and 70% of pneumococci that causes acute otitis media in USA, Canada and Europe (44, 45). Clinical trials carried out with the 7-valent vaccine in USA have revealed high levels of protection against invasive pneumococcal disease, and a further review found a 50%-60% protection range against pneumococcal otitis, serotype specific, in Finland (12, 30). In Brazil, the heptavalent vaccine was licensed in February 2001 (7), but has still not been added into the PNI schedule. The 9-valent conjugate vaccine contains the 7-valent serotypes besides serotypes 1 and 5 and has been evaluated by large field trials in South Africa and Gambia (50). The 11-valent vaccine includes 9-valent serotypes, as well as the serotypes 3 and 7V, and it is currently under test in clinical trials in the Filipinos, Israel, Argentina and Chile (51, 60, 95).

In this context, while the expected impact to the Hib conjugate vaccine concentrates on meningitis cases reduction, the pneumococcal vaccines are also expected to reduce mainly the pneumonia and acute otitis media cases, as well as carriage prevalence, which will significantly modify the pneumococcal diseases epidemiology on this decade (11, 22, 23). Eskola and Anttila have shown that in clinical trials with the 7-11 valent pneumococcal conjugate vaccines, the coverage to the invasive disease, including meningitis, could reach 92% (31). DiFabio et al. estimated a 64.4% serotypes coverage (IC95% 60.7-67.8) for meningitis with the introduction of the heptavalent pneumococcal vaccine in Brazil (27). Similar results were reported by Brandileone et al., who found that the 7-valent vaccine would cover 61% (IC95% 57.0-64.9) of most prevalent meningitis serotypes in Brazil on children under 2 years old (1,

14, 19A, 19F, 5, 6A and 6B) (Brandileone et al., Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, unpublished observations, 2003). It is worthwhile emphasizing the high prevalence of serotypes 1 and 5 in Latin American countries, which are not included in the heptavalent vaccine.

The efficacy of the pneumococcal vaccine against meningitis needs to be better evaluated. So far, clinical trials conducted in California by the *Kaiser* group, and in Navajos children, did not find any meningitis case within the vaccinated group; however, as the number of cases in the control group has not yet been reported (11, 64, 65), it is probable that the efficacy of the heptavalent vaccine to pneumococcal meningitis might be better evaluated through meta-analyzes, which has the advantage to pool a higher sample size increasing the power to detect significant differences between vaccinated and unvaccinated groups. Instead, observational studies may be conducted to assess the effectiveness of the pneumococcal vaccine during the vaccine post-licensure period.

Although there has been optimism upon the impact of the *S. pneumoniae* conjugate vaccine, some restrictions should be pointed out towards the implementation of the vaccine into health services routine such as: (i) the high cost for implementation at public health level, mostly in the developing world, (ii) the controversy about cross-protection to the serotypes not contained in the vaccine, and (iii) the technical difficulties of having all pneumococcal serotypes in a same formulation. Therefore, new candidates to the pneumococcal vaccine have been tried for immunogenicity and safety, including the protein vaccines.

A large number of investigators have searched for proteins capable to induce immunity to invasive and non-invasive pneumococcal infection. So, pneumococcal surface proteins including protein A (PspA), protein C (PspC), adhesin (PsaA) and pneumolysin, have been considered as alternatives to promote protective immunity in children (17, 20). Such proteins could induce protection regardless of pneumococcal serotypes; for example, PspA has been found in all isolates of *S. pneumoniae* (55). According to the amino acids sequential, PspA are classified in three families. Families 1 and 2 are the main ones, which include more than 98% of the PspA molecules (19, 49). Studies conducted in animal models have showed that PspA was the most efficacious protein against carriage, otitis media, pneumonia and sepsis. A synergic effect has been detected when two proteins are associated. The combination between PspA and pneumolysin can induce a higher immunity to lung infections and probably septicemia, rather than PspA only (17, 18). The relative protective capacities of several different pneumococcal proteins to protect against sepsis, bacteremia, pneumonia, otitis media and carriage suggest that the association of different proteins appear to optimize the protection of broadest diversity of strains and diseases. Therefore, it is plausible that vaccines against *S. pneumoniae* composed of mixtures of polysaccharides and several protein antigens might be the best approach than vaccine based on one-single type.

### *Meningococcal conjugate vaccine*

The meningococcal meningitis represents an important public health problem worldwide, especially in sub-Saharan Africa, where it occurs as endemic disease and in outbreaks every 2 years (41, 80). *Neisseria meningitis* isolates can be classified into 12 groups, according to the chemically and antigenically distinct polysaccharide capsules, but only 5 groups are responsible for almost all meningococcal disease: A, B, C, Y and W135. Serogroup A is responsible for the epidemic disease in Africa (sub-Saharan) and in developing countries. The serogroups B and C are responsible for most of the infections in developed countries, as well as in developing regions. The pattern of disease caused by the serogroup B is typically hyperendemic or sporadic in contrast to the endemic nature of the serogroup A. At United Kingdom, 32% of the reports of invasive disease caused by *N. meningitidis* in 1996 were associated to serogroup C (38). Meningococcal disease caused by serogroups Y and W135 is mainly found in USA (80).

