

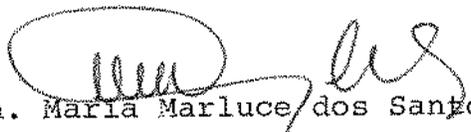
MARCOS TADEU NOLASCO DA SILVA<sup>19</sup>

**IMUNIDADE HUMORAL PARA O *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* DO TIPO B:  
TÍTULOS DE ANTICORPOS NATURAIS E ADQUIRIDOS APÓS IMUNIZAÇÃO  
COM VACINA CONJUGADA EM CRIANÇAS ENTRE 15 E 19 MESES DE  
IDADE.**

Tese apresentada ao Departamento de  
Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Mestre em Pediatria.

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA<sup>16</sup>

Este exemplar corresponde à Versão Final da  
Dissertação de Mestrado, apresentada à  
Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp,  
para a obtenção do Título de Mestre em Pedia  
tria, pelo médico MARCOS TADEU NOLASCO DA  
SILVA. Cidade Universitária "Zeferino Vaz",  
20 de junho de 1994.

  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela  
- Orientadora -

## **DEDICATÓRIA**

A SANDRA e LUCAS, que  
souberam tolerar tantas vezes  
minha ausência.

A AMARO e  
THEREZINHA, pelos anos  
de carinho e compreensão.

## **AGRADECIMENTO**

À PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. Maria Marluce dos Santos Vilela, pelo constante estímulo, pela amizade e pelo exemplo de honestidade e rigor no trabalho intelectual.

## AGRADECIMENTOS

Mesmo um projeto tão simples teria sido impossível sem a contribuição desinteressada de um grande número de pessoas, às quais agradeço:

- A meus padrinhos, Áurea e Elias, pelo apoio e estímulo em momentos decisivos;
- Às crianças participantes da pesquisa e a seus familiares, pela colaboração e compreensão;
- Ao Prof. Dr. Calil Kairallah Farhat, pioneiro na área da Infectologia Pediátrica, pelo exemplo de dedicação e seriedade;
- À Dr<sup>a</sup> Maria Ângela R. G. M. Antônio e à Enf<sup>a</sup>. Emília de Faria Carniel, ambas da equipe do Centro de Saúde de Paulínia, pela contribuição entusiasmada e criativa em várias etapas do trabalho;
- A toda a equipe médica e de enfermagem da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo entusiasmo, amizade e convivência profissional estimulante;
- Às equipes de enfermeiras das creches da UNICAMP, pelo auxílio na seleção de crianças e motivação dos familiares;
- Aos colegas pediatras que nos encaminharam pacientes, pelo auxílio na seleção de crianças e motivação dos familiares;
- Aos laboratórios Pasteur-Mérieux e Comaught, nas pessoas da Dr<sup>a</sup> Olga Chamch Mellone e do Dr. William Schaart, pelo suporte técnico e operacional;
- Ao Eng. Marinho Gomes de Andrade, pelo auxílio na análise estatística;
- Aos Drs. André Moreno Morcillo e Marcos Antônio de Paolis pelo auxílio no manejo dos recursos de informática;
- À Dr<sup>a</sup>. Ângela von Nowakonski, pelo constante estímulo e pelo auxílio na área de Microbiologia;
- À Dr<sup>a</sup>. Marilu Mendes Moscardini Rocha, do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na área de Microbiologia;
- Às equipes de enfermagem do Ambulatório de Pediatria do HC - UNICAMP e do Centro de Saúde de Paulínia, pelo dedicado e paciente auxílio operacional;

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O microorganismo .....	1
1.2. O estado de portador assintomático .....	4
1.3. Doença clínica .....	5
1.4. Epidemiologia .....	6
1.5. Fatores de risco .....	8
1.6. Aquisição natural de imunidade .....	10
1.7. A vacinação contra o <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b .....	13
1.7.1. A vacina polissacarídica .....	13
1.7.2. As vacinas conjugadas de polissacáride com proteína .....	17
2. OBJETIVOS .....	25
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	26
3.1. Planejamento experimental .....	26
3.1.1. Modelo de estudo .....	26
3.1.2. Seleção de participantes .....	26

3.1.3. Vacina .....	27
3.1.4. Protocolo clínico .....	29
3.2. Procedimento experimental .....	29
3.2.1. Número de participantes .....	29
3.2.2. Administração das vacinas .....	29
3.2.3. Monitorização clínica .....	30
3.2.4. Coleta e processamento das amostras de sangue .....	31
3.2.5. Determinação dos títulos de anticorpos anti-PRP .....	32
3.3. Análise da imunidade .....	32
3.4. Testes estatísticos .....	34
3.5. Considerações éticas .....	35
4. RESULTADOS .....	36
4.1. Características da população de estudo .....	36
4.2. Análise da segurança da vacina PRP-D .....	37
4.2.1. Reações locais .....	37
4.2.2. Reações sistêmicas .....	38
4.3. Análise da imunidade .....	39
4.3.1. Imunidade natural .....	39
4.3.2. Imunidade adquirida após vacinação com PRP-D .....	42
5. DISCUSSÃO .....	62
6. CONCLUSÕES .....	92
7. ANEXOS .....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	114

Abstract

## LISTA DE ABREVIATURAS

DPT	Vacina composta dos toxóides diftérico e tetânico e de <i>B. Pertussis</i> mortas.
E.U.A.	Estados Unidos da América
FDA	"Food and Drug Administration"
HbOC	Vacina conjugada do oligossacáride capsular do Hib com uma forma não-tóxica da toxina diftérica.
Hi	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G, subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina da classe G, subclasse 2
IgG4	Imunoglobulina da classe G, subclasse 4
IgM	Imunoglobulina da classe M
PRP	Poli-ribosil-ribitol-fosfato (polissacáride capsular do Hib)
PRP-D	Vacina conjugada do polissacáride capsular do Hib com o toxóide diftérico
PRP-OMP	Vacina conjugada do polissacáride capsular do Hib com complexo proteico de membrana externa do meningococo do grupo B.
PRP-T	Vacina conjugada do polissacáride capsular do Hib com o toxóide tetânico
T.G.M.	Titulo Geométrico Médio

## RESUMO

Foi avaliada a imunidade humoral para o *Haemophilus influenzae* do tipo **b** (**Hib**) em 68 crianças brasileiras saudáveis com idades entre 15 e 19 meses. Foram analisados os títulos naturais de anticorpos contra o polissacáride capsular do **Hib** (**PRP**), bem como os títulos estimulados por uma dose de 0,5 ml por via intramuscular da vacina conjugada do **PRP** com o toxóide diftérico (**PRP-D**, contendo 25 µg de **PRP** e 18 µg de toxóide diftérico por dose). A determinação dos títulos de anticorpos anti-**PRP** foi feita pelo método de radioimunoensaio, em amostras de soro colhidas pré-vacinação e 1 mês após. A segurança da vacina **PRP-D** na população de estudo foi avaliada através de acompanhamento de reações adversas 48 horas e 1 mês após a vacinação.

A análise dos títulos naturais demonstrou um título geométrico médio (**T.G.M**) de 0,082 µg/ml. Dez crianças (14,7%) apresentaram títulos acima de 0,15 µg/ml, considerados naturalmente protetores. Observou-se que crianças que residiam em domicílios com mais de 5 moradores apresentaram títulos acima de 0,15 µg/ml numa proporção significativamente maior (33,7% vs 10,7%,  $P = 0,05$ ).

Após a vacinação com **PRP-D**, o **T.G.M.** elevou-se a 2,92 µg/ml, com uma taxa média de aumento de 35,4 vezes. Sessenta e seis (97,1%) crianças alcançaram títulos acima de 0,15 µg/ml, e 51 (75%) títulos acima de 1 µg/ml. Três variáveis apresentaram associação com a resposta à vacina **PRP-D**:

Títulos naturais: crianças com títulos naturais acima de 0,15 µg/ml apresentaram uma proporção significativamente maior de títulos pós-vacinais acima de 1 µg/ml (100% vs 70,7%, P = 0,05).

