Isabel de Camargo Costa

Avaliação da resposta humoral à vacina pneumocócica conjugada
7-valente em grupo de crianças com infecção pelo HIV

Dissertação apresentada à Faculdade Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Evandro Roberto Baldacci

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Isabel de Camargo

Avaliação da resposta humoral à vacina pneumocócica conjugada 7-valente em grupo de crianças com infecção pelo HIV / Isabel de Camargo Costa. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Evandro Roberto Baldacci.

Descritores: 1.Vacinas conjugadas 2.*Streptococcus pneumoniae* 3.Infecções por HIV 4.Formação de anticorpos 5.Criança

USP/FM/SBD-277/07

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Evandro Roberto Baldacci, por compartilhar comigo, com generosidade, sua experiência e conhecimento.

À Dra. Helena Keico Sato, pela colaboração científica em várias etapas do trabalho.

À Dra. Karina Ribeiro, pela valiosa orientação na análise estatística.

À Profa. Dra. Magda Carneiro Sampaio e à equipe do Laboratório de Imunologia de Mucosas do ICB-USP, pela execução das sorologias.

Ao Dr. P. Takanori Sakane e à Dra. Heloísa Helena S. Marques, por muito contribuírem para minha formação durante a residência e especialização.

Ao Dr. Marcelo G. Vallada, pelo importante incentivo.

À minha tia, Profa. Dra. Beatriz de Camargo, por todo o apoio.

Ao meu irmão, Marcelo, pelos muitos momentos de ajuda decisiva e à minha irmã, Celina, pelas sugestões.

Aos meus pais, Ruth e Marcelo, por acreditarem em mim.

À Ana Cristina, pela verdadeira amizade.

E ao Ricardo, sempre ao meu lado, pelo carinho e apoio constantes.

Sumário

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1.Introdução	01
2.Objetivos.....	39
3.Métodos.....	40
4.Resultados.....	48
5.Discussão.....	64
6.Conclusões.....	75
7.Referências Bibliográficas.....	92

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1	Distribuição dos títulos geométricos médios dos resultados de sorologias pré e pós-vacinais de acordo com sorotipo pneumocócico, em crianças com infecção pelo HIV, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	55
Tabela 2	Distribuição dos títulos geométricos médios dos resultados de sorologias pré e pós-vacinais de acordo com sorotipo pneumocócico, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com faixa etária, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	55
Tabela 3	Distribuição dos títulos geométricos médios dos resultados de sorologias pré e pós-vacinais de acordo com sorotipo pneumocócico, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com a vacinação prévia com a polissacarídea 23-V, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	56
Tabela 4	Proporções de amostras que apresentaram aumento de 4 vezes ou mais dos títulos de anticorpos pós-vacinais em relação aos pré-vacinais em crianças com infecção pelo HIV, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	56
Tabela 5	Proporções de amostras que apresentaram aumento de 4 vezes ou mais nos títulos pós em relação aos pré-vacinais, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com faixa etária, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	57
Tabela 6	Proporções de amostras que apresentaram aumento de 4 vezes ou mais nos títulos pós em relação aos pré-vacinais, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com vacina 23-V, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	58
Tabela 7	Proporções de amostras que apresentaram títulos sorológicos pós-vacinais iguais ou maiores que 1.3 µg/mL, em crianças com infecção pelo HIV, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	59
Tabela 8	Proporções de amostras que apresentaram títulos pós-vacinais maiores ou iguais a 1.3 µg/mL, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com faixa etária, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	59

Tabela 9	Proporções de amostras que apresentaram títulos pós-vacinais maiores ou iguais a 1.3 µg/mL, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com vacinação com 23V, Instituto da Criança, 2002 a 2003.....	60
Quadro 1	Características das crianças que apresentaram títulos de sorologias pós-imunização ≥ 1.3 µg/mL para pelo menos 4 sorotipos dos 7 estudados.....	61
Quadro 2	Características das crianças que apresentaram incremento de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos da sorologia pós em relação à pré-imunização para pelo menos quatro sorotipos.....	62
Quadro 3	Características das crianças que apresentaram títulos de sorologias pós-imunização > 0.35 µg/mL para pelo menos 4 sorotipos dos 7 estudados.....	63
Quadro 4	Características da população estudada, ICr, 2003 a 2003.....	54

RESUMO

COSTA, I.C. Avaliação da resposta humoral à vacina pneumocócica conjugada 7-valente em grupo de crianças com infecção pelo HIV. São Paulo, 2007. Tese (mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A doença pneumocócica invasiva é importante causa de morbi-mortalidade em crianças infectadas pelo HIV. A vacina pneumocócica conjugada 7-valente já teve sua segurança, eficácia e imunogenicidade comprovadas em crianças saudáveis, porém pouco se sabe sobre sua resposta humoral em crianças HIV-positivas. O trabalho avaliou quantitativamente a resposta com anticorpos aos 7 sorotipos pneumocócicos da vacina em um grupo de 40 crianças com infecção pelo HIV. A dosagem de anticorpos IgG contra os polissacarídes da cápsula pneumocócica foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Os anticorpos foram dosados imediatamente antes e um mês após a aplicação da segunda dose da vacina. Utilizaram-se dois diferentes critérios para avaliar a resposta à vacina: títulos de anticorpos $\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$ na sorologia pós-imunização e aumento ≥ 4 vezes nos títulos da sorologia pós em relação à pré-imunização. Observou-se aumento estatisticamente significativo dos títulos geométricos médios (TGM) pós-vacinais em relação aos pré-vacinais para todos os sorotipos estudados. Não se observou diferença estatisticamente significativa quando se comparou as crianças que haviam recebido a vacina polissacarídea 23-valente e as que não haviam recebido a vacina polissacarídea anteriormente. As crianças menores de 5 anos não apresentaram TGMs pós-imunização significativamente maiores para os sorotipos 6B e 19F. Não foi possível avaliar a interferência do CD4 na resposta sorológica à vacina conjugada pois 95% das crianças apresentavam $\text{CD4} \geq 25\%$ no momento da inclusão. Vinte e sete crianças (67.5%) tiveram resposta considerada satisfatória à vacina para 4 ou mais sorotipos vacinais quando se utilizou o valor $1.3 \mu\text{g/mL}$ como critério de resposta, enquanto, para o critério ascensão de títulos pós-imunização em relação aos pré-imunização de 4 vezes ou mais para pelo menos 4 sorotipos, a resposta foi inadequada (37.5%).

Descritores: vacinas conjugadas, *Streptococcus pneumoniae*, infecções pelo HIV, criança, formação de anticorpos.

SUMMARY

COSTA, I.C. Evaluation of the humoral response to the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in a group of HIV-infected children. São Paulo, 2007. Tese (mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Pneumococcal invasive disease is a important cause of death in HIV-infected children. Heptavalent pneumococcal conjugate vaccine has been shown to be safe, effective and immunogenic in healthy children but little is known about it when it comes to HIV-infected children. We evaluated the quantitative antibody response to the 7 pneumococcal serotypes of the vaccine in a group of 40 HIV-infected children. An enzyme immunoassay (ELISA) was used to measure the IgG antibody response. Antibodies were measured immediately before and 1 month after the second dose of the vaccine. Two criteria of response were used: IgG titers $\geq 1.3\mu\text{g/mL}$ in the post-immunization serology and an increase of at least 4-fold comparing the post-immunization with the pre-immunization serology. Statistically significant rises in the post-immunization geometric mean titers were observed for the seven serotypes studied. We did not find a statistically significant difference when we compared 2 groups: one that had been previously immunized with the polysaccharide vaccine and one that had never been immunized with that vaccine before. Children under 5 years of age did not show statistically different median geometric titers for serotypes 6B and 19F when compared to the children ≥ 5 years of age. We could not show CD4 count interference once 95% of the children had CD4 counts $\geq 25\%$. Twenty-seven (67.5%) of the children were considered to respond satisfactorily to at least 4 of the serotypes included in the conjugate vaccine when the criteria was post-immunization titers $\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$. When a increase of at least 4-fold between post-immunization and pre-immunization for at least 4 serotypes was used as criteria, our patients did not respond satisfactorily.

Descriptors: vaccines conjugate, *Streptococcus pneumoniae*, HIV infections, child, antibody formation

1. Introdução

As infecções pneumocócicas invasivas persistem como importante causa de morbi-mortalidade em seres humanos, a despeito da disponibilidade de antibioticoterapia apropriada. A doença pneumocócica invasiva é a mais comum causa infecciosa de hospitalização em qualquer faixa etária. No mundo, aproximadamente 1 milhão de mortes por ano são atribuídas à doença em menores de 5 anos. Nos EUA, são relacionados ao pneumococo 3000 casos de meningite, 50 000 casos de bacteremia, 500 000 casos de pneumonia e 7 milhões de casos de otites por ano. São ainda relacionadas a essas doenças, 40 000 mortes por ano. Cerca de metade dessas fatalidades são consideradas passíveis de prevenção (Ortqvist et al., 2005).

No Brasil, no estado de São Paulo, as infecções pneumocócicas não são menos importantes. Os coeficientes de incidência de meningite por essa etiologia são elevados, principalmente no primeiro ano de vida, onde vêm mantendo-se em patamares elevados nos últimos 10 anos. Tais patamares flutuam ano a ano entre valores de 11.3 e 31.9 por 100 000. A partir de 1 ano de vida, os coeficientes caem para um máximo de 2.4 e um mínimo de 0.2, quando analisados ano a ano, nas demais faixas etárias. Os coeficientes de letalidade também se mantêm relativamente estáveis, porém muito elevados. Os valores no primeiro ano de vida são muito altos, variando de um máximo de 49.3 em 1990 a um mínimo de 22.8 por 100 000 em 2005. Nas demais faixas etárias, os valores são também elevados e não

demonstram tendência à queda (Carvalho et al., 2005).

Esses aspectos também são observados em outras regiões do mundo, com letalidades de 20 a 30%, muito próximas às nossas, apesar de todo um arcabouço tecnológico existente na atualidade. Uma das explicações para tal fato é a fisiopatogenia da doença pneumocócica, que depende fortemente da resposta inflamatória induzida pelos peptideoglicanos e ácido teicóico da parede bacteriana. Essas substâncias são responsáveis pela intensa resposta inflamatória que acompanha a infecção pneumocócica, uma vez que estimulam o influxo de células inflamatórias e ativam a cascata do complemento e a produção de citocinas. Tais fenômenos ocorrem independentemente da bactéria encontrar-se viva. A inadequada modulação dessa resposta pelo organismo é uma das explicações para a persistência de altas taxas de letalidade da doença pneumocócica na atualidade, independentemente dos avanços tecnológicos na terapêutica (Quagliarello et al., 1992; Bogaert et al., 2004).

O *Streptococcus pneumoniae* é um coco gram-positivo, oval ou esférico, anaeróbio facultativo que cresce em pares ou cadeias curtas. Seu envelope consiste em uma cápsula polissacarídea e uma parede celular formada por polissacarídeos, proteínas e grandes quantidades de ácido teicóico, além de uma membrana plasmática formada por uma bi-camada lipídica e proteínas.

A cápsula polissacarídea do pneumococo pode variar em tamanho e composição. Esta cápsula protege o pneumococo da fagocitose, interferindo, por exemplo, na ligação do fator C3b do complemento à

superfície bacteriana. É por essa razão que a cápsula pneumocócica é considerada um importante fator de virulência do pneumococo. É esta cápsula que permite que o pneumococo sobreviva e prolifere nos tecidos, causando uma intensa resposta inflamatória. O hospedeiro responde aos componentes da parede celular liberados após a lise da bactéria. São eles o ácido teicóico e a pneumolisina que é liberada durante a lise e o crescimento bacteriano (Tonnaer et al., 2006). De outra parte, epidemiologia da doença invasiva pneumocócica está diretamente relacionada à colonização do trato respiratório alto pelo *S. pneumoniae* o que torna importante conhecer os sorotipos pneumocócicos que mais comumente colonizam as crianças de uma região.

A nasofaringe de crianças saudáveis, normais, é colonizada ao longo dos anos por diferentes cepas bacterianas. Essas bactérias resistem às defesas locais do organismo. Esse processo de colonização inicia-se logo após o nascimento (Tonnaer et al., 2006). A flora da nasofaringe consiste em bactérias aeróbias e anaeróbias, além de bactérias potencialmente patogênicas, como o *Streptococcus pneumoniae*, entre outras. No primeiro ano de vida, 95 a 100 por cento das crianças são colonizadas pelo menos uma vez por bactérias potencialmente patogênicas (Vives et al., 1997).

A taxa de colonização por pneumococo entre crianças e adultos depende de uma série de fatores. São eles: idade, raça, condições ambientais, como tabagismo e aglomerações humanas, como ocorre, por exemplo, com crianças que freqüentam creches. Em estudo realizado na Bélgica, 473 crianças de 30 diferentes creches com idades entre 3 meses e

3 anos, observou-se uma taxa média de 21% (0-76%) de colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae* entre os centros aos quais elas pertenciam, sendo 14.1% de cepas com sensibilidade reduzida à penicilina (Malfroot et al., 2004). Na Grécia, em estudo recente, observou-se em 464 crianças igualmente frequentadoras de creches, com idades variando entre 2.5 e 4.5 anos, uma taxa de 37% de colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae* (Levidiotou et al., 2006). Em outro estudo, desta vez em um país em desenvolvimento, Taiwan, com 478 crianças frequentadoras de creches, a maior positividade para o *S. pneumoniae* foi encontrada em crianças na faixa etária entre dois e cinco anos de idade (27.2%), variando entre 14.4 e 27.2% conforme a idade (Wen-Ysung et al., 2003). Na Tailândia, em 1640 pacientes de diferentes faixas etárias, que deram entrada em hospital por quadro “influenza-like” ou tiveram internação por pneumonia, observou-se que as maiores taxas de colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae* ocorreram nas crianças menores de 5 anos, com valores chegando a 60% de positividade. Não se obteve dado em relação à frequência à creche, porém, observou-se que os indivíduos pertencentes a famílias com número maior que 5 pessoas apresentaram taxas de colonização maiores que aqueles pertencentes a famílias de tamanhos menores (55% contra 45%, RR 1.2; 95% IC 1.0-1.4). Observou-se também que aquelas crianças menores de 5 anos que possuíam um comunicante intra-domiciliar tabagista também apresentavam risco aumentado para colonização pelo *S. pneumoniae* em relação às não expostas ao cigarro (63% contra 54%, RR 1.2; IC 95% 1.0-1.4). Este estudo difere dos demais

por estudar indivíduos doentes no momento da coleta da amostra. Nesta situação, acredita-se que as taxas de colonização nasofaríngea tendam a se apresentar mais elevadas, independentemente da presença ou não de outros fatores de risco (Levine et al., 2006). No Brasil, em estudo realizado por Lucarevski et al, foram obtidas amostras de secreção de orofaringe de 987 crianças matriculadas em 28 creches em Taubaté, no estado de São Paulo. A taxa de colonização de orofaringe por pneumococo encontrada foi de 21,1%, com uma média de idade de 50,6 meses (desvio padrão=9,76). O tempo de frequência à creche assim como o período de permanência na creche (meio-período ou período integral) não interferiram nas taxas de colonização orofaríngea (Lucarevski et al., 2002). Em outro estudo realizado no Brasil, em Goiânia, com 648 crianças menores de 5 anos saudáveis e doentes (infecção aguda do trato respiratório, incluindo pneumonia e meningite), a taxa média de colonização nasofaríngea encontrada foi ainda mais alta: 35.8% (95% IC 32.1-39.6%). Observou-se ainda que os sorotipos mais frequentemente encontrados colonizando o trato respiratório alto foram os mesmos isolados com maior frequência nas amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano analisadas nos casos de doença invasiva (6B, 14, 19F, 23F) (Laval et al., 2006).

Alguns grupos étnicos, como afro-americanos e índios Apache e Navajo, norte-americanos são também exemplos de populações com taxas de colonização pneumocócica mais elevadas. A população nativa do Alasca é outro desses exemplos. Além da maior colonização, esses grupos demonstram risco aumentado para doença invasiva pneumocócica, variando

de 73 a 227 casos por 100 000, enquanto o risco para crianças norte-americanas saudáveis menores de 35 meses é de 64.7 por 100 000 (Pelton et al., 2003). Por outro lado, é interessante assinalar que em algumas situações específicas, apesar de uma maior taxa de infecções invasivas, não há colonização maior. Assim ocorre nas populações imunossuprimidas como indivíduos infectados pelo HIV e portadores de anemia falciforme, grupos clássicos de maior risco para doença invasiva que não apresentam taxas aumentadas de colonização (Polack et al., 2000; Overturf et al., 2000; Russein et al., 1997).

As maiores taxas de colonização nasofaríngea são encontradas entre crianças pequenas freqüentadoras de creches (Boagaert et al., 2004). Essas crianças são consideradas um importante vetor de disseminação de cepas de pneumococos dentro da comunidade (Boagaert et al., 2004).

A colonização pelo *S. pneumoniae* depende da aderência do mesmo ao epitélio do trato respiratório. Isso ocorre através da ligação de carboidratos da superfície celular (N-acetil-glucosamina) do epitélio respiratório a proteínas da parede bacteriana (adesina A da superfície do pneumococo). Na maior parte das vezes, a colonização é assintomática e para evoluir para doença invasiva, requer produção de fatores inflamatórios, como interleucina 1 e TNF. Esses fatores desenvolvem-se normalmente nas infecções virais (Tuomanen et al., 1997). Esse processo altera o número e tipo de receptores nas células epiteliais e endoteliais, assim como altera a afinidade do pneumococo a esses receptores, levando à invasão. Uma série de outras substâncias participam do processo. As neuraminidases dos vírus

influenza e parainfluenza, por exemplo, parecem contribuir para uma maior aderência do pneumococo facilitando as infecções (Boagaert et al., 2004).