The polysaccharide vaccines against serogroups A and C, widely used for many years with relative success in mass immunizations during outbreaks, are efficacious in older children and in adults, but are quite less immunogenic among children under 5 years old (39). The development and use of meningococcal conjugate vaccine presents an alternative in relation to polysaccharide vaccines. The conjugate vaccines for *N. meningitidis* are in several stages of development and clinical trials. Besides being more immunogenic than the polysaccharides, the meningococcal conjugate vaccines induce herd immunity (96). The majority of the efforts for the development of the meningitis

conjugate vaccines were firstly achieved on serogroups A and C, in the end of 80's decade. Studies conducted in Gambia and United Kingdom's children showed a good immunogenicity and tolerability of the bivalent conjugate vaccine A-C (32, 88). Recently, several clinical trials in children and teenagers have confirmed the safety, immunogenicity and capacity to induce immunological memory of the serogroup C meningococcal vaccine (14, 29, 56, 74).

In Africa, a great project to wipe out epidemic meningitis has taken place, based upon the utilization of two vaccines. One of them, a heptavalent product (DTPw, hepatitis b, Hib, meningococcal conjugate A-C), to be used in the expanded program of immunization, and another product, a monovalent vaccine against meningococcus A, to be used in population from 1 to 29 years old (67). Field trials with both vaccines are scheduled to begin soon.

The United Kingdom was the first country to include the conjugate vaccine against the serogroup C into the routine immunization program, in November 1999. After the introduction of the vaccine in children and teenagers less than 19 years old, a remarkable reduction of the meningococcal disease serogroup C was observed (8, 73, 78). Recently, Trotter et al. have shown that, with coverage of 89% of the vaccine, a fall of 80% in the incidence of meningitis by serogroup C has been detected and the number of deaths has fallen from 78 to 8 in the same time period (87).

Serogroup B meningococcus is a relevant problem in the Americas and Europe due to its high incidence in these regions, besides the lack of availability of an effective

vaccine to date (58, 79). The achievement of a vaccine against the serogroup B is a more difficult task. The similarity between the polysaccharide structure of the capsule and carbohydrates spread in humans make this antigen auto-limited or poorly immunogenic. Furthermore, the use of this polysaccharide in a vaccine can stimulate the production of auto-antibodies (34, 46). An alternative approach to vaccine development is based on outer-membrane vesicles. Although these vaccines induce antibodies response and protect against meningococcal disease especially among children more than four years of age (10, 57, 62, 85), they do not protect against several known heterologues strains (71). On the other hand, many proteins not previously recognized were identified and characterized during the genome sequencing of a virulent strain MC58 of the meningococcus B (70, 86). Some of these proteins induce bactericidal antibodies in serum against serogroup B meningococcus. Thus, we have got a new potential vaccine candidate, which will certainly be safe and capable of promoting large homologue and heterologue protection against *N. meningitidis* B strains, although it is also likely to promote cross-protection against others serogroup.

#### *Final remarks*

In this epidemiological scenario of post-introduction of the conjugate Hib vaccine into the routine immunization programs, the greatest challenge is to improve the current surveillance systems. Considering the sharp decrease of the invasive disease as well as the carriage status of the Hib, more sensitive and specific diagnostic tools are essential to the early detection of the emergence of other *H. influenzae* serotypes,

specially the non-typeable *H. influenzae* and also the *S. pneumoniae* that could occupy the ecological niche left by the Hib (3, 21, 43, 89). The monitoring of possible vaccine failure (13, 16), the reemergence of cases of the invasive disease by the Hib, despite adequate levels of vaccine coverage, and the antimicrobial susceptibility of the *H. influenzae*, including the “non-b”, and the *S. pneumoniae* are also imperative in this post-vaccine era (6, 15, 36, 37, 52, 77, 91).

While waiting for a more effective vaccine comprising all meningococcus groups, the best strategy for meningococcal meningitis prevention is the prompt large-scale mass vaccination in the epidemic period. For instance, studies carried out in African countries have suggested that an efficient surveillance system, specially in the detection of meningococcal meningitis outbreaks, might guide appropriate control measures, such as mass catch-up vaccination campaign, to timely decrease the number of cases of the disease (92).

Incorporation of new epidemiological information might be reached with the use of molecular typing techniques on the characterization of the invasive and colonizing serotypes, allowing systematic evaluations of the Hib vaccine and of the forthcoming conjugate vaccines of *S. pneumoniae* and *N. meningitidis*, when widely available and implemented.