Idade: crianças com 18 meses ou mais apresentaram uma proporção maior de títulos acima de 5 µg/ml, comparadas às de 15 meses (55% vs 19,2%, P = 0,01).

Frequência a creches: a resposta de anticorpos no grupo de crianças que freqüentava creches caracterizou-se, de forma estatisticamente significativa, por títulos médios mais baixos (T.G.M. de 1,49 µg/ml vs 4,81 µg/ml, P = 0,002), taxas de aumento de títulos mais baixas (20,77 vs 52,52, P = 0,02) e menor freqüência de crianças com títulos acima de 5 µg/ml (20,7% vs 51,32%, P = 0,01) e acima de 10 µg/ml (10,3% vs 30,8%, P = 0,05).

A vacina mostrou-se segura na população de estudo. No período de 48 horas após a vacinação, houve incidência de temperatura acima de 37,8 °C em 2 crianças (2,9%), dor no local da injeção em 3 crianças (4,4%) e irritabilidade em 8 (11,8%).

Concluimos que a imunidade natural contra infecções pelo **Hib** é baixa na população estudada, sendo ela alvo de benefício potencial com a vacinação. A vacina PRP-D demonstrou ser imunogênica e segura.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O MICROORGANISMO

O *Haemophilus influenzae* (Hi) foi isolado inicialmente por PFEIFFER, em 1892, a partir de uma cultura de escarro de um paciente com pneumonia por influenza, é denominado "bacilo da influenza de PFEIFFER". A partir da pandemia de influenza, entre 1918 e 1919, tornou-se evidente que o bacilo é parte da flora normal das vias aéreas superiores. Em 1920, WINSLOW e associados sugeriram o nome *Haemophilus influenzae*, com base em suas condições de crescimento em cultura e sua associação histórica com a influenza (WARD & COCHI, 1988 ; SHAPIRO & WARD, 1991).

O organismo é um cocobacilo gram-negativo, facultativamente anaeróbico. Para crescimento em meio de cultura, exige a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) e hemina, que são liberados no meio de cultura a partir de hemólise. Não fermenta sacarose e lactose, nem exige aumento do dióxido de carbono ambiente. As diferenças fenotípicas bioquímicas (baseadas na atividade das enzimas ornitina-descarboxilase, urease e na produção de indol) são responsáveis pela subdivisão da espécie em 8 biotipos (MENDELMAN & SMITH, 1987).

O **Hi** é encontrado na natureza apenas em associação com a espécie humana, como comensal em mucosas do trato respiratório ou como agente patogênico. Os principais fatores de virulência descritos para o **Hi** são: cápsula, proteases de IgA, fimbrias, lipopolissacáride e proteínas de membrana externa.

**Cápsula:** PITTMAN, em 1931, (apud ROBBINS & SCHNEERSON, 1987), caracterizou dois grupos, encapsulados e não-encapsulados (também chamados "não-tipáveis"). Entre os encapsulados, seis tipos de polissacáride capsular foram reconhecidos, de **a** até **f**. Os tipos **a** e **b** são compostos de um monossacarídeo (ribose, no caso do tipo **b**) ligado a um álcool (ribitol). As unidades sacarídicas são ligadas entre si por grupos diésteres de fosfato. Os tipos **c** e **f** contêm dois monossacarídeos com grupos de N-acetilglucosamina ligados por um fosfodiéster; os tipos **d** e **e** consistem de ácidos urônicos ligados por monossacárides monoacetilados sem ligações fosfodiéster. Apenas os tipos **a** e **b** têm propriedades que conferem ação invasiva.

O *Haemophilus influenzae* do tipo **b** (**Hib**) é o encontrado em 85% a 95% dos casos de infecção invasiva em crianças de países desenvolvidos (ROBBINS & SCHNEERSON, 1987; WARD & COCHI, 1988). Sua cápsula constitui-se de um polímero de ribose, ribitol e fosfato (**PRP**), com um peso molecular de 150 kD. As cepas encapsuladas resistem de maneira mais eficiente aos mecanismos de clareamento intravascular do hospedeiro, prolongando o tempo e aumentando a intensidade da bacteremia. O predomínio do tipo **b** entre os tipos capsulares causadores de infecção invasiva ainda não está completamente esclarecido, mas há evidências sugerindo que a cápsula do tipo **b** confere propriedades de virulência que são ausentes nos outros sorotipos (MOXON, 1992). A cápsula protege a bactéria da ação do complemento (ROBBINS & SCHNEERSON, 1987). Em ratos, a expressão da cápsula do tipo **b**

determina resistência à ingestão pelos macrófagos, e, quando ingeridas, tais cepas conseguem sobreviver e reproduzir-se dentro dos macrófagos (WILLIAMS et al., 1991; NOEL et al., 1992).

**Proteases de IgA:** São enzimas bacterianas cujo único substrato conhecido é a IgA1 humana. Devido à ausência de modelos experimentais, não há provas diretas de seu papel patogênico, apesar de uma série de evidências circunstanciais (KILLIAN & POULSEN, 1992). No entanto, são consideradas fatores de virulência potencialmente importantes, porque a defesa da mucosa é em grande parte mediada por IgA (MENDELMAN & SMITH, 1987).

**Fímbrias:** São filamentos na superfície celular das bactérias, compostos de subunidades proteicas idênticas arranjadas em conformação helicoidal. Sua principal função é a adesão às células das mucosas do hospedeiro, mas também estão envolvidas na resistência à fagocitose, translocação através de superfícies, aumento da capacidade de colonização e aumento da virulência (BRINTON et al., 1989). As fímbrias não são indispensáveis para a adesão aos epitélios, e sua presença pode ser desvantajosa para a invasão da mucosa. Nem todas as cepas de *Haemophilus influenzae* do tipo b têm a capacidade de expressar fímbrias. Dados recentes indicam que a fimbriação é um processo reversível, e a passagem do estado fimbriado para o não-fimbriado pode ser um evento importante na patogênese das infecções causadas pelo Hi (HAM et al., 1992).

**Lipopolissacáride (LPS):** Facilita a sobrevivência e disseminação do Hi da nasofaringe para o sangue, através de lesão no epitélio respiratório e órgãos-alvo. A heterogeneidade na estrutura do LPS entre diferentes cepas de Hi e entre bactérias de

origem comum, é devida à ativação reversível da expressão de vários epítopos. Estudos experimentais demonstraram que tais diferenças têm papel modulador na virulência do germe (MOXON, 1992).

**Proteínas de membrana externa:** A principal função da membrana externa é agir como uma barreira de permeabilidade seletiva através do envelope da célula. Várias destas proteínas já foram caracterizadas e purificadas, tendo demonstrado ser imunogênicas em animais e humanos (GRANOFF & MUNSON, 1986; COULTON et al., 1992).