A sequência de eventos que se segue à colonização inicial da mucosa respiratória pode levar ou não ao processo infeccioso localizado ou invasivo. Na fisiopatogenia da meningite pneumocócica, após a colonização da mucosa o pneumococo invade a corrente sanguínea e penetra a barreira hemato-liquórica, passando a multiplicar-se no líquido cefalorraquidiano (LCR). Outra maneira de atingir as meninges seria através da disseminação a partir de uma infecção contígua, como uma sinusite ou mastoidite. Nas crianças pequenas, uma simples infecção do ouvido médio constitui-se em um fator predisponente comum (Quagliarello et al., 1992).

Para invadir o epitélio mucoso efetivamente, a bactéria precisa “escapar” da IgA secretória e dos mecanismos de *clearance* ciliar da mucosa nasofaríngea, ligar-se à membrana apical da célula e daí atravessar a membrana basolateral da célula epitelial. O *S. pneumoniae* produz uma protease capaz de clivar a IgA secretória, facilitando, portanto, a adesão da bactéria à célula epitelial. A adesão e a invasão do *S. pneumoniae* ao epitélio ocorre através da participação de epítomos na superfície bacteriana e receptores na célula epitelial, específicos. Na sequência, o mecanismo de defesa do hospedeiro, uma vez que a bactéria invadiu a circulação é através do complemento produzido pela via alternativa da cascata do complemento. A partir daí, a bactéria é capaz de penetrar a barreira hemato-encefálica e penetrar no sistema nervoso central (SNC). A proteína de superfície do pneumococo, CbpA, é uma das facilitadoras da penetração deste na barreira

hemato-liquórica (Quagliarello et al., 1992).

Uma vez multiplicando-se no LCR, o pneumococo, através dos peptidoglicanos de sua parede celular provoca uma intensa resposta inflamatória que é responsável por grande parte da sintomatologia observada no quadro de meningite e que persiste mesmo após a bactéria ter sido destruída pelas resposta do hospedeiro e antibioticoterapia. Uma série de mediadores inflamatórios são produzidos e secretados no SNC, pelos astrócitos e pelas células endoteliais, células da glia e células endoteliais. São eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-8 (IL-8), a interleucina-10 (IL-10), as proteínas 1 e 2 induzidas pelos macrófagos, e outros, como, óxido nítrico, metaloproteinase-2 e prostaglandinas. É discutido se o uso de antimicrobianos bactericidas no tratamento da meningite causa lise de bactérias e uma maior produção e liberação de citocinas e fatores inflamatórios. Em decorrência dessas substâncias, surgem o edema cerebral e o aumento da pressão intra-craniana contribuem para uma ainda maior lesão neuronal, podendo resultar na morte do hospedeiro (Quagliarello, 1992; Schulman et al., 1997; Chávez-Bueno et al., 2005).

Os estudos de colonização nasofaríngea ao lado da caracterização sorotípica do *S. pneumoniae*, a par de informar sobre peculiaridades dos sorotipos circulantes em um grupo da comunidade, informa-nos sobre o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

O surgimento de pneumococos resistentes à penicilina foi primeiramente descrito na Austrália e na África do Sul nos anos 60 e 70. O

primeiro caso de resistência pneumocócica à penicilina foi descrito na Austrália em 1967, com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 0,6 mcg/mL (Hansman et al., 1967). De acordo com as normas atuais do “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), os pontos de corte (“breakpoints”) dos MIC para penicilina são os seguintes: ≤ 0.06 mcg/mL (susceptíveis), 0.12-1.0 mcg/mL (intermediário) e ≥ 2.0 mcg/mL (resistente) (NCCLS, 2002; Jacobs et al., 2004; Sinner et al., 2004).

Nas décadas seguintes, os casos de resistência surgiram em várias regiões geográficas do mundo, com um aumento mais significativo ocorreu nos anos 90 (Rubin et al., 2000). Dados Norte-americanos mostravam, no final dos anos 80, que a prevalência de cepas não -sensíveis à penicilina de *S. pneumoniae* era de 4% e em menos de uma década, aumentaram para cerca de 25% (Applebaum et al., 2002).

Desde o início do problema, o fato foi relacionado à pressão seletiva que pneumococo vinha sofrendo pelo uso disseminado da penicilina, especialmente utilizada em profilaxias prolongadas. Essa disseminação mundial de cepas de pneumococo resistentes à penicilina pareceu estar relacionada à disseminação mundial de alguns clones resistentes de sorotipos como 6B, 19F e 23F. Nos EUA, dados de vigilância mostram que as taxas de *S. pneumoniae* não sensíveis à penicilina variam de 25% a mais de 50%, sendo 11 a 28% de resistência intermediária (Appelbaum et al., 2002).

Nos EUA, hoje, 34% dos casos de doença invasiva são causados por *S. pneumoniae* resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 17% são

causados por cepas com resistência a 3 ou mais antimicrobianos, segundo dados do “Centers for Disease Control” de Atlanta (CDC, 2007). O programa do “Centers for Disease Control”, “Active Bacterial Core Surveillance”, mostrou que em algumas áreas dos Estados Unidos, até 30% dos isolados não foram susceptíveis à penicilina. Resultados do Programa de Vigilância de antimicrobianos “Sentry”, em 1997, chegaram a mostrar taxas de até 43.8% de resistência à penicilina (Doern et al., 1998).

Na Suécia, estudo prospectivo de vigilância mostrou, no período de 1995 a 2001, uma frequência média de *S. pneumoniae* não sensíveis à penicilina, de 7.4% (2750 não sensíveis em 34745 pneumococos) entre culturas de nasofaringe (Melander et al., 2004).

Na Europa, dentre os países que se destacam por altas taxas de resistência pneumocócica à penicilina está a Espanha. Estudo realizado em Madrid, com análise de cepas de *S. pneumoniae* isoladas de crianças com doença invasiva, encontrou-se até 58% de resistência à penicilina (Ramos et al., 1998).

No Brasil, os dados do Programa de Vigilância para Doença Pneumocócica Invasiva mostraram que, de 1993 a 2004, as taxas de resistência do *S. pneumoniae* à penicilina elevaram-se de 10.2% a 27.9%. As taxas de resistência plena, por sua vez, elevaram-se de 1.1% para quase 6% (Brandileone et al., 2006). No estado de Minas Gerais, no período de 1997 a 2004, em *S.pneumoniae* isolados de culturas de sangue e LCR, em pacientes com doença invasiva pneumocócica, observou-se 11.8 % de cepas com sensibilidade reduzida à penicilina. A faixa etária que contribuiu

com o maior número de espécimes para a realização do estudo foi a dos menores de 1 ano de idade (Bedran et al., 2005).

A identificação em tipos específicos de pneumococos é baseada em sua cápsula polissacarídea. São identificados hoje 90 polissacarídeos capsulares imunologicamente distintos. De acordo com o sistema holandês de classificação, os sorotipos são agrupados em sorogrupos segundo suas semelhanças antigênicas (Mandell et al., 2006). A maioria dos quadros patogênicos é causada por um número restrito de sorotipos pneumocócicos. São dez os sorogrupos responsáveis pela maior parte dos episódios de doença invasiva pneumocócica em crianças, nas diversas regiões geográficas, sendo os principais os sorogrupos 1, 6, 14, 19 e 23. Os sorotipos 1 e 5 ficaram conhecidos como sorotipos de países em desenvolvimento, pela alta prevalência nesses países, porém hoje são a cada dia mais encontrados também em países industrializados (Hausdorff et al., 2005).

Os estudos epidemiológicos da doença pneumocócica no mundo são em grande parte baseados em culturas de secreção naso e orofaríngea, já comentadas anteriormente, e também em culturas de líquidos normalmente estéreis de pacientes com doença invasiva. Os sorotipos mais freqüentemente associados à resistência à penicilina são aqueles que com maior freqüência colonizam o trato respiratório alto, uma vez que é lá que são expostos à pressão antimicrobiana por longos períodos de tempo e onde têm contato com espécies bacterianas comensais capazes de transmitir genes de resistência. Entre esses sorotipos, encontram-se o 6B, 9V, 14, 19F

e 23F, além do 6A e 19A (Hausdorff et al., 2005).

Historicamente, determinar a etiologia da pneumonia em crianças sempre foi tarefa difícil. Isso se deve ao fato de que as técnicas disponíveis para etiologia são limitadas na obtenção de material fidedigno para correlacionar com a etiologia. Mesmo em condições ideais, sabe-se que a positividade das hemoculturas é muito baixa (10-20%) nas pneumonias, os estudos por punção tem limitações nos diferentes tipos de pneumonias e os testes imunológicos têm uma boa sensibilidade mas baixa especificidade (Greenwood et al., 1999).

Estudo importante, nesse sentido, foi realizado em área rural do Gâmbia, na África. O' Dempsey et al., no final da década de 80, realizaram estudo prospectivo, de vigilância, em que ao primeiro sinal de doença, as crianças de diferentes faixas etárias eram submetidas à coleta de fluidos previamente estéreis (sangue, LCR), na tentativa de identificar agente etiológico. A partir daí, foi possível calcular-se coeficientes de incidência de doença invasiva pneumocócica por faixa etária: 554 por 100 000/ano para o menores de 1 ano, 458 por 100 000/ano para os menores de 2 anos e 240 por 100 000/ano para os menores de 5 anos de idade (O'Dempsey et al., 1996). O estudo do Gâmbia foi um dos primeiros publicados a tentar estimar a importância da doença invasiva pneumocócica em um país pobre, em desenvolvimento, que representa grande parte da África (Greenwood et al., 1999).

Na América Latina, a partir de 1993, a Organização Pan-Americana de Saúde deu início ao projeto Sistema Regional de Vacinas

(SIREVA-Vigía) com ajuda de fundos da Agência de Desenvolvimento Internacional Canadense. O projeto visou proporcionar a vigilância laboratorial do *Streptococcus pneumoniae* na América Latina, inclusive no Brasil, e conhecer a prevalência relativa dos antígenos capsulares e a susceptibilidade antimicrobiana do *S. pneumoniae* causador de doença invasiva, especialmente a pneumonia em crianças pequenas. O objetivo final era o de um melhor controle da doença pneumocócica nestes países e o conhecimento dos sorotipos mais freqüentes para o desenvolvimento de vacinas.

A taxa de pneumococos resistentes à penicilina encontradas na época no estudo, num período de 1993 a 1999, no Brasil, foi de 20.7%, sendo de 1.6% de resistência plena. Participaram inicialmente do projeto 20 hospitais pertencentes a 12 diferentes cidades no Brasil. A grande maioria dos casos foram de lactentes menores de 2 anos de idade (78,7%), confirmando o que já se sabia ocorrer nos países desenvolvidos, e os principais diagnósticos foram os de pneumonia e meningite, seguidos por sepse e bacteremia sem foco (Di Fabio et al., 2001).

A análise epidemiológica das amostras mostrou que no Brasil, à semelhança de outros países no mundo, o sorotipo 14 era prevalente (24.9%), seguido por 6A/6B (15.3%), 1 (9.8%), 18C (7.4%), 23F (5.2%), 19F (4.5%), 9V (4.4%), 19A (3.5%), 3 (2.0%), 9N (1.7%), 4 (1.5%) e 7F (0.7%). Relacionando a tipagem aos diagnósticos clínicos, observou-se que os 11 tipos capsulares mais freqüentes foram responsáveis por 86.2% das

pneumonias, 78.3% das meningites e 76.9% das sepse e bacteremias (Di Fabio et al., 2001).

Desde então, diversas outras publicações mostraram alguma diversificação na resistência aos antimicrobianos e na distribuição de sorotipos nas diferentes regiões do país ao longo do tempo (Sniadack et al., 1995; Hein et al., 1995; Brandileone et al., 1995, 1998, 2003, 2006; Kertesz et al., 1998; Berezin et al., 1996; Laval et al., 2006).

O sorotipo 14, por exemplo, vem aumentando em prevalência, já atingindo taxas acima de 50 por cento (54.1%) em 2004. Tal fato, acredita-se dever-se à disseminação de clones internacionais deste sorotipo (Spain 9v-3 e Tennessee 14-18) (Brandileone et al., 2006).

A partir desses estudos, foi possível confirmar as diferentes distribuições dos sorotipos pneumocócicos de acordo com a área geográfica em questão, especialmente, na América do Sul.

É frente a essa situação, de aumento de resistência bacteriana e dificuldade no tratamento da doença pneumocócica que a prevenção da doença tornou-se fundamental.

A busca por vacinas contra pneumococos foi introduzida muito cedo, em 1945, utilizando polissacárides capsulares. Entretanto, a percepção na época era de que a penicilina recentemente surgida era muito eficaz contra o pneumococo e este não representaria problema de saúde pública. Somente muito mais tarde é que a real importância do desenvolvimento de uma vacina ficou evidente (Orqvist et al., 2005).

As vacinas, a par de representarem importante ganho na prevenção das doenças pneumocócicas em imunocompetentes, têm ainda maior significado para os grupos de crianças com imunodeficiências, com destaque neste trabalho para as crianças infectadas pelo HIV.

No final dos anos 80, os primeiros trabalhos visando estimar a incidência e causa de doença bacteriana na população de crianças com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) começaram a surgir. Em 1985, Bernstein et al., estudaram 46 crianças infectadas pelo HIV e encontraram 27 episódios de sepse em 21 desses pacientes. Dentre os microorganismos mais freqüentemente encontrados estava o *S. pneumoniae* (Bernstein et al., 1985). Krasinski et al. também encontrou o *S. pneumoniae* como agente importante nas infecções bacterianas nas crianças HIV-positivas quando estudou retrospectivamente 71 crianças HIV-positivas durante um período de três anos e meio. Constatou que 63% (44) das crianças necessitaram em algum momento da realização de uma cultura de sangue e, nestas, em 28% foi isolado um agente. O pneumococo foi o agente mais freqüentemente isolado, em 31% (11 de 35 hemoculturas), confirmando mais uma vez sua importância como agente de doença bacteriana nesta população (Krasinski et al., 1988).

Na década de 90, mais trabalhos surgiram com o objetivo de estimar especificamente a incidência de doença invasiva pneumocócica nas crianças com infecção pelo HIV.

Em 91, Hsu et al., em trabalho apresentado na VII Conferência Internacional em AIDS, em Florença, encontrou uma incidência de

bacteremia em crianças infectadas pelo HIV de 6,7 episódios por 100 pacientes-ano.

Farley *et al.*, em 1994, seguiram uma coorte de lactentes infectados pelo HIV prospectivamente desde o nascimento e observaram uma incidência de 11.3 por 100 crianças-ano durante os primeiros 3 anos de vida, em comparação a 0.5 para o grupo controle. Participaram do estudo 169 crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV, das quais 41 mostraram estar realmente infectadas e 71 crianças de mães HIV-negativas (grupo controle). Periodicamente essas crianças eram submetidas a avaliações clínicas e laboratoriais detalhadas, além de avaliações extras durante os episódios de doença febril aguda. Considerou-se como doença invasiva pneumocócica toda episódio em que ocorreu crescimento em cultura do pneumococo em amostra de sítio normalmente estéril. A grande maioria dos episódios de doença invasiva nas crianças infectadas pelo HIV (7 de 10) foram de bacteremia oculta. A incidência de doença invasiva foi considerada alta e essa maior predisposição da população HIV-positiva à doença invasiva foi atribuída à soma de 2 fatores: a resposta retardada aos antígenos polissacarídeos pneumocócicos que se sabe ocorrer nas crianças menores de 18 a 24 meses somada à imunidade humoral deficiente que sabidamente ocorre na infecção pelo HIV (Farley *et al.*, 1994).

Andiman *et al.* seguiram uma corte de crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV visando determinar as taxas de doença invasiva bacteriana nesta população. Vinte e uma das crianças foram diagnosticadas como portadoras do HIV e 10 dessas portadoras contribuíram com 48% (11)

dos 23 episódios de doença invasiva encontrados. Oito (35%) desses episódios de doença invasiva foram causados pelo *S. pneumoniae*, demonstrando sua importância como agente patogênico nesta população (Andiman et al., 1994).

Gesner et al., também em 94, realizou estudo objetivando caracterizar a doença pelo *S. pneumoniae* na população de crianças infectadas pelo HIV, menores de 18 anos. Neste estudo retrospectivo foram levantados todos os casos de bacteremia e meningite por *S. pneumoniae* no período de agosto de 78 a julho de 93. Dezenove das 235 crianças HIV-positivas apresentaram 35 casos de doença invasiva pneumocócica. Constatou-se que as crianças HIV-positivas eram mais susceptíveis a apresentarem múltiplos episódios de doença pneumocócica que as saudáveis, mesmo apresentando idades mais elevadas (média de 1.8 anos comparados a 1.1 anos nas saudáveis). A distribuição dos sorotipos pneumocócicos, por sua vez não variou entre os grupos (Gesner et al., 1994).

Outro estudo foi realizado na África do Sul por Madhi *et al.*, em 2000, em crianças menores de 12 anos que foram submetidas a coleta de hemocultura ou cultura de líquido cefalorraquidiano (LCR) e em que se isolou *S. pneumoniae*. Foram encontrados 237 casos de doença invasiva por *S. pneumoniae*, dos quais 64.9% ocorreram em crianças HIV-positivas demonstrando um risco 41.7 vezes maior (95% IC, 26.5 a 65.6) desta população desenvolver infecção invasiva pelo pneumococo em relação a uma população de crianças saudáveis da mesma faixa etária. As cepas de *S.*

pneumoniae foram submetidas a sorotipagem e teste de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em disco. Os sorotipos mais freqüentemente encontrados foram 23F, 6A, 6B, 19A, 19F, 9V, 9N e 9L. A resistência do *S. pneumoniae* a múltiplas drogas foi mais elevada nas crianças HIV-positivas (35 de 146 isolados (24%)) em relação às crianças HIV-negativas (8 de 78 isolados (6.4%), RR 2.76; 95% IC 1.13 a 6.93) (Madhi et al., 2000).

O maior risco para infecção invasiva pneumocócica está claramente definido para este grupo e a procura seguinte é a de avaliar a eficácia e a imunogenicidade das vacinas pneumocócicas e as opções quando se pensa em estratégias para controlar a infecção nesta população.