This investigation was sponsored by the Division of Vaccines and Immunization from the Pan American Health Organization, World Health Organization, the Bill and Melinda Gates Children's Vaccine Program, the Brazilian Council for Research and Development/CNPq (Grants Research: # 520399/00-5), and Secretariat of Health of Goiânia Municipality.

## References:

1. Ada G. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 2001; 345(14): 1042-1053.
2. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell ER, Broome CV, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 1993; 269(2): 221-226.
3. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiye M, Carroll K, et al. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics* 2001; 108(1): E18.
4. Adegbola RA, Mulholland EK, Secka O, Jaffar S, Greenwood BM. Vaccination with a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *H. influenzae* type b among Gambian children. *J Infect Dis* 1998; 177(6): 1758-1761.
5. Agudelo CI, Munoz N, De la Hoz F. [Rapid assessment of the impact of *Haemophilus influenzae* vaccine serotype b in Colombia. Public Health Laboratories]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2000; 8(3): 181-184.

6. Andrade ALSS, Brandileone MC, DiFabio JL, Oliveira RM, Silva SA, Baiocchi SSA, et al. *Haemophilus influenzae* resistance in Latin America: Systematic review of surveillance data. *Microb Drug Resist* 2001; 7(4): 375-389.
7. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde do Brasil [Internet site]. Available: <http://www.anvisa.br> Accessed 25 October 2002.
8. Balmer P, Borrow R, Miller E. Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. *J Med Microbiol* 2002; 51(9): 717-722.
9. Barbour ML, Mayon-White RT, Coles C, Crook DW, Moxon ER. The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1995; 171(1): 93-98.
10. Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 1991; 338(8775): 1093-1096.
11. Black SB, Shinefield HR, Hansen J, Elvin L, Laufer D, Malinoski F. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(12): 1105-1107.

12. Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(3): 187-195.
13. Booy R, Heath PT, Slack MP, Begg N, Moxon ER. Vaccine failures after primary immunisation with *Haemophilus influenzae* type-b conjugate vaccine without booster. *Lancet* 1997; 349(9060): 1197-1202.
14. Bramley JC, Hall T, Finn A, Buttery RB, Elliman D, Lockhart S, et al. Safety and immunogenicity of three lots of meningococcal serogroup C conjugate vaccine administered at 2, 3 and 4 months of age. *Vaccine* 2001; 19(20-22): 2924-2931.
15. Brandileone MC, DiFabio JL, Vieira VS, Zanella RC, Casagrande ST, Pignatari AC, et al. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist* 1998; 4(3): 209-217.
16. Breukels MA, Spanjaard L, Sanders LA, Rijkers GT. Immunological characterization of conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in infants. *Clin Infect Dis* 2001; 32(12): 1700-1705.

17. Briles DE, Hollingshead S, Brooks-Walter A, Nabors GS, Ferguson L, Schilling M, et al. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine* 2000; 18(16): 1707-1711.
18. Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, et al. 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* 2000; 182(6): 1694-1701.
19. Briles DE, Hollingshead SK, Swiatlo E, Brooks-Walter A, Szalai A, Virolainen A, et al. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 1997; 3(4): 401-408.
20. Brooks-Walter A, Briles DE, Hollingshead SK. 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*. 1999 67(12):6533-42.
21. Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Renna G, Tozzi AE, Garlaschi ML, Mastrantonio P. Characterization of non-type B *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. The HI Study Group. *J Clin Microbiol* 2000; 38(12): 4649-4652.

22. Dagan R, Sikuler-Cohen M, Zamir O, Janco J, Givon-Lavi N, Fraser D. Effect of a conjugate pneumococcal vaccine on the occurrence of respiratory infections and antibiotic use in day-care center attendees. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(10): 951-958.
23. Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174(6): 1271-1278.
24. Dawson KG, Emerson JC, Burns JL. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18(9): 816-822.
25. Diaz JM, Catalan L, Urrutia MT, Prado V, Ledermann W, Mendoza C, et al. [Trends of etiology of acute bacterial meningitis in Chilean children from 1989 to 1998. Impact of the anti-*H influenzae* type b vaccine]. *Rev Med Chil* 2001; 129(7): 719-726.
26. Dickinson FO, Perez AE, Galindo MA, Quintana I. [Impact of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Cuba]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2001; 10(3): 169-173.
27. Di Fabio JL, Castaneda E, Agudelo CI, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in

- Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(10): 959-967.
28. Di Fabio JL, de Quadros C. Considerations for combination vaccine development and use in the developing world. *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 4: S340-345.
29. English M, MacLennan JM, Bowen-Morris JM, Deeks J, Boardman M, Brown K, et al. A randomised, double-blind, controlled trial of the immunogenicity and tolerability of a meningococcal group C conjugate vaccine in young British infants. *Vaccine* 2000; 19(9-10): 1232-1238.
30. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344(6): 403-409.
31. Eskola J, Anttila M. Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 543-551.
32. Fairley CK, Begg N, Borrow R, Fox AJ, Jones DM, Cartwright K. Conjugate meningococcal serogroup A and C vaccine: reactogenicity and immunogenicity in United Kingdom infants. *J Infect Dis* 1996; 174(6): 1360-1363.