## 1.2. O ESTADO DE PORTADOR ASSINTOMÁTICO

A taxa de colonização faríngea em crianças e adultos pelo **Hii** não tipável chega a 70%. Para o **Hib**, esta taxa é mais baixa. Estudos nos E.U.A. e Europa demonstraram que, em um dado momento, a frequência de crianças abaixo de 5 anos portadoras do **Hib** em naso ou orofaringe varia de 1% a 5%. A aquisição do agente aumenta de forma cumulativa com a idade, de forma que, aos 5 anos de idade, a maior parte das crianças saudáveis terá sido portadora do germe (WARD & COCHI, 1988). As taxas de colonização são bem mais altas em populações infantis fechadas, como em creches e escolas maternas, bem como contactantes domiciliares ou escolares de casos de doença, podendo alcançar até 50%. Em creches a incidência do estado de portador é mais alta entre os 18 e 71 meses, sugerindo que as crianças na idade pré-escolar sejam a principal fonte de organismos causadores de doença em lactentes (SHAPIRO & WARD, 1991). O estado de portador pode durar meses e os adultos com contato frequente com

crianças portadoras podem ser portadores assintomáticos (MURPHY et al., 1985). Estudos recentes, conduzidos na Nova Guiné e em Gâmbia, sugerem que as taxas de colonização podem ser mais altas do que em países desenvolvidos, iniciando-se a colonização em idades mais precoces (FUNKHOUSER et al., 1991).

### 1.3. DOENÇA CLÍNICA

De acordo com a patogênese, há duas categorias de doença a considerar:

**Doença invasiva:** É caracterizada pela disseminação hematogênica da bactéria a partir da nasofaringe. Esta categoria deve-se quase exclusivamente ao **Hib**. A mais comum, e mais grave, das síndromes clínicas de origem hematogênica é a meningite, seguindo-se pneumonia (com ou sem empiema), artrite séptica, celulite de face, epigloteite, pericardite, osteomielite e bacteremia oculta.

**Doença de mucosa:** A mucosa de vias respiratórias superiores apresenta alta taxa de colonização em crianças e adultos, e o **Hi** pode passar para sítios contíguos, resultando deste processo otite média, sinusite, conjuntivite e traqueobronquite.

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA

O **Hib** tem importância mundial como agente patogênico. Seu comportamento é endêmico. A maioria dos estudos sobre a incidência de infecções pelo **Hib** nos países desenvolvidos tem base populacional.

Antes do advento de vacinas eficazes, o **Hib** era o agente causal de cerca de 20.000 casos anuais de infecções invasivas nos E.U.A., com cerca de 12.000 casos de meningite. O risco de uma criança norte-americana apresentar um episódio de doença invasiva pelo **Hib** nos primeiros 5 anos de vida era de 1:200. Especificamente em relação à meningite, a mortalidade era de 5% a 10%, com uma taxa de seqüelas neurológicas em torno de 25% a 40% dos sobreviventes (SELL, 1987). Estudos epidemiológicos realizados nos E.U.A. mostraram uma variação na incidência de doença invasiva de acordo com a região, a época e a metodologia do estudo. As taxas de incidência anual variaram entre 67 e 129 casos por 100.000 crianças menores de 5 anos de idade, na população geral (WILFERT, 1990). Em populações nativas americanas, como navajos, apaches e esquimós, a incidência foi muito mais alta, chegando a 600 casos por 100.000 crianças menores de 5 anos. Na população geral, pelo menos 85% de todos os casos ocorreram em crianças menores de 5 anos, e o pico da incidência de meningite situou-se entre os 6 e 12 meses. No total, cerca de 75% dos casos ocorreram nos primeiros 2 anos de vida. Nas populações nativas, a faixa etária de maior incidência foi ainda mais baixa, com a quase totalidade dos casos ocorrendo nos primeiros 2 anos de vida, e uma proporção significativa abaixo dos 6 meses (SHAPIRO & WARD, 1991).

Em países europeus, a incidência de infecções invasivas mostrou-se bem mais baixa do que nos E.U.A. (entre 30% e 50% da incidência norte-americana), com uma

proporção comparativamente maior em idades mais avançadas. Na Finlândia, por exemplo, 55% das infecções invasivas ocorriam acima dos 18 meses de idade, e o período de risco se estendia até os 9 anos (WENGER et al., 1989).

Estudos na Austrália e Nova Zelândia mostraram, na população de origem européia, uma incidência de infecções invasivas e distribuição etária semelhantes às dos países do norte da Europa. Em aborígenes australianos, no entanto, o perfil epidemiológico mostrou-se semelhante ao das populações nativas norte-americanas (SHAPIRO & WARD, 1991).

Nos países em desenvolvimento são disponíveis poucos estudos populacionais sobre a incidência das infecções invasivas pelo **Hib**. A maioria dos dados disponíveis provém de levantamentos hospitalares, realizados de forma retrospectiva. Além disto, a taxa de isolamento de agente em infecções graves é mais baixa. O menor acesso das populações a serviços de saúde, bem como a menor eficiência dos sistemas de vigilância epidemiológica, contribuem para a dificuldade da caracterização da importância das infecções por **Hib** nestes países. Os dados disponíveis até o momento sugerem uma incidência semelhante à norte-americana, com predominância no primeiro ano de vida. A taxa de letalidade por meningite também é mais alta, ficando entre 20% e 37%. O **Hib** é a principal causa de meningite bacteriana na Índia, Gâmbia e Chile (FUNKHOUSER et al., 1991; SHAPIRO & WARD, 1991; BIJLMER & ALPHEN, 1992).

Não há no Brasil até o momento nenhum estudo populacional prospectivo sobre a incidência de infecções pelo **Hib**. Dados da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo referentes ao período de 1984 a 1989 demonstram ser o **Hi** responsável por uma incidência média anual de 7,2 casos de meningite por 100.000 crianças com menos de 5 anos. O **Hi** (sem especificação de sorotipo) foi responsável por 29,08% dos casos de meningite com agente isolado neste grupo etário. As autoras do estudo reconhecem que,

por uma série de fatores, estes dados são incompletos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 1991). No Instituto de Infectologia Emílio Ribas, de São Paulo, um levantamento realizado nos anos de 1983 e 1984 mostrou que entre os 2 meses e 5 anos o **Hi** foi o agente mais comum (45,8% dos casos) entre os causadores de meningite bacteriana (FARHAT & MANTESE, 1987). Entre 1990 e 1992, no mesmo hospital, o **Hi** causou 14% dos casos, tendo sido o meningococo responsável por 43,2% (FARHAT et al., 1993). Estes últimos resultados são certamente influenciados pela ocorrência, desde 1988, de uma epidemia de meningite pelo meningococo do sorotipo B na Grande São Paulo. No Hospital das Clínicas da FCM-UNICAMP, do início de 1990 até o final do 1º semestre de 1993, foram diagnosticados 254 casos de meningite com provável etiologia bacteriana em crianças menores de 15 anos. Em 140 casos conseguiu-se definir o agente etiológico, sendo o **Hi** responsável por 40 casos (28,5%). Destes 40 casos, 36 (90%) ocorreram em crianças menores de 5 anos, 32 (80%) abaixo dos 2 anos e 19 (47,5%) no 1º ano de vida (NÚCLEO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - HC - UNICAMP, 1993).

### 1.5. FATORES DE RISCO

Em relação à suscetibilidade individual, existe associação entre idade e incidência da infecção, sendo esta a mais importante característica epidemiológica da doença. Cerca de 90% das infecções por **Hib** ocorrem abaixo dos 5 anos, com predominância abaixo dos 2 anos, sendo o pico de incidência entre os 6 e 11 meses de idade. Nos países em que a maior incidência se concentra no 1º ano de vida (como parece

ser o padrão dos países em desenvolvimento), a meningite é a forma predominante de apresentação da doença (SHAPIRO & WARD, 1991; BIJLMER & ALPHEN, 1992).

Anormalidades da resposta imune aumentam o risco individual de infecções pelo **Hib**: imunodeficiências congênitas (agamaglobulinemia, deficiência de componentes terminais do complemento, deficiência de IgG2), síndrome de imunodeficiência adquirida, distúrbios da função esplênica (anemia falciforme, síndrome nefrótica, esplenectomia), linfoma, leucemia, tratamento com corticosteróides ou quimioterápicos antineoplásicos.