A maioria dos casos de infecção pelo HIV na faixa etária pediátrica ocorre por infecção vertical, isto é, da mãe para a criança. Sabe-se também que, em uma parte dessas crianças, a progressão da doença ocorre mais rapidamente nos adultos, se não for instituída uma terapêutica adequada. Quando não tratadas, uma parcela dessas crianças apresentará uma queda significativa nos níveis de CD4 ao final do primeiro ano de vida, tornando-se susceptíveis às mais variadas doenças. Muitas dessas doenças que contribuem para o aumento das taxas de mortalidade nas crianças HIV-positivas não tratadas são doenças imuno-previníveis, mas ainda há questões a serem esclarecidas em torno dos riscos e benefícios e eficácia das vacinas nesta população (Obaro et al., 2004). Além da questão efetividade ou eficácia em relação às vacinas, em indivíduos com um sistema imune deficitário, a questão segurança também deve ser ressaltada.

As vacinas virais atenuadas e a BCG são vacinas sabidamente com maior frequência de eventos adversos em indivíduos com imunodeficiências. De modo geral, estas vacinas não são recomendadas para indivíduos com infecção pelo HIV que apresentem imunodeficiência grave (com níveis de linfócitos T CD4+ abaixo de 15% do valor normal para a idade), como sugerem as recomendações do “Advisory Committee on Immunization Practices” (ACIP) e da Organização Mundial da Saúde (OMS). (MMWR, 2000; Moss et al., 2003). Além de considerar o estado imune do indivíduo, é sensato observar a prevalência de determinada doença em determinada região do mundo para justificar o uso da vacina. Desta forma, o ACIP e a OMS divergem em opinião na hora de indicar a vacina oral para o vírus da poliomielite (OPV). O risco de indivíduos com imunodeficiência primária de células B desenvolverem poliomielite vacinal em relação a uma população saudável é aumentado. Nos EUA, o ACIP recomenda o uso da vacina inativada para a poliomielite nos indivíduos com infecção pelo HIV. Porém, até hoje, só foram descritos dois casos de poliomielite pelo vírus vacinal em crianças infectadas pelo HIV, no mundo, sendo um na Romênia e um no Zimbábue e não seria prático contra-indicar a vacina oral para todas as crianças nascidas de mães HIV-positivas, especialmente nos países que ainda apresentam circulação do vírus selvagem da poliomielite, considerando-se o baixo custo e facilidade de administração desta. Outras vacinas que passam por essas discussões são as vacinas BCG, a vacina para o vírus do sarampo e a vacina para o vírus da febre amarela (Moss et al., 2003).

Outra preocupação em relação às crianças com infecção pelo HIV seria que as imunizações causariam ativação e proliferação das células T, liberação de citocinas, aumento da replicação do HIV e, conseqüentemente, maior deterioração do sistema imune. Diversos estudos já se propuseram a estudar este aumento transitório da replicação viral, a maioria deles em relação à vacina contra o vírus Influenza. Alguns deles demonstraram um aumento transitório das cargas virais seguindo-se à vacinação, porém, as conseqüências, a longo prazo, desses aumentos transitórios de viremia ainda não estão bem esclarecidas (Moss et al., 2003; Obaro et al., 2004).

Ramilo et al. estudou 16 crianças infectadas pelo HIV com idades entre 6 meses e 14 anos. Essas crianças foram submetidas a coletas de sangue para quantificar a carga viral, imediatamente antes de receber a vacina para o vírus Influenza, e 2, 4 e 6 semanas após terem recebido a vacina. Cinco das dezesseis crianças apresentaram aumento significativo da carga viral após a vacinação, porém em 4 das 5, a carga viral retornou aos níveis anteriores no período de 6 a 8 semanas após a imunização, confirmando que o aumento da replicação do HIV é, de fato, um fenômeno transitório (Ramilo et al., 1996).

No Brasil, estudo realizado por Marques em 2000, com população de crianças infectadas pelo HIV que receberam as vacinas contra hemófilos e pneumocócica polissacarídea 23-valente, das 17 crianças vacinadas, apenas uma apresentou aumento significativo da carga viral após a vacinação (Marques et al., 2000).

Finalmente, a grande questão em relação às imunizações na criança infectada pelo HIV diz respeito à sua resposta. A resposta precária a uma vacina deve-se a alguns fatores: a uma resposta primária ruim, a uma dificuldade na geração de células de memória ou mesmo à perda dessas células de memória. Na criança infectada pelo HIV todos esses fatores podem interferir. A resposta à imunização é um fenômeno complexo que requer a integração de uma série de componentes do sistema imune, que incluem células apresentadoras de antígenos, linfócitos B e linfócitos T. O HIV pode afetar tanto quantitativamente, quanto qualitativamente todas essas células. No que diz respeito à resposta primária às vacinas, as crianças infectadas pelo HIV parecem apresentar defeitos no estágio de processamento do antígeno e não conseguem estimular memória imunológica. Os linfócitos T CD4+, destruídos pelo HIV, são de fundamental papel para que as células B produzam anticorpos contra os antígenos T-dependentes. Os mecanismos de manutenção da memória imunológica também são afetados pelo HIV, uma vez que o vírus é capaz de infectar e destruir (ou, pelo menos, alterar funcionalmente) as células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e sub-populações de linfócitos (Obaro et al., 2004).

Na década de 60 ressurgiu o interesse por uma vacina pneumocócica em decorrência da detecção da resistência ao pneumococo. A primeira vacina a ser desenvolvida foi uma vacina polissacarídea, tetravalente, consistindo de 30 a 60 mcg de polissacáride capsular dos tipos I, II, V e VII (Rubin et al., 2000).

Em 1977, uma vacina polissacarídea 14-valente foi licenciada nos Estados Unidos. Sorotipos adicionais foram sendo incluídos até se desenvolver a vacina 23-valente contendo os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F que foi aprovada pelo “Food and Drug Administration” (FDA) em 1992 e que até hoje é utilizada em adultos e crianças maiores de 2 anos de idade (Rubin et al., 2000).

Os estudos iniciais com a vacina polissacarídea 23-valente foram estudos de eficácia em adultos saudáveis e os resultados iniciais demonstraram uma eficácia de 60 a 70% para prevenir pneumonia e bacteremia pelo *S. pneumoniae* (LaForce et al., 1989).

A imunogenicidade da vacina polissacarídea 23-valente depende da idade da criança e varia conforme o sorotipo. Lactentes menores de 6 a 9 meses têm uma resposta limitada ou não apresentam qualquer resposta. Crianças entre 2 e 5 anos de idade apresentam uma resposta melhor que as menores de 23 meses. A resposta imune dos sorotipos varia amplamente, sendo que as crianças tipicamente mostram baixa resposta aos sorotipos pneumocócicos 6 A, 14 e 23F, que estão entre os sorotipos que mais comumente causam doença nas crianças. A revacinação com uma segunda dose da vacina não aumenta significativamente a resposta com anticorpos (Rubin et al., 2000; Temple et al., 1991; Douglas et al., 1983). A baixa imunogenicidade da vacina pneumocócica polissacarídea em crianças menores de 2 anos relaciona-se à natureza T-independente de sua resposta imune. Os polissacárides pneumocócicos têm propriedades de antígenos

tipo T-independentes, o que significa em última análise, uma resposta IgG restrita, uma baixa produção de células B de memória e uma falha em estimular resposta em lactentes, como consequência (Stein et al., 1992; Eskola et al., 2000).

Já a resposta imune às vacinas polissacarídeas conjugadas a proteínas é T-dependente. Os peptídeos dos conjugados polissacarídeo-proteína são apresentados às células T helper tipo 2 (Th2) pelas células apresentadoras de antígenos. Outros conjugados ligam-se às células B, sofrem endocitose e são processados pelas células B. Os peptídeos resultantes são expressos na superfície das células B por moléculas do antígeno de histocompatibilidade classe II (MHC classe II). Estes complexos são reconhecidos pelas células Th2 ativadas que, conseqüentemente, liberam interleucinas 4, 5 e 6. Essas interleucinas, por sua vez, fazem com que as células B diferenciem-se e expressem IgG específicas aos polissacarídeos em sua superfície. Os anticorpos tipo IgG conferem imunidade duradoura a esse tipo de vacina. Por esse mecanismo, crianças pequenas, até menores de 2 anos de idade, têm capacidade de responder à vacina. Crianças portadoras de doenças que comprometem o sistema imunológico como a infecção pelo HIV também poderiam apresentar resposta mais satisfatória às vacinas conjugadas do que as polissacarídicas, pelos mecanismos acima descritos (Ada et al., 2001).

Nas crianças infectadas pelo HIV, o efeito específico do vírus sobre o sistema imune, através a destruição de células T CD4⁺ e macrófagos pela replicação viral e da resposta B inespecífica induzida pelo

vírus, soma-se a essa imaturidade imunológica já existente para prejudicar ainda mais a resposta vacinal.

Há mais de uma década, a resposta humoral à vacina pneumocócica polissacarídea vem sendo estudada nos indivíduos com infecção pelo HIV, entre os quais, adultos e crianças (Ada et al., 2001; Obaro et al., 2004).

A vacina polissacarídea pneumocócica não demonstrou nenhum efeito contra otites médias e infecções do trato respiratório baixo nesses indivíduos. O efeito sobre a colonização por sorotipos vacinais também não foi encontrado.

Em estudo realizado em grupo de 33 crianças com infecção pelo HIV com a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente, observou-se que apenas 5 (15,1%) destas crianças obtiveram resultado considerado como satisfatório em termos de resposta sorológica (concentrações séricas de IgG pós-imunização maiores ou iguais a 1,3 µg/mL e /ou aumento igual ou superior a quatro vezes do valor pós em relação ao pré-imunização para três ou mais dos seis sorotipos testados), demonstrando a baixa imunogenicidade desta vacina na população de crianças com infecção pelo HIV (Marques et al., 2000).

Diante das limitações da vacina pneumocócica polissacarídea para lactentes e populações com doença de base e frente ao sucesso da vacina conjugada contra o *Haemophilus influenza* no mundo todo, surge a idéia de produzir uma vacina polissacarídea conjugada a uma proteína

também para o pneumococo, nos moldes da vacina contra hemófilos já existente (Stein et al., 1992).

Em 1929, Goebel e Avery foram os primeiros a demonstrar que a imunogenicidade de um antígeno composto por carboidrato poderia ser melhorada se esse antígeno fosse ligado, de forma covalente, a uma proteína carreadora e imunogênica. O princípio já era conhecido há bastante tempo quando as primeiras vacinas conjugadas foram desenvolvidas (Eskola et al., 2004). As vacinas conjugadas têm uma imunogenicidade melhor em crianças pequenas e preparam o sistema imune para uma resposta anamnésica frente a uma subsequente dose da vacina ou a uma exposição à bactéria patogênica (Rubin et al., 2000).

Algumas vacinas pneumocócicas conjugadas já foram testadas e todas elas demonstraram induzir boa resposta imune em crianças menores de 2 anos e produzir resposta anamnésica a reforços (“booster”) (Rubin et al., 2000; Eskola et al., 1999; Overturf et al., 2002). Foram estas as formulações monovalentes, pentavalentes, heptavalentes, nanovalentes e 11-valentes.

A vacina pneumocócica heptavalente conjugada é licenciada atualmente nos EUA e no Brasil. Esta vacina compreende 6 antígenos pneumocócicos polissacarídeos (4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F) e um antígeno oligossacarídeo (18C) conjugados a 20mcg da proteína CRM197. A dose recomendada é de 0,5 mL que contém 2 µg de cada antígeno, com exceção do 6B (4µg) e 0,5 mg de fosfato de alumínio adicionados como um adjuvante.

Como a vacina pneumocócica conjugada heptavalente foi desenvolvida em torno dos sorotipos pneumocócicos predominantes nos Estados Unidos da América e a distribuição dos sorotipos pneumocócicos varia consideravelmente conforme área geográfica, a cobertura vacinal, conseqüentemente, também varia. Enquanto nos EUA a cobertura proporcionada pela vacina pneumocócica conjugada heptavalente é de mais de 80% contra doença invasiva, na Alemanha, por exemplo, é de somente 52%. Na Escócia, essa cobertura vacinal é um pouco maior. Na Finlândia, os sorogrupos pneumocócicos mais prevalentes são 14, 6 e 19, resultando numa cobertura vacinal para aquela população de cerca de 54%. No Brasil, segundo os últimos estudos de soroprevalência, a cobertura da vacina conjugada heptavalente parece vir aumentando devido a um aumento considerável na soroprevalência do sorotipo 14, chegando a 69.6% em 2004 (Brandileone et al., 2006).

A vacina pneumocócica conjugada 7-valente já foi bastante estudada em crianças saudáveis menores de 2 anos quanto a suas imunogenicidade, eficácia, efeito na colonização nasofaríngea pneumocócica e segurança. Esses trabalhos mostraram que, em crianças saudáveis, a vacina é capaz de estimular a produção de títulos elevados de anticorpos IgG contra os diversos antígenos capsulares pneumocócicos e que essa resposta parece ser duradoura. Comprovou-se também que a vacina é segura (o evento adverso mais freqüentemente relatado é a reação local) e que é capaz de diminuir a colonização da nasofaringe, isto é, produz imunidade de mucosa (Anderson et al., 1996; Rennels et al., 1998;

Shinefield et al., 1999; Froom et al., 1990; Black et al., 2000; Kries et al., 2000; Shinefield et al., 2000; Black et al., 2001; Overturf et al., 2002; Whitney et al., 2002). Na Califórnia, Black et al., no “Kaiser Permanente Vaccine Study Center” (KPSC), objetivando estudar a eficácia da vacina em 37.868 crianças saudáveis de 23 centros na Califórnia, encontraram uma eficácia de 97,4% (95% IC, 82,7 a 99,9%) contra a doença invasiva pelos sorotipos vacinais (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F). Em relação à imunogenicidade, a vacina também demonstrou ser muito boa, com mais de 97% dos vacinados atingindo títulos de anticorpos contra os polissacárides capsulares de pelo menos 0,15 µg/mL, considerado, no estudo, como protetor contra doença invasiva, uma vez que se mostraram compatíveis com os resultados de eficácia (Black et al., 2000).

Por outro lado, ainda são escassos os dados em relação a populações com doença de base, no qual incluem-se pacientes com AIDS.

Os estudos de imunogenicidade para as vacinas pneumocócicas conjugadas em indivíduos infectados pelo HIV, particularmente crianças, iniciaram-se no final dos anos 90.

Em 1996, King et al. comparou uma vacina conjugada 5-valente com a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente então em uso, em crianças maiores de 2 anos de idade infectadas ou não pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida. Participaram do estudo 30 crianças HIV-positivas e 30 controles negativos que foram divididos em 4 grupos para receber a vacina conjugada 5-valente ou a polissacarídea 23-valente. Observou-se uma tendência a maiores títulos geométricos médios (TGM)

pós-vacinais para os sorotipos 6B, 14, 18C e 23F nos indivíduos que receberam a conjugada 5-valente, tanto nos HIV-positivos quanto nos HIV-negativos, porém, somente para os sorotipos 14 (88% contra 22% nos HIV-positivos) e 18C (87% contra 40% nos HIV-positivos) essa diferença foi estatisticamente significativa (King et al., 1996).

Considerando-se como evidência de resposta sorológica, o aumento de títulos de anticorpos IgG contra os polissacárides capsulares pneumocócicos pós sobre os pré-imunização de pelo menos quatro vezes, observou-se que, apesar de mais imunogênica que a vacina polissacarídea, esta vacina ainda desencadeava uma resposta sorológica significativamente menor em crianças HIV-positivas quando comparadas às HIV-negativas. Notou-se ainda que nem o percentual de células T CD4+, nem o número absoluto dessas células nas crianças infectadas pelo HIV tiveram relação com a resposta a ambas as vacinas (polissacarídea e conjugada) (King et al., 1996). Este foi o primeiro estudo de imunogenicidade, comparativo em crianças HIV-positivas.

No ano seguinte, novo estudo é publicado pelo mesmo autor, desta vez em crianças soropositivas menores de 2 anos de idade, faixa etária esta que, por uma imaturidade imunológica já conhecida, não responde aos antígenos polissacarídeos da vacina utilizada até então, além de ser a faixa etária com a maior incidência de doença invasiva por *S. pneumoniae* entre indivíduos imunocompetentes. Neste estudo, incluíram-se 18 crianças infectadas e menores de 2 anos de idade e um grupo controle de 33 lactentes menores de 2 anos saudáveis. Dentre o grupo de crianças

sadias, 17 delas receberam a vacina conjugada 5-valente e 18 delas receberam placebo. Houve diferença significativa entre os títulos geométricos médios (TGM) pós-imunização do grupo que recebeu a vacina em relação ao grupo que recebeu placebo. Para cada criança HIV-positiva recrutada, 2 controles com idade, raça e sexo compatíveis foram recrutados. O critério de resposta com anticorpos à vacina considerado foi o de títulos maiores ou iguais a 1.0 µg/mL. As proporções de títulos de anticorpos iguais ou maiores que 1.0 µg/mL aumentaram após cada uma das três doses aplicadas da vacina, tanto nas crianças HIV-positivas quanto nas HIV-negativas. Após a terceira dose da vacina, 78% das crianças HIV-positivas apresentavam títulos maiores ou iguais a 1.0 µg/mL, enquanto 88% das HIV-negativas apresentavam títulos maiores ou iguais a 1 µg/mL. Observou-se significativa resposta humoral nas crianças HIV-positivas (King et al., 1997).

Apesar do pequeno número de indivíduos envolvidos no estudo, já era sugerida uma resposta sorológica mais promissora que a da vacina polissacarídea nesses grupos específicos (King et al., 1997).