33. FDA. Food and Drugs Administration. First pneumococcal vaccine approved for infants and toddlers [Internet site]. Available: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00716.html>. Accessed 28 November 2001.
34. Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol* 1987; 138(12): 4402-4407.
35. Forleo-Neto E, de Oliveira CF, Maluf EM, Bataglin C, Araujo JM, Kunz LF, Jr., et al. Decreased point prevalence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) oropharyngeal colonization by mass immunization of Brazilian children less than 5 years old with hib polyribosylribitol phosphate polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in combination with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine. *J Infect Dis* 1999; 180(4): 1153-1158.
36. Galil K, Singleton R, Levine OS, Fitzgerald MA, Bulkow L, Getty M, et al. Reemergence of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in a well-vaccinated population in remote Alaska. *J Infect Dis* 1999; 179(1): 101-106.
37. Gazagne L, Delmas C, Bingen E, Dabernat H. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3629-3635.

38. Goldblatt D. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 1998; 47(7): 563-567.
39. Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. IV: Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med* 1969; 129(6): 1367-1384.
40. Greenwood B. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354(1384): 777-785.
41. Greenwood BM. The epidemiology of acute bacterial meningitis in tropical Africa. In: Williams JD, Burnie J, eds. Bacterial meningitis. London: Academic Press, 1987: 61-91.
42. Hausdorff W. *Haemophilus*, meningococcus and pneumococcus: comparative epidemiologic patterns of disease. *Int J Clin Pract Suppl* 2001; (118): 2-4.
43. Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357(9260): 950-952.

44. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use: I. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 100-121.
45. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use: II. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 122-140.
46. Hayrinen J, Jennings H, Raff HV, Rougon G, Hanai N, Gerardy-Schahn R, et al. Antibodies to polysialic acid and its N-propyl derivative: binding properties and interaction with human embryonal brain glycopeptides. *J Infect Dis* 1995; 171(6): 1481-1490.
47. Heath PT. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: a review of efficacy data. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(9 Suppl): S117-122.
48. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10): 2759-2762.
49. Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2000; 68(10): 5889-5900.

50. Huebner RE, Mbelle N, Forrest B, Madore DV, Klugman KP. Immunogenicity after one, two or three doses and impact on the antibody response to coadministered antigens of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants of Soweto, South Africa. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21(11): 1004-1007.
51. Klugman KP. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1(2): 85-91.
52. Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo TS, et al. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 78-86.
53. Landaverde M, Di Fabio JL, Ruocco G, Leal I, de Quadros C. [Introduction of a conjugate vaccine against Hib in Chile and Uruguay]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 1999; 5(3): 200-206.
54. Levine OS, Schwartz B, Pierce N, Kane M. Development, evaluation and implementation of *Haemophilus influenzae* type b vaccines for young children in developing countries: current status and priority actions. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(9 Suppl): S95-113.

55. McDaniel LS, Waltman WD, 2nd, Gray B, Briles DE. A protective monoclonal antibody that reacts with a novel antigen of pneumococcal teichoic acid. *Microb Pathog* 1987; 3(4): 249-260.
56. MacLennan JM, Shackley F, Heath PT, Deeks JJ, Flamank C, Herbert M, et al. Safety, immunogenicity, and induction of immunologic memory by a serogroup C meningococcal conjugate vaccine in infants: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000; 283(21): 2795-2801.
57. Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 1992; 340(8827): 1074-1078.
58. Morbidity Mortality Weekly Report. Summary of notifiable diseases, United States, 1998. [Internet site]. Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm4654.pdf>. Accessed 13 January 2003.
59. Moulton LH, Chung S, Croll J, Reid R, Weatherholtz RC, Santosham M. Estimation of the indirect effect of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in an American Indian population. *Int J Epidemiol* 2000; 29(4): 753-756.
60. Mulholland K. Strategies for the control of pneumococcal diseases. *Vaccine* 1999; 17 Suppl 1: S79-84.