Determinados grupos étnicos apresentam risco aumentado de infecção pelo **Hib**. Nos E.U.A., as crianças negras apresentam maior risco em relação às brancas, mesmo em estudos que analisam as diferenças sócio-econômicas e culturais entre as populações. Populações nativas (apaches, navajos, esquimós, aborígenes australianos) apresentam uma incidência 4 a 20 vezes maior do que populações brancas residentes nas mesmas áreas (SHAPIRO & WARD, 1991).

Estudos caso-controle demonstram que o aleitamento materno parece ser um fator protetor em relação à aquisição de doença pelo **Hib** nos primeiros 6 meses de idade (ISTRE et al., 1985; COCHI et al., 1986).

Em relação à exposição, a aglomeração de famílias em moradias pequenas constitui um fator de risco demonstrado em estudos caso-controle nos E.U.A.. A frequência a creche aumenta o risco de aquisição de infecções pelo **Hib** de 2 a 5 vezes em relação a crianças de grupos-controles, principalmente nos 2 primeiros anos de vida. O risco em crianças que freqüentam creche aumenta em proporção direta com o número de crianças e com o tempo em que a criança permanece na instituição. A presença de irmãos no mesmo domicílio freqüentando pré-escola ou escola elementar demonstrou em alguns estudos estar associada a risco aumentado de doença por **Hib** em crianças

menores de 2 anos (ISTRE et al., 1985; COCHI et al., 1986; BROOME, 1987; SHAPIRO & WARD, 1991).

Os fatores citados acima se referem ao risco de doença primária, ou seja, doença em crianças que não tenham tido contato nos 30 dias anteriores com pessoa com infecção invasiva pelo **Hib**. Os casos que ocorrem em menos de 30 dias após um contato são considerados casos secundários. O principal fator de risco para doença secundária é o contato domiciliar com um caso. Contatos domiciliares de um caso-índice, menores de 5 anos, apresentam risco 585 vezes maior do que na população geral da mesma idade (WARD et al., 1979). Dados sobre a importância do contato em creches com um caso-índice são contraditórios, mas a maior parte dos estudos tende a considerar tal risco significativo, embora menor do que para contactantes domiciliares e restrito a crianças menores de 2 anos (PETER et al., 1991).

## 1.6. AQUISIÇÃO NATURAL DE IMUNIDADE

A aquisição de imunidade natural ao **Hib** envolve a integração dos componentes do sistema imune: o **sistema imune associado às mucosas** possui fatores que impedem a adesão e penetração do agente no epitélio respiratório; a **opsonização do Hib por anticorpo e complemento**, permite a lise da bactéria e ativação de outras respostas inflamatórias pelas vias clássica e alternativa, a fagocitose e morte intracelular por macrófagos e polimorfonucleares em tecidos subepiteliais, na circulação e em órgãos do sistema retículo-endotelial; a ação da **imunidade celular**.

Destes fatores, o mais diretamente relacionado com a eficácia protetora da vacina contra o **Hib** é o papel desempenhado pelos anticorpos específicos.

FOTHERGILL E WRIGHT, em 1933, (apud ROBBINS & SCHNEERSON, 1987), demonstraram a presença de um "poder bactericida" contra o **Hi** no sangue total de recém-nascidos, crianças e adultos. Este "poder bactericida" desaparecia por volta dos 3 meses de idade, e reaparecia em torno dos 3 anos, aumentando gradativamente seu nível até a idade adulta. A representação gráfica do "poder bactericida" e da incidência de meningite por **Hi** em relação à idade permitiu concluir que havia uma relação inversa entre o "poder bactericida" e a incidência de meningite. Foi elaborada a hipótese de que o "poder bactericida" estava presente no recém-nascido, graças à passagem transplacentária, desaparecia nos primeiros meses de vida e era gradualmente adquirido com a idade, levando a uma diminuição progressiva dos casos de meningite.

Também em 1933, PITTMAN, (apud WARD & COCHI, 1988), demonstrou que anticorpos contra a cápsula do **Hib** conferiam proteção contra infecção experimental em coelhos. Esta observação tornou-se a base da soroterapia, a primeira forma de tratamento contra infecções invasivas pelo **Hib**.

ALEXANDER et al., 1944, (apud GRANOFF & MUNSON, 1986), demonstraram, em coelhos, que os anticorpos contra o polissacáride capsular do **Hib** (**PRP**) eram os principais componentes da atividade bactericida. Estudos posteriores (SCHNEERSON et al., 1971; ANDERSON et al., 1972; GRANOFF & MUNSON, 1986) confirmaram este achado no soro de humanos. Estes autores comprovaram que os níveis dos anticorpos anti-**PRP** são altos na maioria dos recém-nascidos. Tais níveis caem entre os 3 e 6 meses, se mantêm muito baixos até os 24 a 36 meses, atingindo níveis semelhantes aos dos adultos entre 48 e 60 meses de idade.

Os anticorpos anti-polissacáride capsular do **Hib** parecem ser o fator específico mais importante na proteção contra infecções pelo organismo. Em torno dos 5 anos, a maioria das crianças já apresenta títulos altos (ROBBINS et al., 1973).

Experimentalmente, comprovou-se que anticorpos naturais anti-PRP ativam complemento, têm atividade opsono-fagocítica, bactericida e são capazes de induzir proteção passiva em animais após inoculação experimental com o agente. Preparados de imunoglobulina humana contendo anticorpos anti-PRP conferem proteção contra infecções invasivas em pacientes agamaglobulinêmicos e em crianças nativas norte-americanas de alto risco (SHAPIRO & WARD, 1991).

Anticorpos contra proteínas de membrana externa também são encontrados após infecção natural pelo Hib. Experimentalmente, anticorpos contra duas destas proteínas, P2 e P6, demonstraram ação bactericida e proteção contra inoculação experimental em coelhos. A proteína P6 tem a característica de apresentar-se de forma constante tanto nas cepas de Hi não-tipável como de Hib (NELSON et al., 1988; MURPHY et al., 1989; BARENKAMP, 1992).

Lactentes com meningite por Hib apresentam anticorpos circulantes anti-LPS na fase aguda da infecção, sugerindo que a presença de tais anticorpos não é capaz de prevenir a meningite. Tais anticorpos também não são protetores em infecções experimentais (MURPHY et al., 1989).

A imunidade ao Hib é naturalmente adquirida, nos primeiros anos de vida, pelo contato direto com o agente, através de colonização faríngea. Também o contato natural no trato respiratório ou gastrointestinal com bactérias que apresentam antígenos de reação cruzada com antígenos do Hib, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*, desempenha importante papel na gênese da imunidade natural (ROBBINS et al., 1973). Atualmente a tendência é considerar que este segundo mecanismo é o mais importante na aquisição de imunidade natural. A imunidade adquirida através de doença clínica é mais rara.

## 1.7. A VACINAÇÃO CONTRA O *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* DO TIPO b

A vacina contra o **Hib** visa estabelecer imunidade específica por volta dos 6 meses de idade (quando já ocorreu o clareamento dos anticorpos adquiridos por via transplacentária), e manter níveis protetores de anticorpos até em torno de 5 anos.]

Os critérios a serem considerados quando se avalia um antígeno bacteriano como candidato a uma vacina devem incluir: estar presente entre as cepas da espécie bacteriana que se planeja prevenir; induzir anticorpos capazes de prevenir a doença; provocar uma resposta de anticorpos protetores na população-alvo, persistente durante todo o período de maior risco; não apresentar toxicidade ou efeitos adversos potenciais (NELSON et al., 1988).

### 1.7.1. A VACINA POLISSACARÍDICA

As observações clínicas e experimentais relativas à imunidade naturalmente adquirida contra o **Hib** levaram à escolha do polissacáride capsular como o componente da primeira vacina, composta por um polímero linear de ribose, ribitol e fosfato (poliribosil-ribitol-fosfato, ou **PRP**), extraído do sobrenadante de culturas do **Hib** (WARD & COCHI, 1988).