A vacina pneumocócica conjugada 7-valente foi pela primeira vez estudada em lactentes infectados pelo HIV em estudo publicado no *Pediatrics* por Nachman et al. Neste estudo, foram avaliadas a segurança e a imunogenicidade da vacina pneumocócica conjugada heptavalente atualmente licenciada nos EUA e em outros países do mundo, incluindo o Brasil, em população pediátrica com infecção presumida pelo HIV. Participaram deste estudo crianças com idade entre 56 e 180 dias de vida. Essas crianças foram randomizadas para receber a vacina conjugada 7V ou

placebo (solução salina com fosfato de alumínio). O esquema vacinal utilizado foi: 0, 8 semanas, 16 semanas e 15 meses de vida. O critério para resposta foi aumento de pelo menos 4 vezes nos títulos de anticorpos IgG pós-série primária de imunização em relação aos pré para 3 ou mais dos 7 sorotipos dosados. O que se observou foi que a vacina é bem tolerada e imunogênica neste grupo. Houve o aumento esperado em 88 a 100% dos pacientes imunizados, a depender do sorotipo e todos esses aumentos eram consistentes do ponto de vista estatístico. Deve-se ressaltar, entretanto, que pelo fato do estudo analisar lactentes, a maioria das crianças eram assintomáticas ou pouco sintomáticas para a AIDS, com apenas 3,3% delas pertencentes à categoria B (sintomática moderada, segundo classificação do “Centers for Disease Control and Prevention”, Atlanta, 1994) e nenhuma era severamente sintomática (NACHMAN, 2003). É de se esperar que numa amostra de crianças com AIDS que apresentassem maior comprometimento imunológico, a resposta de anticorpos não seria tão boa.

Tarragó et al., na Espanha, estudou a resposta à vacina heptavalente em um grupo de 56 crianças maiores de 2 anos infectadas pelo HIV, que estavam em uso de “highly active antiretroviral therapy” (HAART) e haviam recebido a polissacarídea 23-valente anteriormente, há pelo menos 1 ano. Os pacientes receberam 2 doses da vacina conjugada heptavalente com 2 meses de intervalo. Utilizou a técnica do ELISA para dosar os títulos de IgG contra os polissacárides da cápsula pneumocócica dos sorotipos 6B, 14 e 23F pré e pós-vacinação, além de realizar estudo de atividade opsonofagocítica para esses mesmos sorotipos. Observou um aumento

significativo entre os títulos de IgG pré-imunização e pós-primeira dose (aumentos maiores que 2 vezes), porém, não houve efeito “booster” após a segunda dose da vacina. Sugeriu-se que as doses “booster” teriam maior efeito sobre a qualidade do que sobre a quantidade dos anticorpos (Tarragó et al., 2003).

Em estudo na Grécia, Spoulou et al. recrutou 14 crianças com média de idade de 128 meses (20-163), infectadas pelo HIV verticalmente e que haviam recebido a vacina polissacarídea 23-valente em média 23 meses antes (18-39) e 21 crianças saudáveis de idades semelhantes não vacinadas previamente com a qualquer vacina pneumocócica polissacarídea ou história de doença invasiva pneumocócica. Dentre as crianças HIV-positivas, dez dessas pertenciam à categoria B e quatro categoria à C (CDC, 1994), sendo que a grande maioria estava recebendo HAART (11 crianças). O esquema vacinal utilizado foi 0, 1, 12 meses para o grupo de crianças com infecção pelo HIV e 1 e 12 para o grupo controle. Foram colhidas amostras para realização de sorologia antes de cada dose da vacina e 4 a 6 semanas depois e essas amostras foram submetidas a ELISA para os sorotipos 6B, 14, 19F e 23F, além de teste de avididade de IgG. Observaram, no estudo, que apesar dos títulos de anticorpos IgG para os sorotipos em questão (6B, 14, 19F e 23F) pré-imunização serem semelhantes, apenas 29% responderam à vacinação na primeira dosagem de anticorpos pós-vacinação. Nas sorologias pós-segunda dose vacinal e pré-terceira dose (“booster”) a resposta no grupo de infectados pelo HIV também foi inferior ao grupo controle, comprovando a teoria de que as crianças HIV-positivas têm uma

memória imunológica deficitária quando comparadas a crianças saudáveis da mesma faixa etária (Spoulou et al., 2005).

No mesmo ano de 2005, novo estudo realizado por Madhi et al. para avaliar a resposta quantitativa e qualitativa de anticorpos em crianças HIV-positivas foi realizado, desta vez a uma formulação 9-valente, que inclui os sorotipos 1 e 5. Trinta crianças infectadas pelo HIV participaram do estudo, recebendo a vacina 9-valente no esquema 6, 10 e 14 semanas de vida. A idade média na primeira dose vacinal foi 1.6 (+ ou – 0.3) meses. A sorologia foi colhida 21 a 42 dias depois da terceira dose da vacina e o ensaio realizado foi o ELISA para os sorotipos 6B, 19F e 23F, além de um estudo de opsonofagocitose. O critério de resposta vacinal foi o título igual ou superior a 0.35 µg/ mL, independente do sorotipo, como preconiza a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). Observou-se, no estudo, que tanto as crianças infectadas quanto o grupo controle (crianças saudáveis da mesma faixa etária) que receberam a vacina conjugada 9-valente responderam com títulos geométricos médios (TGM) de IgG mais elevados, para todos os sorotipos estudados quando comparadas ao grupo que recebeu placebo. Esta diferença foi estatisticamente significativa para os sorotipos 1 ($p=0.02$) e 18C ($p=0.02$). Quando comparados os grupos HIV-positivo e HIV-negativo houve variação na resposta, sendo que tiveram títulos sorológicos iguais ou maiores a 0.35 µg/ mL 63 a 93% das crianças HIV-positivas, variando conforme sorotipo, e 79 a 100% das crianças do grupo negativo. Para ambos os grupos, o sorotipo 6B foi o que apresentou pior resposta (Madhi et al., 2005).

Contudo, apesar dos trabalhos realizados em crianças com infecção pelo HIV mostrarem resposta sorológica, não se garante eficácia clínica nesta população.

Em lactentes e crianças saudáveis abaixo dos 2 anos de idade a vacina pneumocócica conjugada heptavalente já demonstrou ser altamente eficaz em reduzir a incidência de doença invasiva (Black et al., 2000; O'Brien et al., 2003; Klugman et al., 2003).

O estudo ideal para avaliar a eficácia clínica de uma vacina consiste em determinar a incidência de doença num grupo vacinado em relação à incidência de doença no grupo não vacinado. Esses estudos, portanto, são estudos prospectivos, que exigem tempo e uma amostra populacional de tamanho grande. Para que se torne possível avaliar a eficácia protetora de uma vacina e inclusive comparar uma vacina já conhecida, como a conjugada 7-valente já em uso com vacinas que ainda estão em fase de estudo, como as formulações 9-valente e 11-valente, faz-se necessário desenvolvimento de ensaio *in vitro* que seja suficientemente fidedigno para prever essa eficácia protetora (Concepcion et al., 2001; Jódar et al., 2003; Tarragó et al., 2005; WHO, 2005; Henckaerts et al., 2006; Siber et al., 2007).

A técnica de detecção de anticorpos opsonofagocíticos é considerada, na literatura, uma técnica adequada para a medida da eficácia protetora de uma vacina contra a doença invasiva pneumocócica. Tanto a vacina pneumocócica polissacarídea quanto a conjugada induzem a tais anticorpos tipo-específicos. Uma boa maneira de avaliar a eficácia protetora

da vacina pneumocócica seria através da realização de estudos envolvendo a quantificação da opsonofagocitose induzida. Porém, tais estudos ainda são muito trabalhosos e custosos, dificultando sua realização em um número muito grande de amostras (Concepcion et al., 2001; Tarragó et al., 2005).

De outra parte, o ensaio laboratorial mais utilizado hoje para prever eficácia protetora é o ensaio imunoenzimático (ELISA). Tal ensaio mede os níveis de imunoglobulinas G (IgG) específicos para os diversos tipos de polissacarídeos capsulares. Apesar de ainda hoje haver muita discussão em torno do assunto, o ELISA parece apresentar uma adequada correlação com o estudo de opsonofagocitose, especialmente no que se refere a títulos pós-vacinais de adultos saudáveis (Concepcion et al., 2001; Wernette et al., 2003; Feikin et al., 2004; Tarragó et al., 2005; Henckaerts et al., 2006).

A técnica de ELISA utilizada até hoje foi descrita pela primeira vez por Koskela em 1987. Koskela já propôs, naquela época, a absorção inicial do polissacarídeo C do pneumococo (Pn-C) do soro utilizado, visando aumentar a especificidade do ensaio através da redução da quantidade de anticorpos polissacárides não-específicos lá presentes (Koskela et al., 1987). A técnica do ELISA com absorção do Pn-C melhorou muito a especificidade do ensaio e passou a ser amplamente utilizada desde então (Wernette et al., 2003).

Antes da utilização do ELISA, a técnica padrão para dosagem de anticorpos aos polissacárides pneumocócicos era um ensaio de ligação de antígenos marcados com radioisótopos (“radiolabeled antigen-binding assay”

ou RABA). As maiores limitações técnicas do ensaio encontravam-se na própria marcação dos antígenos, na meia vida curta desses antígenos e na ausência de padronização reconhecida para o ensaio. Em 1989, Siber escreveu sobre a necessidade do desenvolvimento de um ensaio padronizado que permitisse a comparação de resultados de diferentes pesquisadores e a avaliação de respostas sorológicas (Henckaerts et al., 2006).

Em 1996, Sorensen et al. utilizou o ELISA descrito por Koskela para dosar anticorpos IgG contra polissacárides pneumocócicos em crianças que haviam sido imunizadas com a vacina pneumocócica polissacarídea e apresentavam infecções respiratórias de repetição (Sorensen et al., 1996). Ele avaliou retrospectivamente um grupo de 56 crianças entre 2 e 18 anos através da dosagem de títulos de anticorpos pneumocócicos realizada 4 a 8 semanas após a vacinação para os sorotipos 3, 7F, 9N e 14. Somente pacientes que apresentassem níveis normais de IgG total prévios participaram do estudo. Na época, foram considerados protetores níveis acima de 200ng N/mL. Tais níveis correspondiam em microgramas (μg) por mililitro (mL) a 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os títulos de anticorpos variaram consideravelmente conforme a idade do indivíduo e o sorotipo em questão, sugerindo que a habilidade de reconhecer e desenvolver anticorpos específicos a diferentes polissacárides não amadureceria de forma uniforme e que cada sorotipo pneumocócico devia possuir seu próprio título de IgG protetor (Sorensen et al., 1996).

Em 2001, nova modificação no ELISA foi proposta por Concepcion e Frasch. Os autores correlacionaram resultados de um ensaio de opsonofagocitose com o ELISA tradicional (com absorção do Ps-C) e com um ELISA modificado com a absorção também do sorotipo 22F. O sorotipo 22F foi escolhido por apresentar quantidade significativa de epítomos comuns a anticorpos pneumocócicos não específicos. As amostras de soro estudadas foram obtidas de adultos saudáveis que haviam recebido a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente e de lactentes que haviam recebido uma vacina pneumocócica conjugada tetravalente (com os sorotipos 6B, 14, 19F e 23F). Concluíram que a melhor correlação ELISA, estudo de atividade opsonofagocítica foi obtida quando a técnica do ELISA utilizou a combinação das duas absorções, Ps-C e 22F.

Os estudos de atividade opsonofagocítica demonstram a funcionalidade dos anticorpos. O mecanismo primário de proteção contra a doença invasiva pneumocócica é mediado pela presença de anticorpos opsonofagocíticos e, portanto, a medida de anticorpos opsonofagocíticos reflete, de fato, proteção. São três as técnicas para dosar atividade opsonofagocítica utilizadas nos dias de hoje: o ensaio de células viáveis (“viable cell assay”), os ensaios de citometria de fluxo e ensaios utilizando bactéria marcada por radioisótopo (“radiolabeled bacteria”). A técnica mais sensível e que melhor correlaciona-se com as concentrações de anticorpos IgG contra polissacárides da cápsula pneumocócica dosados por ELISA é o ensaio de células viáveis, uma vez que este é o único que é capaz de quantificar precisamente a morte bacteriana. A grande desvantagem do

ensaio é necessitar de grandes volumes de soro para obtenção de leucócitos polimorfonucleares frescos (Henckaerts et al., 2007).

Recentemente, um grupo de estudo da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma concentração protetora de IgG anti-cápsula polissacarídea do *S. pneumoniae* para a vacina conjugada em lactentes e crianças. Esta concentração foi a de 0.35 µg/mL, medidos no intervalo de 1 mês após a imunização primária. Esse ponto de corte foi definido com base em três estudos duplo-cego de eficácia da vacina conjugada para proteção contra doença invasiva (Black et al., 2000; Klugman et al., 2003; O'Brien et al., 2003). Em dois dos estudos de eficácia, além do ELISA, foram realizados também ensaios de atividade opsonofagocítica e, nestes estudos, foi possível correlacionar os resultados de 1:8 para títulos de anticorpos opsonofagocíticos com títulos de 0.35 µg/mL para anticorpos anti-cápsula polissacarídea no ELISA. O valor correlacionou-se à eficácia clínica para doença invasiva pneumocócica (WHO, 2005).

A importância desse tipo de correlação laboratório *versus* clínica determinada pela OMS deve-se principalmente à necessidade de se estabelecer parâmetros para descartar a inferioridade de uma nova vacina em relação à vacina que já está licenciada e já é amplamente utilizada. Deve-se destacar que esses pontos de corte não devem ser utilizados para avaliar eficácia para doenças não invasivas, como otites médias e sinusites e que algumas populações particulares podem apresentar respostas imunes variáveis (WHO, 2005).

Por outro lado, não há na literatura trabalhos que definam a correlação entre eficácia clínica e ELISA para crianças infectadas pelo HIV.

No presente trabalho buscamos observar se a resposta humoral de crianças com infecção pelo HIV à vacina conjugada heptavalente mostra consistência em diferentes situações.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a resposta humoral à vacina pneumocócica conjugada heptavalente em crianças com infecção pelo HIV.

2.2. Específicos

Correlacionar a resposta humoral à vacina conjugada heptavalente nesta população com as variáveis idade, vacinação prévia com a vacina polissacarídea 23-valente e contagem de CD4 atual (resultado dos últimos 3 meses).

3. Métodos

A população estudada foi composta por um grupo de 40 crianças com infecção pelo HIV com idade variando entre 2 e 9 anos, em seguimento em Ambulatório do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de Novembro de 2002 a Setembro de 2003. O ambulatório é específico para o seguimento de crianças expostas ou infectadas pelo HIV.

Foram critério de inclusão no estudo:

- Faixa etária: ≥ 2 anos a ≤ 10 anos;
- Infecção pelo HIV confirmada (Portaria no.59/03 do Ministério da Saúde);
- Pais ou responsáveis legais com boa vontade e capacidade de seguir com o protocolo, que leram e assinaram o consentimento informado.

Foram critérios de exclusão:

- Hipersensibilidade a qualquer componente da vacina;
- Trombocitopenia;
- História pregressa de convulsão nos últimos 12 meses;
- CD4 abaixo de 15% no momento da inclusão no estudo;
- Uso contínuo de imunoglobulina endovenosa;

- Ausência de exames (contagem de CD4 e carga viral) relativos aos 3 meses prévios à inclusão;
- Crianças que não apresentassem comprovação da infecção pelo HIV;
- Pais ou responsáveis legais sem boa vontade para seguir com o protocolo e que não assinaram o consentimento informado.

Seguindo os critérios do Ministério da Saúde, o diagnóstico de infecção pelo HIV deve ser confirmado por meio de dois resultados reagentes em duas amostras de sangue coletadas em momentos diferentes para realização de teste sorológicos de triagem para detecção de HIV-1 e HIV-2 (ELISA) e pelo menos um teste confirmatório (“Western-Blot”. Portaria no. 59/03 do Ministério da Saúde).

A participação no estudo foi oferecida a todos os pais ou responsáveis de crianças acompanhadas no ambulatório que pudessem ser incluídas nos critérios de inclusão e na ordem em que estas comparecessem às consultas de rotina. Não houve randomização.

A cada candidato ao estudo foi lido o consentimento informado, detalhando os procedimentos do estudo e esclarecendo possíveis dúvidas que viessem a surgir naquele momento.

3.1. Características da casuística

A idade média das crianças que participaram do estudo foi de 79.7 meses (mínima de 33.1 e máxima de 121.7 meses) e a mediana, 79.4. Observou-se que 80% delas apresentavam idade entre 5 e 9 anos, enquanto apenas 20% eram menores de 5 anos. A maioria delas pertencia à raça branca (62.5%) e em relação ao sexo, houve praticamente uma equivalência entre sexo feminino (52.5%) e sexo masculino (47.5%).

Em relação às categorias clínicas e imunológicas, a maioria dos pacientes pertenceu à categoria clínica B (55%), correspondente a sinais e/ou sintomas clínicos moderados, e, dentro desta, a maioria à categoria imunológica 2 (41%), isto é, moderada imunossupressão (contagem de CD4 entre 15 e 24%). Sete crianças pertenceram às categorias N e A (17.5%), assintomáticas ou com sintomas e sinais leves e onze (27.5%) crianças à categoria C. Vale lembrar que a classificação da criança mantém-se ao longo de sua vida. A criança uma vez classificada como C3, será sempre C3, mesmo que com tratamento apresente elevação de seus níveis de células CD4 e melhora clínica (CDC, 1994). À título de comparação de títulos de reposta sorológica, realizou-se divisão da amostra em 2 grupos: grupo composto pelas crianças com classificações N, A e B e grupo com crianças com classificação C.

De acordo com o CD4 no momento da vacinação, entretanto, a grande maioria destas crianças (95%) apresentava reconstituição imune, com contagens de CD4 acima ou iguais a 25%. A alta taxa de reconstituição

imune encontrada na população estudada, acredita-se dever ao fato de todas as crianças estudadas, com exceção de duas, encontrarem-se em uso de HAART.

Em relação à imunização prévia com outras vacinas pneumocócicas, quase 60% (22) das crianças haviam recebido a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente anteriormente. Estas 22 crianças comprovaram o recebimento da vacina 23-valente previamente através da apresentação da carteira de vacinação ou registro em prontuário. Três crianças não sabiam se haviam recebido a vacina 23-valente e não foi possível obter-se qualquer registro relacionado ao fato, sendo excluídas da análise estatística.