61. Murphy TV, Pastor P, Medley F, Osterholm MT, Granoff DM. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Pediatr* 1993; 122(4): 517-523.
62. Noronha CP, Struchiner CJ, Halloran ME. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case-control study. *Int J Epidemiol* 1995; 24(5): 1050-1057.
63. Obaro SK, Monteil MA, Henderson DC. The pneumococcal problem. *BMJ* 1996; 312(7045): 1521-1525.
64. O'Brien KL, Bronsdon MA, Carlone GM, et al. Effect of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal (NP) carriage among Navajo and White Mountain Apache (N/WMA) infants. In: Abstracts of the Society for Pediatric Research, Baltimore, MD, USA. 2001; abstract 1463.
65. O'Brien KL, Moulton L, Reid R, et al. Invasive disease efficacy of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine among Navajo and White Mountain Apache (N/WMA) children. In: Abstracts of the Society for Pediatric Research, Baltimore, MD, USA. 2001; abstract 1371.
66. Oostenbrink R, Maas M, Moons KG, Moll HA. Sequelae after bacterial meningitis in childhood. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(5): 379-382.

67. Pan American Health Organization. Meningococcal conjugate vaccines for Africa. In: Abstracts of Conference on Vaccines, Prevention and Public Health: a vision for the future. Washington, DC, USA: PAHO; 2002; abstract page 21.
68. Peltola H. Burden of meningitis and other severe bacterial infections of children in Africa: implications for prevention. *Clin Infect Dis* 2001; 32(1): 64-75.
69. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(2): 302-317.
70. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000; 287(5459): 1816-1820.
71. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Agents Dis* 1995; 4(1): 13-28.
72. Quagliarello VJ, Scheld WM. Treatment of bacterial meningitis. *N Engl J Med* 1997; 336(10): 708-716.

73. Rappuoli R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. *Vaccine* 2001; 19(17-19): 2319-2322.
74. Rennels MB, Edwards KM, Keyserling HL, Reisinger K, Blatter MM, Quataert SA, et al. Safety and immunogenicity of four doses of *Neisseria meningitidis* group C vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(2): 153-159.
75. Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM, Lima JB, Gouveia EL, Petersen M, et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) Meningitis and Emergence of Serotype Replacement with Type a Strains after Introduction of Hib Immunization in Brazil. *J Infect Dis* 2003; 187(1): 109-116.
76. Ruocco G, Curto S, Savio M, Laurani H, Frocht R. [Vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Uruguay: experience and impact]. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 1999; 5(3): 197-199.
77. Sader HS, Gales AC, Granacher TD, Pfaller MA, Jones RN. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates in Latin America: results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-98). *Braz J Infect Dis* 2000; 4(5): 245-254.
78. Salisbury D. Introduction of a conjugate meningococcal type C vaccine programme in the UK. *J Paediatr Child Health* 2001; 37(5): S34-36.

79. Scholten RJ, Bijlmer HA, Poolman JT, Kuipers B, Caugant DA, Van Alphen L, et al. Meningococcal disease in The Netherlands, 1958-1990: a steady increase in the incidence since 1982 partially caused by new serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*. *Clin Infect Dis* 1993; 16(2): 237-246.
80. Schwartz B, Moore PS, Broome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2 Suppl: S118-124.
81. Shinefield H. Pneumococcal conjugate vaccine and ongoing lessons. *Int J Clin Pract Suppl* 2001; (118): 23-25.
82. Simões LLP, Andrade ALSS, Laval CABP, Oliveira RM, Silva SAE, Martelli CMT, et al. Effectiveness of *H. influenzae* b conjugate vaccine on meningitis in Central Brazil. In: International Journal of Epidemiology. XVI IEA World Congress of Epidemiology of the International Epidemiology Association. Oxford; 2002.
83. Takala AK, Eskola J, Leinonen M, Kayhty H, Nissinen A, Pekkanen E, et al. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1991; 164(5): 982-986.
84. Takemura NS, Andrade SM. Meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b em cidades do estado do Paraná, Brasil. *J Pediatr (Rio J)* 2001; 77(5): 387-392.

85. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* 1999; 281(16): 1520-1527.
86. Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 2000; 287(5459): 1809-1815.
87. Trotter CL, Ramsay ME, Kaczmarek EB. Meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England and Wales: coverage and initial impact of the campaign. *Commun Dis Public Health* 2002; 5(3): 220-225.
88. Twumasi PA, Jr., Kumah S, Leach A, O'Dempsey TJ, Ceesay SJ, Todd J, et al. A trial of a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in African infants. *J Infect Dis* 1995; 171(3): 632-638.
89. Waggoner-Fountain LA, Hendley JO, Cody EJ, Perriello VA, Donowitz LG. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin Infect Dis* 1995; 21(5): 1322-1324.
90. Wenger JD, DiFabio J, Landaverde JM, Levine OS, Gaafar T. Introduction of Hib conjugate vaccines in the non-industrialized world: experience in four 'newly adopting' countries. *Vaccine* 1999; 18(7-8): 736-742.