Como a maioria das vacinas polissacarídicas, a vacina de **PRP** é composta de determinantes antigênicos que se repetem, arranjados linearmente, fazendo parte do grupo de antígenos "timo-independentes do tipo 2", caracterizados por: estimular a

síntese de anticorpos através de linfócitos B maduros, porém não gerar linfócitos B de memória, sendo portanto incapazes de promover o efeito "booster"; promover a síntese de anticorpos de baixa afinidade e avidéz; resposta restrita principalmente à classe IgM, tanto na resposta primária quanto nos contatos subseqüentes; quando produzidos anticorpos da classe IgG, predominância de IgG2, que tem baixo poder opsonizante e, na ontogenia do sistema imune, demora a atingir níveis semelhantes aos do adulto.

Considera-se que o título protetor natural mínimo de anticorpos anti-PRP seja em torno de 0,15 µg/ml. Estudos populacionais com a vacina polissacarídica mostraram que o título de 1 µg/ml obtido 3 semanas após a vacinação com PRP estaria correlacionado com proteção a longo prazo (PELTOLA et al., 1977, 1984).

Estudos com a vacina PRP mostraram ser sua imunogenicidade muito baixa em crianças menores de 18 meses. A partir desta idade, cerca de 75% das crianças vacinadas desenvolviam títulos acima de 1 µg/ml. Acima dos 24 meses, 90% das crianças alcançaram estes títulos. A persistência de títulos protetores mostrou correlação com a idade à vacinação: crianças vacinadas entre 18 e 35 meses mantiveram níveis acima de 0,15 µg/ml por um período médio de 1 ano e meio, e aquelas vacinadas com 36 meses ou mais mantiveram tais níveis por um período médio de 3 anos e meio (GRANOFF & CATES, 1985).

A vacinação com PRP em crianças demonstrou uma resposta com todas as classes de imunoglobulinas, sendo verificadas quantidades proporcionais de IgA, IgM e IgG. Em relação às subclasses de IgG, observou-se que a resposta ao PRP não foi restrita a IgG2, sendo observada uma proporção média de 1:1 entre IgG1 e IgG2. Em crianças maiores e adultos, observou-se um predomínio de IgG2 (KÄYTHY et al., 1988).

Os níveis de anticorpos após a administração da vacina PRP, bem como a sua distribuição em classes e subclasses, foram semelhantes àqueles verificados em crianças

convalescendo de infecções invasivas. Nestes grupos de crianças, a infecção natural no 1º ano de vida não induz uma resposta significativa de anticorpos. Após os 18 meses, e, principalmente após os 24 meses, há uma resposta de anticorpos com níveis protetores, sendo observadas as classes IgA, IgM e IgG, com predomínio da última. A resposta de subclasses mostrou uma distribuição proporcional de IgG1 e IgG2 (TROLLFORS et al., 1992).

Os anticorpos gerados pela vacina **PRP** em humanos demonstraram capacidade de ativação de complemento, ação opsonó-fagocítica e capacidade de reduzir taxas de bacteremia e morte em modelos animais de doença. Em relação às classes de imunoglobulinas, a IgM anti-**PRP** demonstrou efeito bactericida mais potente do que a IgG e a IgA anti-**PRP** não mostrou efeito significativo. Também não foram demonstradas diferenças significativas de atividade bactericida entre IgG1 e IgG2 anti-**PRP** (WEINBERG et al., 1986).

A eficácia da vacina **PRP** foi avaliada inicialmente através de estudos comparativos do tipo randomizado. Após sua introdução, foram empregados estudos caso-controle e análise de registros epidemiológicos.

Na Finlândia, em 1974, quase 50.000 crianças de 3 meses a 5 anos receberam uma dose de 12,7 µg da vacina de **PRP**, sendo que as menores de 18 meses receberam uma segunda dose 3 meses após. O ensaio visava principalmente à avaliação da eficácia da vacina contra o meningococo do tipo A, tendo as crianças que receberam a vacina de **PRP** servido como grupo-controle. Após um seguimento de 4 anos, a vacina de **PRP** demonstrou eficácia de 90% na prevenção de infecções por **Hib** nas crianças vacinadas com 18 meses ou mais (PELTOLA et al., 1984). Pesquisadores dos E.U.A. contestaram algumas das conclusões do estudo finlandês, estabelecendo a idade de 24 meses como aquela em que se observou uma proteção inequívoca (PARKE, 1987).

A vacina de **PRP** foi recomendada nos E.U.A. a partir de abril de 1985, em dose única de 25 µg, aos 24 meses. Nos grupos de alto risco, recomendou-se o uso aos 18 meses, com nova dose aos 24 meses. Devido à distribuição etária da infecção por **Hib** nos E.U.A., estimou-se que a vacina teria um potencial para prevenir entre 15% e 25% do total de casos (COCHI et al., 1985).

Após o licenciamento nos E.U.A., foram conduzidos 5 estudos do tipo caso-controle para avaliar a eficácia da vacina. Quatro estudos permitiram estimar uma eficácia moderada (entre 41% e 88%), enquanto um deles, no estado do Minnesota, demonstrou eficácia nula, com taxas mais altas de vacinação nos casos do que nos controles. Apesar das diferenças regionais notadas, ficou evidente que a vacina **PRP** nos Estados Unidos mostrou-se menos eficaz do que na Finlândia (WENGER et al., 1989; SHAPIRO, 1990).

A avaliação da segurança da vacina de **PRP** em 4.500 crianças nos E.U.A., demonstrou a ocorrência, no local de aplicação, de eritema em 4,8% das crianças, edema em 2,9% e dor em 12,6%, 24 horas após a administração. Temperatura acima de 38,3°C foi relatada em 2,3% dos vacinados. Em 18.000 crianças acompanhadas até um mês após a vacinação, nenhuma reação foi atribuída à vacina de **PRP** (BLACK & SHINEFIELD, 1987). Após um ano de comercialização da vacina, com o uso de 4,5 milhões de doses, apenas 152 casos de reações adversas foram relatadas à "Food and Drug Administration" (FDA), sendo a grande maioria delas reações leves. Mesmo nos 18 casos de reações consideradas graves, não se conseguiu estabelecer uma relação causal entre a vacina e a reação adversa (MILSTIEN et al., 1987).

Não obstante a baixíssima incidência de reações adversas, um fenômeno observado logo após o licenciamento da vacina de **PRP** nos E.U.A. causou grande preocupação aos pesquisadores e às autoridades de saúde pública: os relatos de casos de doença invasiva por **Hib** nas primeiras duas semanas após a vacinação. O estudo caso-

controle de Minnesota, já citado, levantou a possibilidade de que a administração da vacina pudesse aumentar o risco de doença em crianças que estivessem colonizadas em nasofaringe no momento da imunização. Postulou-se que a introdução do antígeno vacinal pudesse causar uma queda nos títulos previamente presentes de anticorpos, devido à formação de imunocomplexos. Esta possibilidade foi confirmada em um estudo experimental em ratos (SOOD et al., 1988). Em crianças e adultos imunizados, a dosagem de anticorpos anti-PRP mostrou que nos primeiros 5 dias após a vacinação, na maioria dos pacientes, ocorre uma queda dos títulos previamente presentes (SOOD & DAUM, 1990). Nenhum estudo, porém, permitiu conclusões sobre o real significado deste risco teórico, e as recomendações para a vacinação foram mantidas.

#### 1.7.2. AS VACINAS CONJUGADAS DE POLISSACÁRIDE COM PROTEÍNA

A experiência com a vacina polissacarídica demonstrou baixa imunogenicidade em faixas etárias precoces e, mesmo no grupo em que a imunização foi indicada, eficácia apenas moderada. Desta forma, o impacto sobre a incidência da doença foi inicialmente pequeno.