3.2. Material do estudo

A vacina utilizada no estudo, como já descrito anteriormente no texto, compreende 6 antígenos pneumocócicos polissacarídeos (4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F) e um antígeno oligossacarídeo (18C) conjugados com 20 µg da proteína CRM197. A dose recomendada é de 0,5 mL que contém 2 µg de cada antígeno, com exceção do 6B (4µg) e 0,5 mg de fosfato de alumínio adicionados como um adjuvante.

3.3. Esquema vacinal e administração

Após exames clínico e laboratorial para inclusão, as crianças foram encaminhadas à sala de vacinas do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP) para coleta da primeira

amostra de sangue para realização de sorologia pré-vacinação e administração da primeira dose da vacina pneumocócica conjugada heptavalente. A segunda dose da vacina foi administrada com intervalo mínimo de 2 meses da primeira dose. Após 1 mês da administração da segunda dose, a criança retornou para nova coleta de sangue para realização da sorologia pós-vacinação. No caso de atraso na segunda coleta, foi tolerado um intervalo de até 3 meses após a segunda dose.

As crianças entre 2 e 9 anos receberam 2 doses da vacina pneumocócica conjugada heptavalente via intra-muscular, no músculo deltóide do membro superior de sua escolha.

3.4. Sorologia

As amostras de soro obtidas antes da primeira dose e de um a três meses após a segunda dose da vacina de todas as crianças participantes foram submetidas à dosagem de IgG sérica específica contra os polissacárides de cada um dos 7 sorotipos pneumocócicos contemplados na vacina por ensaio imunoenzimático (ELISA) no Laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

A técnica utilizada foi a descrita por Koskela em 1987, em que é realizada uma única adsorção com preparado de polissacáride C (Ps-C) da cápsula pneumocócica. Não se realizou adsorção com o polissacáride 22F, o que condicionou títulos discretamente mais elevados (Concepcion et al., 2001; Henckaerts et al., 2006 e 2007; Siber et al., 2007). O nível de corte estimado para avaliar resposta sorológica foi o de 1,3 µg/mL. No conjunto, a

resposta à vacinação foi considerada satisfatória para as crianças que apresentaram títulos de anticorpos contra a cápsula do pneumococo maiores ou iguais a 1.3 µg/mL para pelo menos quatro sorotipos (> 50% dos sorotipos).

Em paralelo, foram realizadas avaliações com outros pontos de corte: aumento de quatro vezes ou mais da sorologia pós-imunização em relação à pré para quatro ou mais sorotipos, e nível de corte de 0,35 µg/mL para sorologia pós-imunização para quatro ou mais sorotipos (Sorensen et al., 1996 e 1998; WHO, 2005).

3.5. Descrição da técnica do ELISA

- Os antígenos polissacárides capsulares foram adsorvidos em placas diferentes numa concentração de 10mg/L em PBS com o auxílio de pipeta multicanal nos pocinhos das placas de poliestireno;
- As placas permaneceram em incubação a 37°C por 5 horas e a seguir sofreram 4 lavagens com auxílio de lavadoras de placas. As amostras de soros teste padrão e controles foram adsorvidas com polissacarídeo C de parede do *Streptococcus pneumoniae* (C-Ps) previamente à sua incubação nas placas;
- As amostras diluídas a 1:10 foram incubadas com 2,5 µL de C-Ps em temperatura ambiente por 30 minutos e depois por 16 horas a 4°C;

- As amostras, sempre em duplicatas foram depositadas nas placas, em diluições seriadas, a partir de uma diluição inicial 1:50 para as amostras pré-vacinação e 1:100 para as amostras pós-vacinação;
- As placas permaneceram em incubação por cerca de 2 horas;
- Após as lavagens, adicionou-se solução de anticorpo (AC) monoclonal de camundongo anti-IgG humana marcado com peroxidase diluído 1:20000. A seguir, após outro período de incubação e de lavagens, acrescentou-se o substrato, solução de citrato de fosfato 0,1M por 10 minutos;
- Em seguida interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 2,5N;
- A leitura colorimétrica foi realizada em leitor de placas de ELISA em comprimento de ondas de 492nm.

3.6. Análise estatística

Os títulos de anticorpos IgG pré e pós- imunização foram transformados em logarítmo em base 10 e reportados como títulos geométricos médios (TGM) pré e pós-imunização. As variáveis contínuas foram comparadas utilizando-se o teste t de Student pareado. As variáveis categóricas, ou seja, as proporções de resposta ($\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$ e aumento ≥ 4 vezes nos títulos pós em relação aos pré-imunização) conforme faixa etária e vacinação prévia com a vacina pneumocócica 23-valente foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher bi-caudal ou o qui-quadrado, com $p < 0.005$.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS versão 10.0.

4. Resultados

Comparando-se os títulos geométricos médios (TGM) pós-imunização com os títulos geométricos médios pré-imunização para cada um dos sorotipos pneumocócicos, observou-se que todos os TGM pós-vacinação foram mais elevados que os TGM pré-imunização independentemente do sorotipo em questão. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0.001$) para todos os sorotipos pneumocócicos estudados (Tabela 1).

Na tentativa de comparar dois grupos de crianças que poderiam responder de forma distinta à vacina, separou-se a amostra em dois grupos etários: os com idade igual a 5 anos ou mais, e os menores de 5 anos, que podem ser considerados mais imaturos do ponto de vista de resposta imune.

Com a divisão por faixas etárias, notou-se que nos menores de 5 anos, não houve aumento estatisticamente significativo entre as sorologias pós em relação às pré-imunização para os sorotipos 6B e 19F.

Para as crianças com idades iguais ou maiores que 5 anos, houve aumento estatisticamente significativo para todos os sorotipos estudados (Tabela 2). Pode-se perceber ainda que, para as crianças menores de cinco anos de idade, os valores de TGM tanto das sorologias pré quanto das pós-imunização foram em geral baixos.

De outra parte, estudamos a influência da vacinação prévia com a vacina polissacarídea 23-valente na resposta sorológica à vacina conjugada. A amostra foi dividida em dois grupos: um grupo de crianças que haviam

recebido a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente no passado e um grupo que nunca recebeu a vacina polissacarídea. Não se considerou a data em que a vacina polissacarídea 23-valente foi aplicada.

Observou-se que os TGM pós-imunização aumentaram significativamente em relação aos TGM pré-imunização para ambos os grupos (vacinados e não vacinados com a vacina polissacarídea 23-valente previamente) e não se observou diferença entre os grupos (Tabela 3).

As Tabelas 4, 5 e 6 mostram os percentuais de resposta para cada sorotipo vacinal de acordo com o critério de resposta sorológica de aumento de quatro vezes ou mais dos títulos pós- imunização em relação aos pré- imunização.

Na Tabela 4, para o critério adotado, observa-se que do total de amostras estudadas, os sorotipos 4 e 14 são os que apresentam mais elevados incrementos nos títulos de anticorpos IgG pós-imunização em relação aos pré-imunização (55 e 62.5%, respectivamente). A pior resposta fica por conta do sorotipo 19F, em que apenas 17.5% das crianças apresentaram aumento de títulos de anticorpos IgG maiores ou iguais a quatro vezes.

A Tabela 5 compara as percentagens de crianças que responderam com aumentos de títulos de anticorpos IgG pós-imunização em relação aos pré-imunização de 4 vezes ou mais por faixa etária.

Para cada um dos sorotipos estudados, não se observou diferença estatisticamente significante entre as percentagens de crianças

menores de 5 anos e as com 5 anos ou mais quando o critério adotado foi o incremento de títulos de anticorpos em pelo menos quatro vezes.

Na Tabela 6, a mesma comparação entre percentagens de crianças que responderam com aumentos de títulos de anticorpos IgG pós-imunização em relação aos pré-imunização de 4 vezes ou mais é realizada, dividindo-se a população estudada entre um grupo que havia recebido a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente previamente e um grupo que não havia recebido tal vacina. Comparando-se os dois grupos, não se observou diferença estatisticamente significativa para nenhum dos sorotipos estudados.

As Tabelas 7, 8 e 9 utilizam como critério de resposta sorológica, títulos de anticorpos IgG pós-imunização maiores ou iguais a 1.3 µg/mL. Para tal nível de corte, observa-se que para todos os sorotipos estudados, com exceção do 4, há mais de 50% de resposta sorológica e o sorotipo que apresenta maior número de crianças com títulos iguais ou maiores que 1.3 µg/mL é o sorotipo 14 (90% das crianças tiveram títulos de anticorpos IgG iguais ou maiores que 1.3 µg/mL nas sorologias pós-imunização).

A Tabela 8 compara as percentagens de crianças que responderam com títulos de anticorpos IgG pós-imunização iguais ou maiores que 1.3 µg/mL de acordo com a faixa etária. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as crianças menores de 5 anos e as com 5 anos ou mais para nenhum dos sorotipos estudados. O sorotipo 9V é o único para o qual a diferença entre faixas etárias é maior (25% para

os menores de cinco anos *versus* 65.6% para os com cinco anos ou mais), quase atingindo valor estatisticamente significativo ($p=0.053$).

Na Tabela 9, a mesma comparação entre percentagens de crianças que responderam com títulos de anticorpos IgG pós-imunização iguais ou maiores que 1.3 µg/mL é realizada, dividindo-se a população estudada entre um grupo que havia recebido a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente previamente e um grupo que não havia recebido tal vacina. Comparando-se os dois grupos, mais uma vez não se observou diferença estatisticamente significativa para nenhum dos sorotipos estudados.

Após a análise individual por sorotipo vacinal, definiu-se que a resposta sorológica satisfatória à vacina seria definida quando ocorresse resposta sorológica para pelo menos quatro dos sete sorotipos estudados.

Nos Quadros 1, 2 e 3 a seguir observa-se o número de crianças que responderam para cada um de três critérios avaliados:

- 1) sorologia pós-imunização com título igual ou maior que 1.3 µg/mL para quatro ou mais sorotipos;
- 2) aumento de títulos de sorologia pós-imunização em relação à pré-imunização de quatro ou mais vezes para quatro ou mais sorotipos; e, finalmente,
- 3) sorologia pós-imunização com título igual ou maior que 0.35 µg/mL para quatro ou mais sorotipos.

Para o primeiro critério (≥ 1.3 µg/mL), 26 (65%) crianças obtiveram resposta sorológica à vacina. Doze (30%) dessas crianças

apresentaram títulos de IgG pós-imunização de pelo menos 1.3 µg/mL para todos os 7 sorotipos analisados e presentes na vacina. Em relação à classificação clínica dessas 26 crianças, observou-se que 13 delas eram categoria B (sinais e sintomas moderados), seis eram categoria C (sinais e sintomas graves), seis eram categoria A (sinais e sintomas leves) e uma era N (assintomático) (CDC, 1994).

Por outro lado, todas as crianças apresentavam CD4 igual ou acima de 15%, independentemente da faixa etária, uma vez que este foi um dos critérios para inclusão no estudo.

Apenas duas das 40 crianças (5%) apresentavam CD4 no momento da inclusão entre 15 e 25%, impossibilitando a análise deste grupo em separado (CDC, 1994).

Ainda dentro do primeiro critério (≥ 1.3 µg/mL), em relação aos sorotipos analisados, as maiores taxas de resposta foram encontradas, em ordem decrescente, para os sorotipos 14 (90%), 19F (80%) e 18C (70%). Por sua vez, as menores taxas de resposta ficaram por conta dos sorotipos 4 (45%) e 23F (50%).

Dentre as crianças que obtiveram resposta satisfatória com títulos de IgG pós-imunização iguais ou maiores a 1.3 µg/mL para 4 ou mais dos sorotipos estudados, 17 (63%) haviam recebido a vacina polissacarídea 23-valente anteriormente, em algum momento (Quadro 1).

Para o segundo critério analisado (incremento ≥ 4 vezes nos títulos pós em relação aos pré-imunização para quatro sorotipos ou mais), obteve-se resposta sorológica para 15 (37.5%) crianças apenas (Quadro 2).

Para o terceiro critério analisado (títulos de sorologia pós-imunização ≥ 0.35 $\mu\text{g/mL}$ para quatro ou mais sorotipos analisados), a resposta é de quase a totalidade das crianças (38 crianças, 95%). Apenas duas crianças não apresentaram resposta sorológica, sendo que uma foi classificada como C2 e não havia recebido a vacina polissacarídea 23-valente previamente e a outra, classificada como B1 e havia recebido anteriormente a 23-valente (Quadro 3).

No Quadro 4 estão apresentados todos os dados colhidos das 40 crianças que participaram do estudo.

Tabela 1: Distribuição dos títulos geométricos médios dos resultados de sorologias pré e pós-vacinais de acordo com sorotipo pneumocócico, em crianças com infecção pelo HIV, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

Sorotipos	Título geométrico médio ($\mu\text{g/mL}$)		p
	Pré	Pós	
4	0.343	1.220	<0.001
6B	0.751	1.646	<0.001
9V	0.453	1.785	<0.001
14	0.935	4.525	<0.001
18C	0.509	2.045	<0.001
19F	1.513	3.097	<0.001
23F	0.517	1.482	<0.001

Tabela 2: Distribuição dos títulos geométricos médios dos resultados de sorologias pré e pós-vacinais de acordo com sorotipo pneumocócico, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com faixa etária, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

Idade	Sorotipos	Título geométrico médio ($\mu\text{g/mL}$)		P
		Pré	Pós	
>5 anos	4	0.276	0.671	0.002
	6B	0.581	0.848	<u>0.065</u>
	9V	0.287	0.794	0.001
	14	0.656	1.839	0.002
	18C	0.694	1.169	0.018
	19F	1.265	1.403	<u>0.153</u>
	23F	0.417	0.631	0.046
<5 anos	4	0.357	1.356	<0.001
	6B	0.785	1.850	<0.001
	9V	0.491	2.059	<0.001
	14	0.996	5.304	<0.001
	18C	0.482	2.257	<0.001
	19F	1.561	3.562	<0.001
	23F	0.537	1.723	<0.001

Tabela 3: Distribuição dos títulos geométricos médios dos resultados de sorologias pré e pós-vacinais de acordo com sorotipo pneumocócico, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com a vacinação prévia com a polissacarídea 23-V, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

23-v	Sorotipos	Título geométrico médio (µg/mL)		P
		Pré	Pós	
sim	4	0.310	1.349	<0.001
	6B	0.705	1.814	<0.001
	9V	0.441	1.911	<0.001
	14	0.962	4.888	<0.001
	18C	0.478	2.243	<0.001
	19F	1.378	3.144	<0.001
	23F	0.464	1.399	<0.001
não	4	0.430	1.150	<0.001
	6B	0.845	1.619	<0.001
	9V	0.480	1.603	<0.001
	14	0.861	3.784	<0.001
	18C	0.605	1.867	<0.001
	19F	1.759	3.042	<0.001
	23F	0.598	1.440	<0.001

Tabela 4: Proporções de amostras que apresentaram aumento de 4 vezes ou mais dos títulos de anticorpos pós-vacinais em relação aos pré-vacinais em crianças com infecção pelo HIV, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

Aumento de 4 x ou mais	
Sorotipos	Sorologia pós-vacinal
4	55.0 %
6B	25.0 %
9V	42.5 %
14	62.5 %
18C	42.5 %
19F	17.5 %
23F	30.0 %

Tabela 5: Proporções de amostras que apresentaram aumento de 4 vezes ou mais nos títulos pós em relação aos pré-vacinais, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com faixa etária, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

Sorotipos	Aumento de 4 x ou mais		P
	Idade (anos)	Sorologia pós-vacinal	
4	< 5a	50.0 %	1.000
	≥ 5a	43.3 %	
6B	< 5a	25.0 %	1.000
	≥ 5a	25.0 %	
9V	< 5a	25.0 %	0.428
	≥ 5a	46.9 %	
14	< 5a	50.0 %	0.444
	≥ 5a	65.6 %	
18C	< 5a	25.0 %	0.428
	≥ 5a	46.9 %	
19F	< 5a	12.5 %	1.000
	≥ 5a	18.8 %	
23F	< 5a	25.0 %	1.000
	≥ 5a	31.3 %	

Tabela 6: Proporções de amostras que apresentaram aumento de 4 vezes ou mais nos títulos pós em relação aos pré-vacinais, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com vacina 23-V, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

Sorotipos	Aumento de 4 x ou mais		p
	23-V	Sorologia pós-vacinal	
4	Sim	54.5 %	0.204
	Não	33.3 %	
6B	Sim	36.4 %	0.153
	Não	13.3 %	
9V	Sim	50.0 %	0.156
	Não	26.7 %	
14	Sim	63.6 %	0.823
	Não	60.0 %	
18C	Sim	50.0 %	0.156
	Não	26.7 %	
19F	Sim	18.2 %	1.000
	Não	13.3 %	
23F	Sim	31.8 %	0.481
	Não	20.0 %	

Tabela 7: Proporções de amostras que apresentaram títulos sorológicos pós-vacinais iguais ou maiores que 1.3 µg/mL, em crianças com infecção pelo HIV, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

≥ 1.3 µg/mL

Sorotipos	Sorologia pós-vacinal
4	45.0 %
6B	55.0 %
9V	57.5 %
14	90.0 %
18C	70.0 %
19F	80.0 %
23F	50.0 %

Tabela 8: Proporções de amostras que apresentaram títulos pós-vacinais maiores ou iguais a 1.3 µg/mL, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com faixa etária, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

≥ 1.3 µg/mL

Sorotipos	Idade (anos)	Sorologia pós-vacinal	p
4	< 5a	25.0 %	0.258
	≥ 5a	50.0 %	
6B	< 5a	37.5 %	0.430
	≥ 5a	59.0 %	
9V	< 5a	25.0 %	0.053
	≥ 5a	65.6 %	
14	< 5a	87.5 %	1.000
	≥ 5a	90.6 %	
18C	< 5a	50.0 %	0.211
	≥ 5a	75.0 %	
19F	< 5a	62.5 %	0.320
	≥ 5a	84.4 %	
23F	< 5a	25.0 %	0.235
	≥ 5a	56.3 %	

Tabela 9: Proporções de amostras que apresentaram títulos pós-vacinais maiores ou iguais a 1.3 µg/mL, em crianças com infecção pelo HIV, de acordo com vacinação com 23V, Instituto da Criança, 2002 a 2003.