91. Wolf B, Rey LC, Brisse S, Moreira LB, Milatovic D, Fleer A, et al. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children with community-acquired pneumonia and children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(5): 757-765.
92. Woods CW, Armstrong G, Sackey SO, Tetteh C, Bugri S, Perkins BA, et al. Emergency vaccination against epidemic meningitis in Ghana: implications for the control of meningococcal disease in West Africa. *Lancet* 2000; 355(9197): 30-33.
93. World Health Organization. Vaccines & Surveillance [Internet site]. Available: <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/HibVacUseMar02.htm> Accessed 20 November 2002.
94. World Health Organization. Expert review of a tool for rapidly assessing *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease burden [Internet site]. Geneva, October 2000. Available: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF01/www604.pdf>. Accessed 14 November 2002.
95. World Health Organization. Report of a meeting on priorities for pneumococcal and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine development and introduction [Internet site]. Geneva, February 2000. Available: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF01/www530.pdf>. Accessed 20 November 2002.

96. Zollinger WD, in *New Generation Vaccines*, Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds. Deker, New York, 1997, p. 469; Peltola H, *Drugs* 1998; 55(3): 347.

**The role of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* as a surrogate marker for invasive disease in infants with pneumococcal meningitis.**

a ser submetido ao *Journal of Clinical Microbiology*

## **Abstract**

We described the epidemiological relationship of nasopharyngeal/NP and cerebrospinal fluid/blood pneumococcal isolates from infants with meningitis. Overall, 17 isolates (3 triplets and 4 duplex) yielded 7 serotypes and 10 pulsed-field gel electrophoresis patterns, providing evidence that NP pneumococcal isolates are directly implicated in the pathogenesis of meningitis in children.

## **Text**

The remarkable advances accomplished in the last decade in the infectious diseases diagnosis and therapeutics have not substantially altered the worldwide burden of bacterial meningitis on infants in the current health care millennium. The majority of deaths attributed to meningitis in childhood are reported mainly in developing countries, where the *Haemophilus influenzae* b (Hib) conjugate vaccine is still not available, ranking surveillance programs as a high priority task in these regions (4, 13, 15).

*Streptococcus pneumoniae* is a major cause of invasive diseases in children under 5 years old, related to significant morbidity and mortality rates in developing regions (8, 15). With the introduction of Hib vaccine into the routine immunization programme in several countries, it has been speculated that *S. pneumoniae* would become the leading bacterial pathogen related to childhood meningitis in some regions (10). Despite the availability of the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine, its short-term implementation in developing countries is hampered by the elevated cost to accomplish the preconized schedule.

It has been well established that nasopharyngeal colonization by *S. pneumoniae* is the first step for bloodstream dissemination and ultimate progress to pneumococcal meningitis (3, 7). Although molecular studies have detected genetic relationships between invasive and carriage clones, there may be differences in the expression of virulence traits among particular clones (14). Previous reports have described a good agreement between serotypes and genotypes of isolates from cerebrospinal fluid (CSF) (5), but there is scarce information addressing the relationship of nasopharyngeal and CSF pneumococcal isolates in the same individual. As part of a major Brazilian proactive population-based surveillance on *S. pneumoniae* in childhood (1), we describe the epidemiological relationship of isolates recovered from distinct specimen sources from infants with pneumococcal bacterial meningitis, based upon phenotyping and molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). This ongoing surveillance program was conceived to improve the accuracy of the microbiological diagnosis of meningitis in children less than five years of age in all pediatric hospitals of Goiânia (Central Brazil), which congregates almost the totality of meningitis cases in the Goiás State.

Between May 2000 and August 2001, 78 children were admitted with bacterial meningitis, following the World Health Organization diagnosis guidelines (20). Written informed consent was obtained from the parents or guardians, according to the approved protocol by the Regional and National Ethical Committee. Samples from three distinct sites (blood, CSF and nasopharynx) were concurrently collected from 54 (70%) children at the time of diagnosis. The nasopharyngeal (NP) transwabs were placed in Stuart transport medium (Medical Wire & Equipment Corsham, UK) and immediately sent to

the Bacteriology Laboratory, at the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-Universidade Federal de Goiás. All the *S. pneumoniae* isolates were identified and confirmed according to standard methodology (6). Pneumococci were serotyped by Quellung reaction with sera obtained from the Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark (17), as part of the SIREVA-Vigia project. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disk diffusion method and/or MIC according to the NCCLS standard procedures (12). PFGE typing was performed at the Adolfo Lutz Institute/São Paulo, the National Reference Center for *S. pneumoniae* in Brazil, as previously described (2). Briefly, *Sma*I restriction fragments of chromosomal DNA were separated on 1% agarose gels with a CHEF-DR II system (Bio-Rad, Richmond, Calif.) and stained with ethidium bromide. Strains were determined to be of the same clone when no more than a three-band difference was observed between individual PFGE profiles determined by visual inspection (19).