A aplicação de princípios definidos por LANDSTEINER, em 1924 e concretizados por AVERY & GOEBEL, em 1929, permitiu que grupos de pesquisadores liderados por SCHNEERSON, VELLA, GORDON e ANDERSON, a partir do início da década dos 80, conseguissem, separadamente, a síntese de um novo grupo de vacinas: as vacinas conjugadas de polissacáride com proteína, que superaram a baixa imunogenicidade da vacina de PRP (WENGER et al., 1989).

O princípio básico das vacinas conjugadas é a ligação de um carreador proteico, de forma covalente, ao polissacáride (no caso das vacinas anti-**Hib** o **PRP**), que passa a funcionar como hapteno. O carreador é reconhecido por macrófagos e células T devido a sua natureza proteica, conferindo ao hapteno uma resposta própria aos antígenos do tipo "Timo-dependente": reconhecidos por macrófagos, são apresentados às células do tipo "T helper"; imunogênicos em lactentes, pois o sistema T-dependente apresenta maturidade funcional neste período; resposta de anticorpos predominantemente da classe IgG; entre as subclasses de IgG, predomínio de IgG1; estímulo de clones de linfócitos B de memória, causando um "efeito booster" em novos contatos com o antígeno; síntese de anticorpos de alta avidéz, que aumenta com imunizações subseqüentes; fenômeno de "primoestimulação pelo carrier", ou seja, aumenta a resposta para o hapteno quando a vacina é administrada após imunização prévia com o carreador isolado.

São disponíveis atualmente quatro vacinas conjugadas, resultantes de modificações semi-sintéticas do antígeno natural **PRP**:

- Vacina de polissacáride capsular do **Hib** conjugado ao toxóide diftérico (vacina **PRP-D**);
- Vacina de oligossacáride capsular do **Hib** conjugado a uma forma mutante não-tóxica da toxina diftérica (vacina **HbOC**);
- Vacina de polissacáride capsular do **Hib** conjugado a um complexo proteico de membrana externa do meningococo do grupo B (vacina **PRP-OMP**);
- Vacina de polissacáride capsular do **Hib** conjugado ao toxóide tetânico (vacina **PRP-T**);

Todas estas vacinas utilizam o **PRP** como antígeno específico, porém apresentam significativas diferenças na composição química (quadro 1).

Quadro 1: Características das Vacinas Conjugadas \* :

VACINA	AÇÚCAR	CARREADOR PROTEICO	LIGANTE
<b>PRP-D</b>	POLI	TOXÓIDE DIFTÉRICO	DIHIDRAZIDA ADÍPICA
<b>HBOC</b>	OLIGO	CRM 197 §	NENHUM
<b>PRP-T</b>	POLI	TOXÓIDE TETÂNICO	DIHIDRAZIDA ADÍPICA
<b>PRP-OMP</b>	POLI	COMPLEXO DE MEMBRANA EXTERNA DO MENINGOCOCO B	BIGENÉRICO

\* Modificado de WENGER et al., 1989.

§ Forma mutante não-tóxica da toxina diftérica.

A análise comparativa dos títulos de anticorpos proporcionados pelas vacinas conjugadas é dificultada por problemas de padronização de técnicas laboratoriais e possíveis diferenças populacionais na resposta a uma determinada vacina. Há também a possibilidade de variações na imunogenicidade entre diferentes lotes de uma mesma vacina. A maioria dos trabalhos leva em consideração um parâmetro quantitativo: o título de anticorpos obtido com a vacinação, medido em microgramas por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ), através de radioimunoensaio (ANDERSON, 1978). Para as vacinas conjugadas, o título mínimo considerado potencialmente protetor é semelhante ao título protetor natural (em torno de  $0,15 \mu\text{g/ml}$ ). A maioria dos autores considera, porém, como indicador de proteção a longo prazo, um título de  $1 \mu\text{g/ml}$  obtido 3 a 4 semanas após a vacinação. Deve-se levar em conta que a magnitude do título nem sempre se correlaciona com a atividade funcional do anticorpo. Assim, amostras de soro de diferentes indivíduos com

concentrações semelhantes de anticorpos anti-**PRP** podem diferir em ensaios que meçam a atividade opsono-fagocítica do soro e a avidéz do anticorpo em ligar-se ao **PRP** (SHAPIRO, 1990).

A **PRP-D** foi a primeira vacina conjugada testada em 114.000 crianças na Finlândia, das quais 57.000 foram vacinadas aos 3, 4, 6 e 14 meses, entre 1985 e 1987. Sua eficácia, após 2 anos de seguimento, foi calculada em 90% para as 3 primeiras doses e 100% após a quarta dose. Apesar destes excelentes resultados, a imunogenicidade foi baixa em lactentes (título geométrico médio de 0,42 µg/ml após 3 doses). Postulou-se que a capacidade da vacina em induzir memória imunológica seria o fator decisivo na proteção, e o título mínimo protetor deveria ser semelhante ao naturalmente adquirido, em torno de 0,15 µg/ml. A partir de janeiro de 1988 a **PRP-D** passou a ser usada em lactentes na Finlândia e em vários países europeus (ESKOLA et al., 1987; 1990). Nos E.U.A., porém, a vacina, licenciada pela FDA em dezembro de 1987, foi adotada apenas a partir dos 18 meses e, em fevereiro de 1990, a idade-limite para a vacinação passou a ser de 15 meses.

O segundo estudo controlado com a **PRP-D** incluiu 2.000 crianças esquimós no Alaska, com doses aos 2, 4 e 6 meses, entre outubro de 1984 e janeiro de 1988. Após a terceira dose, a eficácia foi de 43%, insatisfatória para a proteção de populações de alto risco (WARD et al., 1990). Nos E.U.A., a **PRP-D** foi considerada inadequada para a imunização de lactentes devido à grande concentração de casos de doença por **Hib** no primeiro ano de vida e à heterogeneidade da população (ROBBINS & SCHNEERSON, 1990). Estudo caso-controlado realizados após sua introdução permitiram estimar sua eficácia, na faixa de 18 a 59 meses de idade, entre 74% e 88%, significativamente superior àquela observada com a vacina de **PRP** (GREENBERG et al., 1991; WENGER et al., 1991; LOUGHLIN et al., 1992). Após a administração de mais de 9 milhões de

doses da vacina **PRP-D**, apenas 40 casos de falha vacinal haviam sido relatados à FDA (SHAPIRO & WARD, 1991).

Na Califórnia, entre fevereiro de 1988 e junho de 1990, a vacina **HbOC** demonstrou excelentes resultados em relação a sua eficácia. Participaram do estudo 60.000 crianças, sendo que 21.000 delas receberam 3 doses, aos 2, 4 e 6 meses. A eficácia de três doses foi estimada em 100% (BLACK et al., 1991). Até janeiro de 1992, a análise dos registros hospitalares da população estudada permitiu concluir que a vacina reduziu em 94% a incidência da doença por **Hib** em crianças abaixo de 18 meses (BLACK & SHINEFIELD, 1992).

Um novo estudo populacional finlandês, iniciado em 1988, avaliou em cerca de 110.000 lactentes de forma comparativa a eficácia das vacinas **HbOC** e **PRP-D**. Não houve nenhum caso de falha vacinal após 3 doses da vacina **HbOC**, sendo sua eficácia considerada potencialmente superior à da vacina **PRP-D** (PELTOLA et al., 1990, apud SHAPIRO & WARD, 1991).

Devido à excelente imunogenicidade e eficácia comprovada em lactentes, a vacina **HbOC** foi licenciada pela FDA em outubro de 1990, sendo recomendada sua administração aos 2, 4, 6 e 15 meses.