Sorotipos	≥ 1.3 µg/mL		p
	23-V	Sorologia pós-vacinal	
4	Sim	77.3 %	0.295
	Não	60.0 %	
6B	Sim	59.1 %	0.729
	Não	53.3 %	
9V	Sim	68.2 %	0.191
	Não	46.7 %	
14	Sim	86.4 %	0.633
	Não	93.3 %	
18C	Sim	77.3 %	0.295
	Não	60.0 %	
19F	Sim	86.4 %	0.228
	Não	66.7 %	
23F	Sim	50.0 %	0.549
	Não	40.0 %	

Quadro 1: Características das crianças que apresentaram títulos de sorologias pós-imunização ≥ 1.3 $\mu\text{g/mL}$ para pelo menos 4 sorotipos dos 7 estudados

iniciais	idade em meses	sexo	Raça	CD4		Classif.	23-v s/n	4 PÓS	6B PÓS	9V PÓS	14 PÓS	18C PÓS	19F PÓS	23F PÓS
				abs.	%									
LCM	83,4	M	branco	1152	40	C3	sim	1,800	8,400	1,800	50,000	2,200	20,100	1,800
RCO	65,4	M	não branco	1384	38	B3	sim	1,400	0,960	25,000	12,200	1,600	3,400	0,970
TSS	88,9	F	branco	701	32	A2	não	5,300	10,500	4,800	50,000	39,000	10,100	20,200
AST	50,8	M	branco	2672	39	B2	sim	0,780	1,600	1,800	4,400	1,100	1,900	2,400
ATS	58,8	F	não branco	860	36	B3	sim	0,680	3,400	2,700	19,100	3,900	3,400	7,400
ACL	117,4	M	branco	723	30	B3	não	0,940	1,500	1,700	1,600	1,900	3,200	1,200
CRS	88,8	M	branco	621	32	C2	sim	2,200	4,100	1,400	24,800	0,910	3,200	0,700
ALD	104,6	F	não branco	1380	26	B1	ns	0,350	0,380	1,200	1,900	1,300	1,700	2,500
BCD	61,6	F	branco	736	28	B3	sim	1,000	0,780	1,400	4,200	1,600	2,100	0,640
GBF	74,6	M	branco	904	39	N2	sim	1,200	11,600	3,000	27,700	29,600	8,600	6,200
APG	106,6	F	branco	1278	35	B2	não	4,400	12,900	4,500	12,200	21,300	8,400	10,800
RFS	114,6	M	branco	484	30	A3	não	1,300	1,500	1,400	2,700	1,400	3,700	1,400
MHA	95,8	M	não branco	870	29	A1	sim	4,600	4,800	5,600	5,200	3,800	1,400	3,300
MSO	83,0	F	branco	1166	33	A1	sim	1,700	3,900	2,700	4,200	3,700	3,500	1,000
JCS	76,6	M	não branco	672	37	B1	ns	1,400	1,600	5,400	23,600	3,500	11,800	5,500
TMF	95,2	F	branco	1043	37	B1	sim	0,870	0,870	4,100	1,700	3,200	8,400	0,830
KHS	97,7	M	branco	1358	32	B1	sim	2,900	10,300	3,300	1,700	3,300	9,600	6,500
LVS	82,2	F	branco	689	27	A1	não	3,900	5,700	4,000	5,900	5,900	14,400	4,700
VRC	66,9	F	não branco	457	30	C3	não	3,300	7,300	20,000	4,900	4,700	20,800	5,200
FAC	102,0	F	não branco	1103	29	A1	sim	0,870	2,300	0,680	2,300	2,100	1,900	1,800
CJS	64,3	M	branco	1347	29	C1	sim	1,200	1,100	1,200	4,900	8,300	2,800	2,100
L-A	66,7	F	branco	1442	36	B1	não	4,200	3,300	4,900	27,700	4,400	4,500	7,300
MNA	119,3	F	branco	401	27	B2	sim	1,200	2,400	5,700	9,900	1,500	7,500	4,200
E-L	70,2	M	branco	777	21	C2	sim	3,400	1,500	3,700	27,400	8,500	12,200	8,300
APC	97,6	F	branco	1148	31	B3	sim	4,500	1,400	2,700	3,900	2,400	4,400	2,400
KVS	89,8	F	não branco	896	32	C1	sim	1,400	1,500	0,820	0,950	1,400	3,500	0,550

Legenda:

Abs: número absoluto de células CD4+ no momento da inclusão da criança no estudo

%: porcentagem de células CD4+ no momento da inclusão da criança no estudo

23-v: vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente

s/n: sim ou não (em relação à vacinação prévia com a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente)

Quadro 2: Características das crianças que apresentaram incremento de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos da sorologia pós em relação à pré-imunização para pelo menos quatro sorotipos

iniciais	idade em meses	sexo	Raça	CD4		Classif.	23V s/n	4	6B	9V	14	18C	19F	23F
				abs.	%			Pós/Pré	Pós/Pré	Pós/Pré	Pós/Pré	Pós/Pré	Pós/Pré	Pós/Pré
TSS	88,9	F	branco	701	32	A2	não	4,417	3,182	3,429	10,417	26,000	3,156	8,783
ATS	58,8	F	não branco	860	36	B3	sim	5,667	7,907	10,800	19,100	17,727	8,293	28,462
NAS	74,3	F	branco	520	35	C2	não	4,286	1,063	4,286	6,071	1,400	4,063	1,615
ALD	104,6	F	não branco	1380	26	B1	ns	11,667	1,900	9,231	5,429	6,842	1,717	12,500
LAC	39,0	M	não branco	1497	30	B1	não	4,250	4,375	5,412	6,500	1,672	0,921	2,273
GBF	74,6	M	branco	904	39	N2	sim	2,353	9,667	2,727	14,579	30,204	5,375	7,294
JPS	87,0	F	branco	488	39	B2	não	7,957	1,679	7,857	7,115	10,714	1,358	2,588
MHA	95,8	M	não branco	870	29	A1	sim	23,000	9,231	18,667	5,591	19,000	2,258	7,857
MSO	83,0	F	branco	1166	33	A1	sim	4,250	7,222	6,429	4,884	12,759	3,182	3,030
JCS	76,6	M	não branco	672	37	B1	ns	1,972	1,333	6,000	10,727	6,863	6,211	5,914
AFS	82,8	F	branco	1457	33	C3	sim	11,000	2,789	28,000	8,333	10,875	2,154	2,857
VRC	66,9	F	não branco	457	30	C3	não	16,500	20,278	111,111	11,395	26,111	32,500	26,000
FAC	102,0	F	não branco	1103	29	A1	sim	4,143	4,107	1,838	3,485	4,118	1,000	4,390
CJS	64,3	M	branco	1347	29	C1	sim	4,000	2,558	6,316	11,395	15,962	2,333	9,545
E-L	70,2	M	branco	777	21	C2	sim	24,286	5,357	18,500	21,077	50,000	22,593	36,087

Legenda:

Abs: número absoluto de células CD4+ no momento da inclusão da criança no estudo

%: porcentagem de células CD4+ no momento da inclusão da criança no estudo

23-v: vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente

s/n: sim ou não (em relação à vacinação prévia com a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente)

Quadro 3: Características das crianças que apresentaram títulos de sorologias pós-imunização > 0.35 µg/mL para pelo menos 4 sorotipos dos 7 estudados

iniciais	idade em meses	sexo	Raça	CD4		Classif.	23-v s/n	4 PÓS	6B PÓS	9V PÓS	14 PÓS	18C PÓS	19F PÓS	23F PÓS
				abs.	%									
ICF	58,1	F	não branco	961	34	B2	sim	0,720	0,680	0,690	4,500	1,400	2,100	0,700
TCL	111,1	M	não branco	713	22	C3	não	0,440	0,610	0,550	2,000	0,340	1,200	0,310
S-S	37,7	F	não branco	1411	28	B2	não	1,400	0,940	0,700	1,800	0,670	3,200	0,840
MPJ	76,3	M	branco	1058	31	C3	sim	1,200	0,610	0,830	0,700	0,470	1,300	0,390
LCM	83,4	M	branco	1152	40	C3	sim	1,800	8,400	1,800	50,000	2,200	20,100	1,800
RCO	65,4	M	não branco	1384	38	B3	sim	1,400	0,960	25,000	12,200	1,600	3,400	0,970
TSS	88,9	F	branco	701	32	A2	não	5,300	10,500	4,800	50,000	39,000	10,100	20,200
AST	50,8	M	branco	2672	39	B2	sim	0,780	1,600	1,800	4,400	1,100	1,900	2,400
ATS	58,8	F	não branco	860	36	B3	sim	0,680	3,400	2,700	19,100	3,900	3,400	7,400
ACL	117,4	M	branco	723	30	B3	não	0,940	1,500	1,700	1,600	1,900	3,200	1,200
CRS	88,8	M	branco	621	32	C2	sim	2,200	4,100	1,400	24,800	0,910	3,200	0,700
ALD	104,6	F	não branco	1380	26	B1	ns	0,350	0,380	1,200	1,900	1,300	1,700	2,500
LAC	39,0	M	não branco	1497	30	B1	não	0,510	1,400	0,920	2,600	0,970	0,820	0,500
BCD	61,6	F	branco	736	28	B3	sim	1,000	0,780	1,400	4,200	1,600	2,100	0,640
GBF	74,6	M	branco	904	39	N2	sim	1,200	11,600	3,000	27,700	29,600	8,600	6,200
PHG	60,1	M	branco	1454	31	B2	não	0,300	0,950	0,510	1,800	0,500	1,100	0,770
APG	106,6	F	branco	1278	35	B2	não	4,400	12,900	4,500	12,200	21,300	8,400	10,800
RFS	114,6	M	branco	484	30	A3	não	1,300	1,500	1,400	2,700	1,400	3,700	1,400
JPS	87,0	F	branco	488	39	B2	não	0,740	0,470	1,100	3,700	1,500	1,100	0,440
MHA	95,8	M	não branco	870	29	A1	sim	4,600	4,800	5,600	5,200	3,800	1,400	3,300
MSO	83,0	F	branco	1166	33	A1	sim	1,700	3,900	2,700	4,200	3,700	3,500	1,000
JCS	76,6	M	não branco	672	37	B1	ns	1,400	1,600	5,400	23,600	3,500	11,800	5,500
COM	121,7	M	branco	813	41	B2	ns	1,000	1,100	0,970	5,500	0,970	1,400	1,300
AFS	82,8	F	branco	1457	33	C3	sim	1,100	0,530	1,400	3,000	0,870	0,560	0,400
TMF	95,2	F	branco	1043	37	B1	sim	0,870	0,870	4,100	1,700	3,200	8,400	0,830
KHS	97,7	M	branco	1358	32	B1	sim	2,900	10,300	3,300	1,700	3,300	9,600	6,500
COS	57,4	M	não branco	115	36	B2	não	0,270	0,710	1,100	1,900	1,100	1,100	0,390
LVS	82,2	F	branco	689	27	A1	não	3,900	5,700	4,000	5,900	5,900	14,400	4,700
VRC	66,9	F	não branco	457	30	C3	não	3,300	7,300	20,000	4,900	4,700	20,800	5,200
FAC	102,0	F	não branco	1103	29	A1	sim	0,870	2,300	0,680	2,300	2,100	1,900	1,800
CJS	64,3	M	branco	1347	29	C1	sim	1,200	1,100	1,200	4,900	8,300	2,800	2,100
L-A	66,7	F	branco	1442	36	B1	não	4,200	3,300	4,900	27,700	4,400	4,500	7,300
CHG	33,1	M	não branco	1610	36	B3	sim	1,700	0,550	0,770	2,200	4,200	1,000	0,500
PSF	51,9	F	branco	1069	32	C3	não	0,930	0,760	0,900	1,100	1,700	2,400	1,000
MNA	119,3	F	branco	401	27	B2	sim	1,200	2,400	5,700	9,900	1,500	7,500	4,200
E-L	70,2	M	branco	777	21	C2	sim	3,400	1,500	3,700	27,400	8,500	12,200	8,300
APC	97,6	F	branco	1148	31	B3	sim	4,500	1,400	2,700	3,900	2,400	4,400	2,400
KVS	89,8	F	não branco	896	32	C1	sim	1,400	1,500	0,820	0,950	1,400	3,500	0,550

Legenda:

Abs: número absoluto de células CD4+ no momento da inclusão da criança no estudo

%: porcentagem de células CD4+ no momento da inclusão da criança no estudo

23-v: vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente

s/n: sim ou não (em relação à vacinação prévia com a vacina pneumocócica polissacarídea 23-valente)

Quadro 4 – Características da população estudada, ICr, 2003 a 2003.

iniciais	idade em meses	sexo	raça	CD4		Classif.	23-v s/n	4		6B		9V		14		18C		19F		23F	
				abs.	%			PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
ICF	58,1	F	não branco	961	34	B2	sim	0,180	0,720	0,480	0,680	0,390	0,690	0,750	4,500	0,320	1,400	1,300	2,100	0,370	0,700
TCL	111,1	M	não branco	713	22	C3	não	0,130	0,440	0,270	0,610	0,150	0,550	0,370	2,000	0,180	0,340	0,530	1,200	0,190	0,310
S-S	37,7	F	não branco	1411	28	B2	não	0,450	1,400	0,740	0,940	0,500	0,700	1,000	1,800	0,640	0,670	3,500	3,200	0,580	0,840
MPJ	76,3	M	branco	1058	31	C3	sim	0,300	1,200	1,000	0,610	0,820	0,830	0,830	0,700	0,480	0,470	1,400	1,300	0,370	0,390
LCM	83,4	M	branco	1152	40	C3	sim	0,590	1,800	2,800	8,400	1,500	1,800	1,100	50,000	0,900	2,200	2,400	20,100	0,510	1,800
RCO	65,4	M	não branco	1384	38	B3	sim	0,440	1,400	0,960	0,960	0,610	25,000	1,400	12,200	0,550	1,600	1,700	3,400	1,000	0,970
TSS	88,9	F	branco	701	32	A2	não	1,200	5,300	3,300	10,500	1,400	4,800	4,800	50,000	1,500	39,000	3,200	10,100	2,300	20,200
AST	50,8	M	branco	2672	39	B2	sim	0,290	0,780	0,700	1,600	0,570	1,800	1,700	4,400	0,410	1,100	1,400	1,900	0,510	2,400
ATS	58,8	F	não branco	860	36	B3	sim	0,120	0,680	0,430	3,400	0,250	2,700	1,000	19,100	0,220	3,900	0,410	3,400	0,260	7,400
ACL	117,4	M	branco	723	30	B3	não	0,940	0,940	1,800	1,500	1,500	1,700	0,650	1,600	1,300	1,900	3,800	3,200	1,400	1,200
NAS	74,3	F	branco	520	35	C2	não	0,070	0,300	0,160	0,170	0,070	0,300	0,280	1,700	0,100	0,140	0,320	1,300	0,130	0,210
CRS	88,8	M	branco	621	32	C2	sim	0,370	2,200	0,740	4,100	0,930	1,400	2,700	24,800	0,650	0,910	2,300	3,200	0,570	0,700
ALD	104,6	F	não branco	1380	26	B1	ns	0,030	0,350	0,200	0,380	0,130	1,200	0,350	1,900	0,190	1,300	0,990	1,700	0,200	2,500
LAC	39,0	M	não branco	1497	30	B1	não	0,120	0,510	0,320	1,400	0,170	0,920	0,400	2,600	0,580	0,970	0,890	0,820	0,220	0,500
BCD	61,6	F	branco	736	28	B3	sim	0,360	1,000	0,620	0,780	0,270	1,400	0,920	4,200	0,330	1,600	1,400	2,100	0,440	0,640
GBF	74,6	M	branco	904	39	N2	sim	0,510	1,200	1,200	11,600	1,100	3,000	1,900	27,700	0,980	29,600	1,600	8,600	0,850	6,200
PHG	60,1	M	branco	1454	31	B2	não	0,170	0,300	0,550	0,950	0,240	0,510	0,970	1,800	0,260	0,500	0,850	1,100	0,500	0,770
APG	106,6	F	branco	1278	35	B2	não	2,000	4,400	3,300	12,900	2,500	4,500	0,970	12,200	2,100	21,300	5,000	8,400	2,200	10,800
RFS	114,6	M	branco	484	30	A3	não	0,990	1,300	1,500	1,500	1,000	1,400	1,300	2,700	1,300	1,400	3,700	3,700	1,000	1,400
JPS	87,0	F	branco	488	39	B2	não	0,093	0,740	0,280	0,470	0,140	1,100	0,520	3,700	0,140	1,500	0,810	1,100	0,170	0,440
MHA	95,8	M	não branco	870	29	A1	sim	0,200	4,600	0,520	4,800	0,300	5,600	0,930	5,200	0,200	3,800	0,620	1,400	0,420	3,300
MSO	83,0	F	branco	1166	33	A1	sim	0,400	1,700	0,540	3,900	0,420	2,700	0,860	4,200	0,290	3,700	1,100	3,500	0,330	1,000
JCS	76,6	M	não branco	672	37	B1	ns	0,710	1,400	1,200	1,600	0,900	5,400	2,200	23,600	0,510	3,500	1,900	11,800	0,930	5,500
COM	121,7	M	branco	813	41	B2	ns	0,650	1,000	1,200	1,100	0,600	0,970	2,000	5,500	0,420	0,970	1,500	1,400	0,920	1,300
AFS	82,8	F	branco	1457	33	C3	sim	0,100	1,100	0,190	0,530	0,050	1,400	0,360	3,000	0,080	0,870	0,260	0,560	0,140	0,400
TMF	95,2	F	branco	1043	37	B1	sim	0,350	0,870	1,000	0,870	0,850	4,100	1,300	1,700	0,680	3,200	4,900	8,400	0,680	0,830
KHS	97,7	M	branco	1358	32	B1	sim	1,300	2,900	2,400	10,300	1,400	3,300	0,670	1,700	1,400	3,300	3,700	9,600	1,700	6,500
STM	75,0	F	não branco	931	30	B1	sim	0,110	0,240	0,510	0,780	0,110	0,250	0,610	0,660	0,140	0,300	0,750	0,760	0,200	0,110
COS	57,4	M	não branco	115	36	B2	não	0,240	0,270	0,500	0,710	0,280	1,100	0,670	1,900	0,430	1,100	0,790	1,100	0,380	0,390
LVS	82,2	F	branco	689	27	A1	não	3,300	3,900	4,500	5,700	4,200	4,000	5,400	5,900	4,300	5,900	15,200	14,400	4,000	4,700
VRC	66,9	F	não branco	457	30	C3	não	0,200	3,300	0,360	7,300	0,180	20,000	0,430	4,900	0,180	4,700	0,640	20,800	0,200	5,200
FAC	102,0	F	não branco	1103	29	A1	sim	0,210	0,870	0,560	2,300	0,370	0,680	0,660	2,300	0,510	2,100	1,900	1,900	0,410	1,800
CJS	64,3	M	branco	1347	29	C1	sim	0,300	1,200	0,430	1,100	0,190	1,200	0,430	4,900	0,520	8,300	1,200	2,800	0,220	2,100
L-A	66,7	F	branco	1442	36	B1	não	1,600	4,200	2,900	3,300	1,400	4,900	4,600	27,700	1,600	4,400	3,800	4,500	2,000	7,300
CHG	33,1	M	não branco	1610	36	B3	sim	0,280	1,700	0,810	0,550	0,280	0,770	1,700	2,200	3,500	4,200	0,980	1,000	0,560	0,500
PSF	51,9	F	branco	1069	32	C3	não	0,710	0,930	0,730	0,760	0,350	0,900	0,180	1,100	0,770	1,700	2,000	2,400	0,390	1,000
MNA	119,3	F	branco	401	27	B2	sim	0,350	1,200	0,850	2,400	1,000	5,700	1,400	9,900	0,730	1,500	2,400	7,500	1,300	4,200
E-L	70,2	M	branco	777	21	C2	sim	0,140	3,400	0,280	1,500	0,200	3,700	1,300	27,400	0,170	8,500	0,540	12,200	0,230	8,300
APC	97,6	F	branco	1148	31	B3	sim	0,580	4,500	0,950	1,400	0,640	2,700	0,760	3,900	0,850	2,400	2,500	4,400	0,710	2,400
KVS	89,8	F	não branco	896	32	C1	sim	0,950	1,400	0,740	1,500	0,640	0,820	0,540	0,950	1,000	1,400	3,000	3,500	0,480	0,550