A total of 13 *S. pneumoniae* isolates were identified in the CSF culture; the mean age of patients was 12.5 months (SD=14.3), with only one child older than 2 years old. Serotypes 14 and 6B were identified in 54.0% of the CSF pneumococcal isolates, followed by 9V, 19F, 23F and the non-7 valent vaccine serotypes 18B, 19A and 10A. In addition to CSF isolation, seven children had *S. pneumoniae* recovered from other sites, being 3 triplets (CSF, blood and NP) and 4 duplex (CSF and NP or blood) (Table). Overall, 17 isolates were identified, yielding 7 serotypes and 10 PFGE types. Cases 1 (triplets) and 6 (duplex) confirm the genetic relatedness of both, carriage and invasive isolates, in the same child. However, this molecular similarity was not detected for the other triplets, as can be visualized by the PFGE results in the figure.

Our findings support the use of NP isolates of *S. pneumoniae* to determine the susceptibility patterns of invasive isolates (9). For the same child, we also found good agreement between pneumococci serotypes and genotypes recovered from sterile fluids as previously reported for isolates from different patients with meningitis selected of several regions (5). The study provides evidence that NP isolates are directly implicated in the pathogenesis of meningitis in children (cases 1 and 6), although carriage isolates were not always closely related to the isolates causing the invasive disease (cases 2 and 3). This may be explained in part by the transient carriage of invasive isolates in the NP, followed by local replacement with distinct clones with great genetic diversity (7, 16). In fact, it has been well recognized that the genotypic diversity is greater among carriage clones of *S. pneumoniae* (14).

At population surveillance level, the presence of carriage isolates with virulence ability may be seen as a potential marker of the current disease (11, 18). Nonetheless, our results suggest that, at individual level, this information should be translated with caution, since current NP clones may not reflect the serotype and genotype of the disease isolate. Because isolates epidemiologically related may not be genetically related, molecular tools, such as PFGE, provide valuable information when incorporated into surveillance systems. To our knowledge, this is the first study to address the molecular epidemiology of carriage and invasive isolates concurrently recovered from the same individual. The potential role of carriage isolates, as a surrogate measure of strains causing meningitis, deserves investigation by further studies testing an extended number of isolates.

This investigation was sponsored by the Division of Vaccines and Immunization from the Pan American Health Organization, World Health Organization, the Bill and Melinda Gates Children's Vaccine Program, Brazilian Council for Research and Development/CNPq (Grants Research: # 470792/01-9, 520399/00-5, 520580/00-1), and Secretariat of Health of Goiânia Municipality.

## References

1. **Andrade, A. L. S. S.** 2002. Insights into the Epidemiology of Pneumococcal Diseases in the Developing World: Goiânia, Brazil. In: Program & Abstracts Book of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, pg 19, Anchorage, Alaska, May 5 to 8, 2002. American Society for Microbiology. [Online.] [http://www.isppd.org/program/ISPPDProg\\_AbsF.pdf](http://www.isppd.org/program/ISPPDProg_AbsF.pdf). Accessed 28 April 2002.
2. **Brandileone, M. C., J. L. Di Fabio, V. S. Vieira, R. C. Zanella, S. T. Casagrande, A. C. Pignatari, and A. Tomasz.** 1998. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. Microb Drug Resist **4**:209-17.
3. **Briles, D. E., S. K. Hollingshead, G. S. Nabors, J. C. Paton, and A. Brooks-Walter.** 2000. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine **19 Suppl 1**:S87-95.
4. **Di Fabio, J. L., and C. de Quadros.** 2001. Considerations for combination vaccine development and use in the developing world. Clin Infect Dis **33 Suppl 4**:S340-5.
5. **Enright, M. C., A. Fenoll, D. Griffiths, and B. G. Spratt.** 1999. The three major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* are the most

common clones recovered in recent cases of meningitis in Spain. J Clin Microbiol **37**:3210-6.

6. **Facklam, R. R., and J. A. I. Washington.** 1991. *Streptococcus* and related catalase-negative Gram positive cocci. In A. Balows, W. J. Hausler Jr, K. L. Hermann, H. D. Isenberg and H. J. Shadomy (ed.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

7. **Gray, B. M., G. M. Converse III, and H. C. Dillon Jr.** 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J Infect Dis **142**:923-33.

8. **Greenwood, B.** 1999. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**:777-85.

9. **Klein, D. L.** 1995. Pneumococcal conjugate vaccines: review and update. Microb Drug Resist **1**:49-58.

10. **Mulholland, K.** 1999. Strategies for the control of pneumococcal diseases. Vaccine **17 Suppl 1**:S79-84.

11. **Muller-Graf, C. D., A. M. Whatmore, S. J. King, K. Trzcinski, A. P. Pickerill, N. Doherty, J. Paul, D. Griffiths, D. Crook, and C. G. Dowson.** 1999.