Um estudo controlado com a vacina **PRP-OMP** foi realizado entre julho de 1988 e agosto de 1990 em crianças da tribo Navajo, nos E.U.A., que apresentam alto risco de infecção por **Hib** em idades precoces. Foram administradas 2 doses, aos 2 e 4 meses de idade. Após 18 meses de acompanhamento, houve apenas 1 caso de infecção no grupo vacinado, contra 22 no grupo placebo (SANTOSHAM et al., 1992). A eficácia da vacina foi estimada em 95%, e em dezembro de 1990 houve o licenciamento pela FDA, com recomendação de administração aos 2, 4 e 12 meses.

Constatando serem suas características de imunogenicidade (aquisição precoce de níveis protetores em lactentes, "efeito booster" e persistência dos títulos protetores) iguais ou superiores às das demais vacinas conjugadas, a FDA licenciou a vacina PRP-T para uso em lactentes em março de 1993, com recomendação de uso aos 2, 4, 6 e 18 meses.

Com a ampla utilização das vacinas conjugadas, alguns países europeus, como a Islândia e a Finlândia, já noticiaram a proximidade da erradicação da doença por Hib (JÓNSDÓTTIR et al., 1992; PELTOLA et al., 1992). Nos Estados Unidos, contra 20.000 casos relatados em 1990, foram relatados apenas 1.000 casos no ano de 1992, caracterizando uma redução de 95% na incidência de doenças invasivas pelo Hib (MARWICK, 1992).

Além da proteção específica às crianças vacinadas, já está comprovado que as vacinas conjugadas são capazes de reduzir de forma muito acentuada a taxa de portadores assintomáticos em nasofaringe, reduzindo assim a circulação do Hib na comunidade (BARBOUR et al., 1993; TAKALA et al., 1993).

O conjunto de dados disponíveis sobre a epidemiologia das infecções por Hib nos países em desenvolvimento, embora incompleto, nos permite inferir que o Hib está entre as principais causas de infecções bacterianas graves, em muitos países sendo a principal. A mortalidade causada pela doença é bem mais alta do que em países desenvolvidos, chegando a 40%. Algumas características já identificadas das infecções por Hi nos países em desenvolvimento devem ser ressaltadas:

**Doença respiratória:** Estudos da etiologia de pneumonia através de punção pulmonar em crianças hospitalizadas mostram que o Hi causa cerca de um terço dos casos de doença grave. A maioria dos isolados de punção pulmonar, ao contrário do que

ocorre nos países desenvolvidos, é de cepas de **Hi** não-tipável. Também foram identificadas cepas de **Hi** do tipo **a** (FUNKHOUSER et al., 1991).

**Meningite:** A identificação de sorotipos mostram ser o **Hib** um dos principais causadores de meningite nos países em desenvolvimento. Estudos na Nova Guiné, porém, demonstraram 12% dos casos serem causados por **Hi** do tipo **a** e 5% por cepas de **Hi** não-tipável (MUNSON et al., 1989).

**Faixa etária de risco:** Os estudos prospectivos sobre a incidência de infecção invasiva por **Hib** nos países em desenvolvimento mostram uma alta porcentagem de casos em lactentes jovens, com cerca de 80% dos casos no 1º ano de vida (BIJLMER & ALPHEN, 1992).

Baseados nos recentes avanços no desenvolvimento das vacinas conjugadas e nos conhecimentos sobre a doença por **Hib** nos países em desenvolvimento, MUNSON et al. (1989) e WRIGHT (1989) sugerem a realização de estudos clínicos nas seguintes áreas:

- Definição do nível materno de anticorpos anti-**PRP** e do declínio do nível nos primeiros dois anos de vida: nas regiões aonde a transferência transplacentária seja baixa, podem ser indicados estudos com a imunização de gestantes;

- Determinação da segurança e imunogenicidade das vacinas conjugadas, sempre que possível em combinação com a vacina DPT. Também devem ser avaliados os efeitos potenciais da desnutrição proteico-calórica e deficiências vitamínicas (principalmente de vitamina A) sobre a imunogenicidade da vacina.

- Estudos epidemiológicos prospectivos, com alta acurácia de diagnóstico etiológico, visando definir a incidência da doença e as faixas etárias de maior risco;

- Avaliação dos custos da vacina e sua estabilidade em áreas tropicais: os custos deverão ser comparados àqueles relacionados à prevenção de outras doenças comuns preveníveis, como sarampo, tétano, poliomielite;

- Estudos populacionais de eficácia.

Entre os países em desenvolvimento, destacam-se Chile e Gâmbia como os centros de maior atividade, tanto na caracterização epidemiológica das infecções pelo **Hib**, como pelos estudos de imunogenicidade de vacinas conjugadas em lactentes jovens, isoladas ou associadas a componentes da vacina DPT (CAMPBELL et al., 1990; FERRECIO et al., 1990, 1991).

No Brasil, ainda estão por ser definidos o comportamento desta importante endemia na população infantil e os métodos mais eficazes e seguros de prevenção.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

Analisar a imunidade humoral naturalmente adquirida para o *Haemophilus influenzae* do tipo **b** em crianças saudáveis brasileiras com idade entre 15 e 19 meses, através da determinação do título de anticorpos anti-**PRP**.

Analisar a imunogenicidade da vacina composta pelo polissacáride capsular do *Haemophilus influenzae* do tipo **b** conjugado ao toxóide diftérico (**PRP-D**), no mesmo grupo de crianças saudáveis com idade entre 15 e 19 meses, através da determinação do título de anticorpos anti-**PRP** um mês após a vacinação.

Analisar a associação entre fatores individuais, demográficos e clínicos e a imunidade natural e adquirida após a vacinação.

Analisar a segurança da vacina **PRP-D** no grupo de crianças participantes do estudo, através do registro das reações adversas nos primeiros 30 dias após a vacinação.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

##### **3.1.1. MODELO DE ESTUDO**

Estudo experimental prospectivo, longitudinal, controlado, não randomizado.

##### **3.1.2. SELEÇÃO DE PARTICIPANTES**

Participaram do estudo 80 crianças saudáveis e eutróficas, com idades entre 15 e 19 meses. As fontes de encaminhamento foram creches ligadas à UNICAMP, pediatras com clínica privada no município de Campinas (SP) e o ambulatório de pediatria do Centro de Saúde-Escola Dr. Laudo Natel, no município de Paulínia (SP). Os critérios de seleção foram os seguintes:

a) Critérios de inclusão:

- Eutrofia: no mínimo percentil 25 do gráfico do "National Committee for Health Statistics" de peso para a idade e peso para estatura (HAMILL et al., 1979);

- Consentimento esclarecido, obtido dos pais ou responsáveis das crianças aptas a participar no estudo. Tal consentimento foi obtido após entrevista do pesquisador com os responsáveis pela criança, sendo entregue um comunicado escrito a todos relatando os objetivos, procedimentos e potenciais riscos do estudo (ANEXO C).

b) Critérios de exclusão:

- Qualquer contra-indicação ao uso da vacina DPT;
- Doença prévia por Hib ou uso prévio de vacina anti-Hib;
- Suspeita de alergia a qualquer componente das vacinas PRP-D ou DPT;
- Transfusão de hemoderivados (inclusive imunoglobulinas) nos três meses anteriores ao estudo;
- Imunossupressão por droga ou doença;
- Necessidade de uso de vacina anti-pólio inativada;
- Interrupção no cumprimento de qualquer etapa do estudo.

### 3.1.3. VACINA

A vacina empregada em nosso estudo é um produto biológico conjugado, do tipo hapteno-carreador, consistindo do polissacáride capsular do Hib (PRP) ligado de

forma covalente ao toxóide diftérico através de uma molécula com seis átomos de carbono, a dihidrazida adípica.