5. Discussão

O objetivo do presente estudo foi descrever a resposta com anticorpos à vacina pneumocócica conjugada heptavalente em crianças infectadas pelo HIV.

Não há definição definitiva de níveis de cortes para avaliar a resposta sorológica para a vacina pneumocócica conjugada heptavalente na população com infecção pelo HIV ou com outras imunodeficiências. Os trabalhos da literatura que estudaram o assunto, para crianças normais, utilizam diferentes valores para avaliar boa resposta ou relacionar esta resposta com eficácia clínica. No presente trabalho, por falta de alternativa, nós utilizamos de conceitos e níveis de corte da literatura para crianças normais para avaliarmos as respostas nas nossas crianças com AIDS. Assim quando planejamos este trabalho os dois métodos mais em evidência para avaliação eram o da ascensão do título 4X e o título de 1,3µg/mL.

Entretanto após reuniões no Alasca, em 2002 e em Genebra em 2003, finalmente, em 2005, a Organização Mundial de Saúde publicou recomendação definindo a concentração protetora de anticorpos contra doença invasiva pneumocócica a ser utilizada para crianças saudáveis vacinadas com a vacina conjugada. A resposta sorológica à vacina na população de crianças saudáveis foi definida como títulos iguais ou maiores que 0.35 µg/mL mensurados através de ELISA, de sorologia colhida um mês após a imunização primária (WHO, 2005; Siber et al., 2007).

Para chegar a tais valores, uma meta-análise baseada em três

grandes estudos de eficácia foi realizada: o “Northern California Kaiser Permanente”, responsável pelo licenciamento da vacina nos EUA; um estudo realizado com índios nativos americanos; e um estudo realizado na África do Sul com uma vacina conjugada 9-valente, que inclui também os sorotipos 1 e 5 (Black et al., 2000; O’Brien et al., 2003; Klugman et al., 2003).

Uma única concentração protetora foi definida para todos os sorotipos vacinais ($\geq 0.35 \mu\text{g/mL}$), assumindo que as concentrações de anticorpos para os diferentes sorotipos sejam suficientemente semelhantes. Foi necessário assumir tal semelhança uma vez que, mesmo no estudo com o maior número de crianças participantes (37 868 crianças) que foi o “Kaiser Permanente”, o número de casos de doença invasiva ainda é muito pequeno por sorotipo específico, impossibilitando uma análise de “eficácia sorotipo-específica” (Siber et al., 2007). No desenvolvimento do nosso trabalho introduzimos uma análise adicional utilizando o conceito da OMS.

Na literatura, os autores de estudos de imunogenicidade com vacinas pneumocócicas conjugadas em crianças HIV-positivas também utilizaram dados de conceitos desenvolvidos para crianças normais ao definir concentração protetora.

King et al., em 96, definem como “evidência de resposta sorológica” um aumento de 4 vezes ou mais nos títulos de anticorpos pós em relação aos pré-imunização (King et al., 1996). No ano seguinte, estudando a mesma vacina 5-valente optam por definir o valor de $1,0 \mu\text{g/mL}$ como título protetor, baseando-se em trabalho de Landesman e Schiffman de 1981

(Landesman e Schiffman, 1981).

Em 2003 a vacina conjugada heptavalente é pela primeira vez estudada em lactentes com infecção presumida pelo HIV por Nachman et al. Esses autores utilizam como critério, aumento de títulos de anticorpos e definem como respondedora a criança que apresentou aumento de pelo menos quatro vezes nos títulos pós em relação aos pré-imunização para 3 ou mais dos 7 sorotipos estudados e presentes na vacina (Nachman et al., 2003).

Madhi et al., em 2005, estudando a vacina conjugada 9-valente, baseiam-se nas definições para crianças saudáveis publicadas no mesmo ano pela OMS e definem como concentração protetora o valor igual ou superior a 0.35 µg/mL (WHO, 2005; Madhi et al., 2005).

Na interpretação dos resultados do presente estudo, optou-se por definir como apresentando resposta sorológica satisfatória, a criança que apresentasse títulos de anticorpos IgG pós-imunização iguais ou maiores que 1,3 µg/mL e apresentasse aumento de quatro ou mais vezes nos títulos da sorologia pós em relação aos pré-imunização, para quatro ou mais dos sete sorotipos estudados. Esses critérios foram os definidos por Sorensen et al. em 1998, em estudo com crianças saudáveis e também utilizado por Marques no seu trabalho com a vacina 23 valente em crianças com AIDS. Naquela época, Sorensen adotou o valor 1.3 µg/mL baseado em estudo de Lawrence et al. em que concentrações de anticorpos superiores a 200 ng N/mL foram relacionados à redução da colonização de nasofaringe pelo *S. pneumoniae*, em crianças (Sorensen et al., 1998; Lawrence et al., 1983). Da

técnica do trabalho de Lawrence para a de Sorensen foi introduzida a adsorção com a polissacáride C (Ps-C) tornando o método muito mais adequado.

O ELISA utilizado neste estudo contempla a adsorção com o Ps-C, preconizado pela OMS hoje, porém não a adsorção com o sorotipo 22F. Em artigo recentemente publicado no “Vaccine”, Siber et al. demonstraram que a adsorção pelo 22F introduzida por Concepcion e Frasch, em 2001, na realidade, aumentaria muito pouco a especificidade do ensaio. Siber et al. basearam-se na meta-análise realizada pela OMS para definir o valor de 0.35 µg/mL como ponto de corte para eficácia protetora em crianças saudáveis. Re-submeteram à análise por ELISA com dupla adsorção (adsorção com o Ps-C e com o 22F) grande parte das amostras de soros das crianças que participaram de tais estudos de eficácia (“NCKP”, índios americanos e África do Sul). O valor a que chegaram foi o de 0.32 µg/mL, concluindo que o aumento na especificidade do ensaio proporcionada pela adsorção com o 22F seria, de fato, muito pequeno para justificar a adoção da técnica com dupla adsorção (Siber et al., 2007).

Em relação ao valor 0.35 µg/mL, cabe ainda salientar que essa concentração aplica-se unicamente à prevenção de doença invasiva para crianças imunocompetentes. Para crianças infectadas pelo HIV como no presente estudo não foi ainda definido um valor mas, acredita-se que populações com essas condições que comprometam o sistema imune possam necessitar de títulos de anticorpos mais elevados para tornarem-se protegidas. Além disso, a atividade funcional dos anticorpos IgG em crianças

infectadas pelo HIV é menor que a de crianças saudáveis (Rose et al., 2005; Siber et al., 2007).

Frente a essas considerações, a escolha do valor 1.3 µg/mL contempla a necessidade de títulos mais altos para as crianças com infecção pelo HIV. Por outro lado, para efeito comparativo, também houve interesse em utilizar tal valor neste trabalho, uma vez que o mesmo já havia sido utilizado anteriormente em nossa clínica, em trabalho com população muito semelhante a deste trabalho, utilizando a vacina polissacarídica 23-valente (Marques, 2000) No trabalho com a vacina polissacarídica 23-valente a resposta sorológica foi cerca de 15% enquanto que nesse nosso trabalho com a conjugada foi de 65%, aparentemente bem melhor. É de se considerar que no presente momento a OMS considera para crianças imunocompetentes o valor de 0,35 µg/mL não somente uma resposta sorologicamente adequada como com correlação com eficácia. Para as crianças HIV-positivas permanecemos com a questão em aberto.

A discussão da utilização do incremento de pelo menos 4 vezes nos títulos pós-imunização em relação aos pré-imunização é ainda mais complexa. Ao nosso ver, este seria critério ainda mais específico de resposta sorológica, uma vez que procuraria levar em consideração os níveis de anticorpos que a criança já apresentava antes de ser vacinada com a vacina conjugada. Somente 15 crianças (37,5%) apresentaram incrementos de pelo menos 4 vezes nas sorologias pós-imunização para pelo menos 4 dos sorotipos analisados, enquanto 26 (65%) delas haviam apresentado resposta ao valor 1.3 µg/mL. A presença anterior de anticorpos,

demonstrados nos resultados das sorologias pré-imunização pode ajudar a entendermos tal fato. Muitas das crianças que participaram do estudo, em decorrência de idades mais elevadas (80% tinham entre 5 e 9 anos de idade) já poderiam ter sido expostas de forma natural à diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*. Outras tantas (22 crianças ou 59.5%) haviam recebido anteriormente a vacina polissacarídea 23-valente. Esses fatores poderiam vir a interferir na resposta sorológica analisada no presente trabalho.

Bem, no que diz respeito à exposição natural ao pneumococo, acredita-se que tal evento possa funcionar como “priming” inicial no sistema imune. A cápsula polissacarídea associada às proteínas da membrana externa da bactéria podem ser reconhecidas pelas células do sistema imune como antígenos T-dependentes, promovendo resposta com geração de células de memória. Essa memória imunológica fica evidente no momento em que o indivíduo entra em contato, secundariamente, com um antígeno polissacarídeo e seu organismo responde com uma rápida e intensa produção de anticorpos (resposta anamnética). Como já comentado anteriormente, este é o tipo de resposta produzido pela vacina conjugada (Spoulou et al., 2005).

Os dados relacionados à cinética da memória imunológica em populações imunossuprimidas são escassos. Em estudo realizado por Rose et al., 33 crianças com antecedente de infecções respiratórias de repetição foram divididas em 2 grupos. O grupo A recebeu duas doses da vacina pneumocócica conjugada e um ano depois, uma dose da vacina polissacarídea 23-valente. O grupo B recebeu apenas as duas doses da

vacina polissacarídea com 1 ano de intervalo. O grupo A, que havia sido imunizado com a vacina conjugada previamente respondeu com títulos de anticorpos significativamente maiores após a exposição à vacina polissacarídea e de forma muito rápida (no sétimo dia pós-vacina conjugada a maioria já apresentava títulos de anticorpos $\geq 1.0 \mu\text{g/mL}$ para todos os sorotipos presentes na vacina heptavalente) (Rose et al., 2005).

Já a vacina polissacarídica não possui a mesma capacidade da vacina conjugada. A natureza T-independente de sua resposta imune impede que ocorra esse “priming” do sistema imune, deixando de gerar células de memória e permitindo que os níveis de anticorpos produzidos diminuam rapidamente com o passar do tempo.

No presente estudo, 59.5% das crianças haviam recebido previamente a vacina polissacarídica 23-valente. Apesar do conhecimento à cerca das questões imunológicas que envolvem este tipo de vacina, optou-se por dividir a população estudada em dois grupos de acordo com o estado vacinal anterior, na tentativa de comparar entre si esses dois grupos. Ao se comparar as percentagens de crianças que responderam com aumento de pelo menos 4 vezes nos títulos de anticorpos pós-imunização em relação aos pré-imunização, no grupo vacinado com a polissacarídica e no não-vacinado com a polissacarídica, observou-se que as percentagens de crianças que obtiveram o aumento foram maiores no grupo previamente vacinado para todos os sorotipos analisados. Porém, nenhuma dessas diferenças foi estatisticamente significativa. Aqui deve se salientar que a data em que a vacina polissacarídica havia sido realizada não foi considerada. E

o período de tempo transcorrido entre a vacinação com a polissacarídica, no passado, e a vacinação com a conjugada, atual, variou de 5.3 meses a 57.8 meses. Mesmo diante da incapacidade da vacina polissacarídea em desencadear resposta anamnética, fica evidente que uma criança vacinada há menos de 6 meses e uma vacinada há quase 5 anos devem comportar-se diferentemente, ao menos quando se considerou a resposta sorológica como incremento ≥ 4 vezes dos títulos pós em relação aos pré-vacinais.

A presença de um número reduzido de estudos com a vacina pneumocócica conjugada em crianças infectadas pelo HIV e as diferenças nas casuísticas e nos critérios de resposta sorológica de cada um deles dificultam a comparação deste estudo em relação a outros da literatura no que diz respeito à resposta sorológica específica por sorotipo vacinal. Neste estudo, para os dois critérios adotados (títulos pós-imunização $\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$ e aumento de quatro vezes ou mais nos títulos pós em relação aos pré-imunização), o sorotipo com melhor resposta sorológica foi o sorotipo 14 e os com pior resposta foram os sorotipos 6B e 23F. Na literatura, independente do critério de resposta sorológica utilizado, a boa resposta do sorotipo 14 e a má resposta do 6B estão bem definidas. Em todos os trabalhos levantados, o sorotipo 14 foi sempre o que respondeu com títulos sorológicos mais elevados após vacinação com a vacina conjugada (King et al., 1997; Nachman et al., 2003; Madhi et al., 2005). Os sorotipos 9V e 19F também parecem ser bons respondedores, enquanto os 18C e 23F parecem ser ruins.

Em relação à deterioração imune provocada pelo HIV nas crianças

que participaram do estudo, o parâmetro utilizado para avaliação foi o CD4 mensurado nos 3 meses que se antecederam à imunização. Apesar de 27.5% das crianças que participaram do estudo serem classificadas como categoria C, 95% das crianças estavam em uso de HAART e com $CD4 \geq 25\%$. Em decorrência desta reconstituição imune, muitas dessas crianças que no passado apresentaram sintomas graves, infecções oportunistas (classificadas como C), encontravam-se no momento da inclusão no estudo assintomáticas ou com sinais e sintomas leves. Por outro lado apenas 2 delas mantiveram níveis entre 15 e 25%, impossibilitando a análise do efeito desses níveis na resposta sorológica desta amostra em separado.

Considerando-se a resposta das crianças à vacina, para 4 ou mais sorotipos encontraram-se 27 (67.5%) crianças com resposta sorológica com títulos de 1.3 $\mu\text{g/mL}$ ou mais, podendo ser considerada uma resposta satisfatória para uma população com defeitos imunológicos que poderiam interferir nesta resposta.

Já para o critério de aumento de quatro vezes ou mais dos títulos pós em relação aos pré-imunização para quatro ou mais sorotipos, a resposta foi de apenas 15 (37.5%) crianças, uma resposta bem abaixo da encontrada para o critério anterior.

Diante das publicações mais recentes na literatura e principalmente diante da recente definição da OMS para concentração protetora para doença invasiva em crianças saudáveis, optou-se por complementar a análise dos dados com a avaliação da nossa população também para a concentração sorológica de 0.35 $\mu\text{g/mL}$. Neste caso obtivemos resposta de

38 (95%) das crianças que participaram do estudo. Madhi et al. foram os únicos autores a utilizar o critério da OMS para crianças com infecção pelo HIV. Os autores dosaram anticorpos para os nove sorotipos da vacina estudada e encontraram mais de 90% de resposta para 6 ou mais sorotipos, resultados muito semelhantes aos encontrados no presente estudo (Madhi et al., 2005).

Diante de resultados tão diferentes conforme critério de resposta utilizado, percebe-se que ainda são necessários mais estudos de resposta sorológica em crianças HIV-positivas para que tenhamos uma real idéia que como essas crianças comportam-se frente a essa vacina.