Population biology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharyngeal carriage and invasive disease. Microbiology **145 ( Pt 11)**:3283-93.

12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards** 2001. Methods for dilution, antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

13. **Peltola, H.** 2000. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev **13**:302-17.

14. **Robinson, D. A., K. M. Edwards, K. B. Waites, D. E. Briles, M. J. Crain, and S. K. Hollingshead.** 2001. Clones of *Streptococcus pneumoniae* isolated from nasopharyngeal carriage and invasive disease in young children in central Tennessee. J Infect Dis **183**:1501-7.

15. **Shann, F., and M. C. Steinhoff.** 1999. Vaccines for children in rich and poor countries. Lancet **354 Suppl 2**:SII7-11.

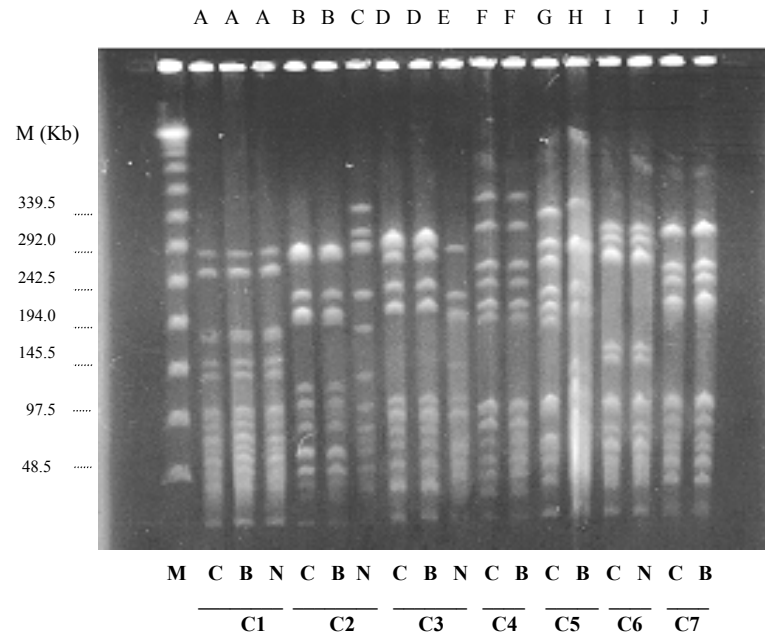
16. **Smith, T., D. Lehmann, J. Montgomery, M. Gratten, I. D. Riley, and M. P. Alpers.** 1993. Acquisition and invasiveness of different serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in young children. Epidemiol Infect **111**:27-39.

17. **Sorensen, U. B.** 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* **31**:2097-100.
18. **Takala, A. K., J. Vuopio-Varkila, E. Tarkka, M. Leinonen, and J. M. Musser.** 1996. Subtyping of common pediatric pneumococcal serotypes from invasive disease and pharyngeal carriage in Finland. *J Infect Dis* **173**:128-35.
19. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-9.
20. **World Health Organization** 1999. Laboratory Manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. [Online.] [http://www.who.int/emc-documents/meningitis/does/who\\_cdscsredc997.pdf](http://www.who.int/emc-documents/meningitis/does/who_cdscsredc997.pdf). Accessed 24 January 2002.

Table 1- Phenotyping and PFGE <sup>a</sup> patterns of isolates from CSF, blood and nasopharynx of children with *Streptococcus pneumoniae* meningitis

Case #	County of residence	Fluid	Serotypes	Penicillin susceptibility	PFGE pattern
C1	Goiânia	CSF	9V	S	A
		Blood	9V	S	A
		Nasopharynx	9V	S	A
C2	Goianópolis	CSF	6B	S	B
		Blood	6B	S	B
		Nasopharynx	6A	S	C
C3	Aparecida de Goiânia	CSF <sup>b</sup>	6B	S <sup>c</sup>	D
		Blood	6B	S	D
		Nasopharynx	6B	S	E
C4	Trindade	CSF	14	S	F
		Blood	14	S	F
C5	São Luis Montes Belos	CSF	Pool H	R	G
		Blood	23F	R	H
C6	Goiânia	CSF	14	R <sup>d</sup>	I
		Nasopharynx	14	R	I
C7	Goiânia	CSF	19A	S	J
		Blood	19A	S	J

<sup>a</sup> Pulsed-Field Gel Electrophoresis; <sup>b</sup> Cerebrospinal Fluid; <sup>c</sup> S: penicillin susceptible; <sup>d</sup> R: penicillin resistant



**Figure 1:** PFGE patterns of isolates of 7 children (C1 to C7) with *Streptococcus pneumoniae* meningitis. Letters A to J at the top of the figure are the 10 clusters revealed by the PFGE. At the bottom, letter M represents the column of molecular weight; letters C, B and N represent respectively isolates from CSF, blood and nasopharyngeal.