Apesar de, em nenhum momento, o objetivo deste estudo tenha sido avaliar eficácia protetora da vacina conjugada, e sim, avaliar a resposta sorológica à mesma, não parece ser possível separar por completo as duas coisas. Acreditamos que o ponto de corte de 0.35 µg/mL para crianças saudáveis seja baixo para avaliar a resposta das crianças HIV-positivas, mas quanto mais devemos elevar esses valores até que os resultados igualem-se? Acredita-se que a criança infectada pelo HIV, pelas próprias características de seu sistema imune, constantemente sendo atacado pelo vírus, necessite de títulos de anticorpos mais elevados para lhe proferir proteção.

Essas questões ainda encontram-se em aberto indicando a necessidade de se realizar estudos de eficácia nesta população .

.Na literatura, a grande maioria dos trabalhos de resposta sorológica nas crianças infectadas pelo HIV trabalham com grupo controle. Em nosso

meio, não foram encontrados trabalhos de resposta sorológica em crianças saudáveis, e também não foi objeto de pesquisa neste trabalho. De outra parte deve se ponderar que falta de consenso sobre quais títulos representam proteção/eficácia mesmo para as crianças normais do ponto de vista imunológico, apesar dos recentes dados da OMS. De qualquer forma, apesar muitas questões ainda encontrarem-se em aberto no que diz respeito à criança infectada pelo HIV frente à vacina pneumocócica conjugada, a vacina já demonstrou resultados bem mais promissores que os obtidos com a polissacarídea nessa população devendo ser recomendada a prática da vacinação rotineiramente

6. Conclusões

A resposta à vacina polissacarídea conjugada heptavalente em nosso estudo foi considerada satisfatória pelo critério de títulos de anticorpos pós-imunização iguais ou maiores que 1.3 µg/mL.

Quando se considerou o incremento ≥ 4 vezes de títulos de anticorpos pós em relação aos pré-imunização a resposta foi pobre, nos parecendo não ser uma boa forma de avaliar a resposta pelas diferentes possibilidades de uma condição de características dos títulos pré existentes.

Considerando o corte para indicar boa resposta e eficácia da vacina em 0,35 µg/mL, a resposta foi muito boa, com 95% dos títulos superando os níveis de corte.

O sorotipo 14 é o que responde com os os maiores títulos de anticorpos após a vacinação com a vacina conjugada heptavalente, enquanto que o 6B é o com menores títulos.

Os dados deste trabalho sugerem que a idade parece interferir na reposta à vacina conjugada heptavalente, porém, devido ao tamanho pequeno da amostra, não foi possível concluir a real importância desta interferência.

A vacina polissacarídea não interferiu na resposta à vacina conjugada, provavelmente devido à própria característica da resposta imune a essa vacina, que não confere memória imunológica.

7. Referências bibliográficas

Ada G. Advances in Immunology: vaccines and vaccination. *N Engl J Med.* 2001; 345:1042-53.

Anderson EL, Donald JK, Geldmacher KM, Donnelly J, Mendelman P. Immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants. *J Pediatr.* 1996; 128: 649-53.

Andiman WA, Mezger J, Shapiro E. Invasive bacterial infections in children born to women infected with human immunodeficiency virus type-1. *J Pediatr.* 1994; 10:846-52.

Appelbaum PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: implications for drug selection. *Clin Infect Dis.* 34: 1613-20.

Bedran MBM, Camargos PAM, Leocadio Filho G, Bedran RM, Najar HC. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9:390-97.

Berezin EN, Carvalho E, Casagrande S, Brandileone MC, Mimiça IM, Farhat CK. *Streptococcus pneumoniae* penicillin-nonsusceptible strains in invasive infections in São Paulo, Brazil. *Pediatr. Infect Dis J.* 1996;15:1051-3.

Bernstein LJ, Krieger BZ, Novick B, Sicklick MJ, Rubinstein A. Bacterial

infection in the acquired immunodeficiency syndrome of children. *Pediatr Infect Dis J.* 1985; 4: 472-75.

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 and the Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19: 187-95.

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; 20:105-7.

Boagaert D, Groot R, Hermans WH. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 144-54.

Brandileone MCC, Andrade ALSS, Di Fabio JL, Guerra MLS, Austrian R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potencial impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis.* 2003; 187: 1206-12.

Brandileone MCC, Vieira VSD, Casagrande ST, Zanella RC, Guerra MLLS,

Brandão AP. Characteristics of isolates *Streptococcus pneumoniae* from middle aged and elderly adults in Brazil: capsular serotypes and antimicrobial sensitivity with invasive infections. *Braz J Infect Dis*. 1998; 2:90-6.

Brandileone MCC, Vieira VSD, Zanella RC, Landgraf IM, Melles CEA, Taunay AE, Moraes JC, Austrian R. Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumonia* isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater São Paulo area, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2789-91.

Brandileone MCC, Casagrande ST, Guerra MLLS, Zanella RC, Andrade ALSS, Di Fabio JL. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 567-74.

Cardoso VC, Cervi MC, Cintra OAL, Salathiel ASM, Gomes ACLF. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr Rio de Janeiro*. 2006; 82:51-7.

Carvalho TRMP, Brandileone MCC, Za. *Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)*, Ano 2, Número 17, Maio, 2005.

Centers for disease control and prevention. 1994 revised_classification

system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 43(RR-12), p.1-9, 1994.

Chávez-Bueno S, McCracken G.H.Jr. Bacterial meningitis in children. *Pediatr Clin N Am.* 2005; 52: 795-810.

Concepcion NF, Frasch CE. Pneumococcal type 22F polysaccharide absorption improves the specificity of a pneumococcal-polysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 266-72.

Di Fabio JL, Castañeda E, Agudelo CI, Hoz F, Hortal M, Camou T, Echaniz-Aviles G, Barajas GNC, Heitmann I, Hormazabal JC, Brandileone MCC, Vieira VSD, Regueira M, Ruvinski R, Corso A, Lovgren M, Talbot JA, Quadros C. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20: 959-67.

Doern GV, Pfaller MA, Kugler R, Freeman J, Jones RN. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Infect Dis.* 1998; 27: 764-770.

Douglas RM, Paton JC, Duncan SJ, Hansman DJ. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis.* 1983; 148: 131.

Eskola J. Immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19:388-93.

Eskola J, Anttila M. Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18:543-51.

Eskola J, Black S, Shinefield H. Chapter 23: Pneumococcal conjugate vaccines. In: *Plotkin: vaccines.* 4 Ed. Elsevier; 2004.

Farley JJ, King JCJ, Nair P, Hines SE, Tressler RL, Vink PE. Invasive pneumococcal disease among infected and uninfected children of mothers with human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr.* 1994; 124:853-8.

Feikin DR, Elie CM, Goetz MB, Lennox JL, Carlone GM, Romero-Steiner S, Holder PF, O'Brien WA, Whitney CG, Butler JC, Breiman RF. Specificity of the antibody response to the pneumococcal polysaccharide and conjugate vaccines in human immunodeficiency virus-infected adults. *Clin and Diagn Lab Immunol.* 2004; 11: 137-41.

Froom J, Culpepper L, Grob P, Bartelds A, Bowers P, Bridges-Webb C,

Grava-Gubins I, Green L, Lion J, Somaini B, Stroobant A, West R, Yodfat Y. Diagnosis and antibiotic treatment of acute otitis media: report of the Primary Care Network. *Br Med J*. 1990; 300: 582-6.

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

Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus (letter). *Lancet*. 1967; 2: 264-5.

Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5:83-93.

Henckaerts I, Goldblatt D, Ashton L, Poolman J. Critical differences between pneumococcal polysaccharide enzyme-linked immunosorbent assays with and without 22F inhibition at low antibody concentrations in pediatric sera. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13: 356-60.

Henckaerts I, Durant N, Grave DD, Schuerman L, Poolman J. Validation of a routine opsonophagocytosis assay to predict invasive pneumococcal disease efficacy of conjugate vaccine in children. *Vaccine*. 2007; 25: 2518-27.

Kertesz DA, Di Fabio JL, Brandileone MCC, Castaneda E, Echaniz-Aviles G, Heitmann I, Homma A, Hortal M, Lovgren M, Ruvinsky RO, Talbot JA, Weekes J, Spika JS and the PAHO Pneumococcal Surveillance Study

Group. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. *Clin Infect Dis*. 1998; 26: 1355-61.

King JC, Vink PE, Chang IH, Kimura A, Parks M, Smilie M, Lichenstein R, Farley JJ. Antibody titers eight months after three doses of a five-valent pneumococcal conjugate vaccine in HIV and non-HIV-infected children less than two years of age. *Vaccine*. 1996; 16: 361-65.

King JC, Vink PE, Farley JJ, Smilie M, Parks M, Lichenstein R. Safety and Immunogenicity of three doses of a five-valent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than two years with and without human immunodeficiency virus infection. *Pediatrics*. 1997; 99: 575-80.

Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A Trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med*. 2003; 1341-48.

Koskela M. Serum antibodies to pneumococcal C polysaccharide in children: response to acute pneumococcal otitis media or to vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 1987; 6: 519-26.

Krasinski K, Borkowsky W, Bonk S, Lawrence R, Chandwani S. Bacterial infections in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J*. 1988; 7:323-28.

Kries R, Siedler A, Schmitt HJ, Reinert RR. Proportion of invasive pneumococcal infections in german children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 482-7.

Jacobs MR. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med*. 2004; 117: 3S-15S.

Jódar L, Butler J, Carlone G, Dagan R, Goldblatt, D, Kayhty H, Klugman K, Plikaytis B, Siber G, Kohberger R, Chang I, Cherian T. Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. *Vaccine*. 2003; 21: 3265-72.

Landesman SH, Schiffman G. Assessment of the antibody response to pneumococccal vaccine in high risk population. *Rev Infect Dis*. 1981; 3: S184-96.

Lavall CB, Andrade ALSS, Pimenta FC, Andrade JG, Oliveira RM, Silva SA, Lima EC, Di Fabio JL, Casagrande ST, Brandileone MCC. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12: 50-5.

Lawrence EM, Edwards KM, Schiffman G, Thompson JM, Vaughan WK, Wright PF. Pneumococcal vaccine in normal children. *Am J Dis Child*. 1983;

137: 846-50.

Levine S, Dejsirilert S, Sangsuk L, Chantra S, Feikin DR, Dowell S, Olsen SJ. Serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Thailand 2002-2004. *Ped Infect Dis J*. 2006; 25: 176-78.

Levidiotou S, Vrioni G, Tzanakaki G, Pappa C, Gesouli H, Gartzonika C, Papamichail D, Kremastinou J. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in north-western Greece and implications for a vaccination programme. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 48: 179-182.

Lo W, Wang C, Yu C, Chu M. Rate of nasopharyngeal carriage, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* among children in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003; 36: 175-181.

Lucarevski BR. Colonização da orofaringe de crianças das creches municipais de Taubaté por *Streptococcus pneumoniae*. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Pediatria; 2002.

Madhi SA, Kuwanda L, Cutland C, Holm A, Kayhty H, Klugman KP. Quantitative and qualitative antibody response to pneumococcal conjugate vaccine among african human immunodeficiency virus-infected and uninfected children. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 410-6.

Madhi SA, Petersen K, Madhi A, Wasas A, Klugman KP. Impact of human immunodeficiency virus type 1 on the disease spectrum of *Streptococcus pneumoniae* in south african children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19:1141-7.

Malfoot A, Verhaegen J, Dubru JM, Kerschaver EV, Leyman S. A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 797-803.

Mandell, Benett and Dolin: Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed., Copyright 2005, Churchill Livingstone.

Mao C, Harper M, Mcintosh K, Reddington C, Cohen J, Bachur R, Caldwell B, Hsu HW. Invasive pneumococcal infections in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis*. 1996; 173: 870-6.

Marques, HHS. Avaliação qualitativa e quantitativa dos anticorpos de crianças com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Pediatria; 2000.

Melander E, Hansson H, Molstad S, Persson K, Ringberg H. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 1082-87.

Moss WJ, Clements CJ, Halsey NA. Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Bull WHO*. 2003; 81: 61-70.

Nachman S, Kim S, King J, Abrams EJ, Margolis D, Petru A, Shearer W, Smith E, Moye J, Blanchard S, Hawkins E, Bouquin P, Vink P, Benson M, Estep S, Malinoski F. Safety and immunogenicity of a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatrics*. 2003; 112: 66-73.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interpretive Standards for *Streptococcus pneumoniae*. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. 2002; 110-12.

Obaro SK, Pugatch D, Luzuriaga K. Immunogenicity and efficacy of childhood vaccines in HIV-1- infected children. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4: 510-18.

O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, Weatherholtz R, Oski J, Brown L, Kumar G, Parkinson A, Hu D, Hackell J, Chang I, Kohberger R, Siber G, Santosham M . Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomized trial. *Lancet*. 2003; 362: 355-61.

O'Dempsey TJD, McArdle TF, Lloyd-Evans N, Baldeh I, Laurence BE, Secka O, Greenwood BM. Pneumococcal disease among children in a rural area of

West Africa. *Pediatr Infect Dis J*. 1996; 15: 431-37.

Ortqvist A, Hedlund J, Kali M. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology, risk factors and Clinical features. *Semin Resp Crit Care Med*. 2005; 26; 563-74.

Overturf GD. American Academy of pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*. 2000; 106: 367-76.

Overturf GD. Pneumococcal vaccination of children. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2002; 13: 155-64.

Pelton SI, Dagan R, Gaines BM, Klugman KP, Laufer D, O'Brien K, Schmitt HJ. Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Vaccine*. 2003; 21: 1562-71.

Polack FP, Flayhart DC, Zahurak ML, Willoughby RE. Colonization by *Streptococcus pneumoniae* in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19: 608-12.

Quagliarello V, Shield M. Bacterial Meningitis: Pathogenesis, pathophysiology and progress. *New England J Med*. 1992; 327: 864-72.

Ramilo O, Hicks PJ, Borvack J, Gross L, Zhong D, Squires JE, Vitetta ES. T cell activation and human immunodeficiency virus replication after influenza immunization of infected children. *Pediatr Infect Dis J*. 1996; 15: 197-203.

Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP): preventing pneumococcal disease among infants and young children. *MMWR Recomm Rep*. vol.49, No.RR-9, 2000.

Rennels MB, Edwards KM, Keyserling HL, Reisinger KS, Hogerman DA, Madore DV, Chang I, Paradiso PR, Malinoski FJ, Kimura A, Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatrics*. 1998; 101: 604-11.

Rose MA, Schubert R, Strand N, Zielen S. Priming of immunological memory by pneumococcal conjugate vaccine in children unresponsive to 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12: 1216-22.

Rubin LG. Pneumococcal vaccine. *Pediatr Clin North Am*. 2000; 47: 269-85.

Rusen ID, Fraser-Roberts L, Slaney L, Ombette J, Lovgren M, Datta P, Ndinya-Achola J, Talbot JA, Nagelkerke N, Plummer FA, Embree JE. Nasopharyngeal pneumococcal colonization among Kenyan children: antibiotic resistance, strain types and association with human

immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16: 656-62.

Shinefield HR, Black S, Ray P, Chang I, Lewis N, Fireman M, Hackell J, Paradiso P, Siber G, Kohberger R, Madore DV, Malinowski FJ, Kimura A, Le C, Landaw I, Aguilar J, Hansen J. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18: 757-63.

Shinefield HR, Black S. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines in large scale field trials. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19: 294-7.

Schulman. *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases*, 5th ed., Copyright 1997. W.B.Saunders Company.

Siber GR, Priehs C, Madore DV. Standardization of antibody assays for measuring the response to pneumococcal infection and immunization. *Pediatr Infect Dis J.* 1989; 8: S84-S91.

Siber GR, Chang I, Baker S, Fernsten P, O'Brien KL, Santosham M, Klugman KP, Madhi SA, Paradiso P, Kohberger R. Estimating the protective concentration of anti-pneumococcal capsula polysaccharide antibodies. *Vaccine.* 2007; 25: 3816-26.

Sinner SW, Tunkel AR. Antimicrobial agents in the treatment of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin N Am*. 2004; 18: 581-602.

Sorensen RU, Hidalgo H, Moore C, Leiva LE. Post-immunization pneumococcal antibody titers and IgG subclasses. *Pediatr Pneumol*. 1996; 22: 167-73.

Sorensen RU, Leiva LE, Giangrosso PA, Butler B, Javier, FC, Sacerdote DM, Bradford N, Moore C. Response to a heptavalent conjugate *Streptococcus pneumoniae* vaccine in children with recurrent infections who are unresponsive to the polysaccharide vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 1998; 17: 685-91.

Spoulou VI, Tsoumas DL, Papaevangelou VG, Mostrou GI, Theodoridou MC. Immunogenicity and immunological memory induced by a 7-valent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in symptomatic HIV-1 infected children. *Vaccine*. 2005; 23: 5289-93.

Stein KE. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis*. 1992; 165: S49-S52.

Tarragó D, Casal J, Ruiz-Contreras J, Ramos JT, Rojo P, Snippe H, Jansen WTM. Assessment of antibody response elicited by a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in pediatric human immunodeficiency virus infection. *Clin*

Diagn Lab Immunol. 2005; 12: 165-70.

Temple K, Greenwood B, Inskip H, Hall A, Koskela M, Leinonen M. Antibody response to pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in African children. *Pediatr Infect Dis J.* 1991; 10: 386.

Tonnaer ELGM, Graamans K, Sanders EAM, Curfs JHAJ. Advances in understanding the pathogenesis of pneumococcal otitis media. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 546-52.

Tuomanen EI. The biology of pneumococcal infection. *Pediatr Res.* 1997; 42: 253-8.

Vives M, Garcia ME, Saenz P, Mora MLA, Mata L, Sabharwal H, Svanborg, C. Nasopharyngeal colonization in Costa Rican children during the first year of life. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16: 852-8.

Wernette CM, Frasch CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, Benjamin W, Quataert SA, Hildreth S, Sikkema DJ, Kayhty H, Jonsdottir I, Nahm MH. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10: 514-19.

Whitney, CG. The potencial of pneumococcal conjugate vaccines for children

Pediatr Infect Dis J. 2002; 21: 961-70.

WHO, (2005). Recommendations for the production and control of pneumococcal conjugate vaccines. *WHO Technical Report Series*. No. 927.