O toxóide diftérico purificado usado como carreador é preparado de acordo com protocolos dos laboratórios CONNAUGHT, Swiftwater, PA, E.U.A.. É então modificado pela ligação a uma molécula espaçadora, a dihidrazida adípica. Um destes grupos ativos é consumido pela ligação ao toxóide e a dihidrazida adípica que não reage é removida. O toxóide derivatizado com a hidrazida adípica é então armazenado até o uso.

O polissacáride capsular do **Hib** é purificado a partir de culturas em fermentadores. O **PRP** é testado em relação a peso molecular, conteúdo proteico, ácidos nucleicos e endotoxina.

Anteriormente à combinação com o toxóide, são criados sítios reativos no polissacáride com brometo de cianogênio. Os compostos ativados **PRP** e toxóide ligado à dihidrazida adípica são então combinados numa reação a frio. O produto da reação é purificado por cromatografia em gel para remover resíduos de proteína não-reativos e contaminantes de baixo peso molecular. Adiciona-se Timerosal até uma concentração final de 1:10.000. O produto concentrado (**PRP-D**) é então filtrado através de uma membrana de Durapore® com orifícios de 0,2 micron e armazenado em baixas temperaturas.

Cada dose de 0,5 ml da vacina **PRP-D** contém 25 µg de poliribosil-ribitol-fosfato purificado e 18 µg de toxóide diftérico.

### 3.1.4. PROTOCOLO CLÍNICO

Os dados demográficos, clínicos e de monitorização das crianças participantes foram registrados em um formulário individual padronizado (ANEXO B). Foram realizadas duas cópias de cada formulário. Os originais e uma cópia foram mantidos com os pesquisadores. Uma cópia foi enviada para a sede dos Laboratórios CONNAUGHT, em Willowdale, Ontario, Canadá.

## 3.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.2.1. NÚMERO DE PARTICIPANTES

Oitenta crianças saudáveis com idades entre 15 e 19 meses foram inicialmente selecionadas.

### 3.2.2. ADMINISTRAÇÃO DAS VACINAS

As vacinas administradas aos participantes incluíram:

a) Onze doses do lote OA21133 e 68 do lote 5121P36 da vacina **PRP-D**, fornecidas pelos laboratórios CONNAUGHT, de Willowdale, Ontario, Canadá. As doses de vacina **PRP-D** foram aplicadas entre 25/09/1991 e 06/05/1992.

b) Doses de vacinas DPT, OPV, anti-sarampo e tríplice viral, obedecendo ao calendário oficial do estado de São Paulo. Todas as datas de administração, lotes e composição das vacinas foram registradas em formulários apropriados.

As vacinas foram armazenadas entre 2°C e 8°C, em geladeiras apropriadas para esta finalidade.

A vacina **PRP-D** foi administrada em dose única de 0,5 ml, por via intramuscular, na região glútea direita. Não ocorreu administração concomitante de nenhuma outra vacina.

### 3.2.3. MONITORIZAÇÃO CLÍNICA

Todos os participantes foram observados por um período mínimo de 15 minutos após a vacinação para se detectarem sinais de reação anafilática.

Os pais ou responsáveis foram orientados para, nas primeiras 48 horas após a vacinação:

- Observar a ocorrência de reações no local da imunização, como dor, edema ou eritema. Foi fornecida uma régua padronizada para a medida do diâmetro do eritema (ANEXO D);

- Medir a temperatura axilar da criança nos intervalos de 24 e 48 horas após a imunização;

- Observar a ocorrência de alterações sistêmicas, como irritabilidade, sonolência, alterações de apetite, vômitos ou diarreia, alterações cutâneas;

Entre 48 e 72 horas após a vacinação, foi realizada uma entrevista detalhada com os pais ou responsáveis, pessoalmente ou por telefone, para registro das observações das primeiras 48 horas.

Quatro semanas após a vacinação, os pais foram novamente entrevistados para relatar quaisquer alterações ou necessidade de consultas médicas no período.

#### 3.2.4. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Foram colhidas duas amostras de sangue de cada participante:

- Imediatamente antes da vacinação, entre 15 e 19 meses. Estas amostras foram usadas para determinar os títulos naturais de anticorpos anti-PRP;

- Quatro semanas em média após a imunização. Estas amostras foram usadas para determinar os títulos de anticorpos pós-vacinais.

As amostras de sangue coletadas foram de aproximadamente 3 ml, obtidas por punção venosa. Após a coleta, o sangue foi colocado em tubos dotados de gel para separação do soro (VACUTAINER SST<sup>®</sup>, BECKTON DICKINSON & Co., Rutherford, NJ, E.U.A.). A separação do soro foi realizada por centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. O procedimento de separação foi realizado no máximo 4 horas após a coleta da amostra de sangue. Após a separação as amostras de soro foram armazenadas em tubos plásticos estéreis (CORNING, New York, NY, E.U.A.) e conservadas em "freezer", entre - 20 °C e -70 °C.

Todas as amostras, conservadas em gelo seco, foram enviadas por via aérea para a sede dos Laboratórios Connaught, em Willowdale, Ontario, Canadá.

### 3.2.5. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-PRP

As amostras de soro foram enviadas conservadas em gelo seco à sede dos laboratórios CONNAUGHT, em Willowdale, Ontario, Canadá. Foram subsequentemente enviadas aos laboratórios de pesquisa CONNAUGHT, em Swiftwater, Pensilvânia, E.U.A.. Para a mensuração dos títulos de anticorpos totais anti-PRP, foi empregado um radioensaio do tipo FARR (1958), modificado por ANDERSON (1978). O antígeno radiativo empregado foi o PRP marcado com trítio ( $^3\text{H}$ -HbPS). O soro de referência, com uma concentração padronizada de 70  $\mu\text{g/ml}$  de anticorpos anti-PRP, foi fornecido pela FDA. Os títulos foram determinados a uma taxa de ligação antígeno-anticorpo de 30%. A sensibilidade mínima do ensaio empregado era de 0,06  $\mu\text{g/ml}$ . Para efeito de análise, valores inferiores ao mínimo foram arbitrariamente considerados como 0,06  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.3. ANÁLISE DA IMUNIDADE

A análise da imunidade consistiu da determinação de:

- Tipo de distribuição dos títulos de anticorpos;
- Títulos geométricos médios (T.G.M.) de anticorpos, antes e após a vacinação;

- Proporção de crianças com títulos naturais iguais ou superiores a 0,15  $\mu\text{g/ml}$  e 1  $\mu\text{g/ml}$ , e com títulos pós-vacinais iguais ou superiores a 0,15  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  e 10  $\mu\text{g/ml}$ ;

- Taxa de aumento dos títulos de anticorpos, comparando-se os resultados pré e pós-vacinação;

- Associação entre estas variáveis e as condições abaixo:

- Lote de vacina **PRP-D**;

- Presença de nível protetor natural;

- Local da vacinação (HC - UNICAMP ou CSE - Paulínia);

- Idade em meses;

- Sexo;

- Cor;

- Tempo de aleitamento materno;

- Vacinação anti-sarampo ou tríplice viral 15 dias antes ou após

- PRP-D**;

- Vacinação com DPT e vacina oral trivalente anti-pólio 15 dias antes ou após **PRP-D**;

- Frequência a creche;

- Presença de irmãos em creche ou pré-escola;

- Número de moradores no domicílio.

Para efeito de análise, os títulos de anticorpos naturais anti-**PRP** abaixo do limite mínimo de detecção do método (0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) foram considerados iguais a 0,06  $\mu\text{g/ml}$ , e as 4 crianças com 19 meses à vacinação foram incluídas no grupo de 18 meses.

### 3.4. TESTES ESTATÍSTICOS

A distribuição dos títulos de anticorpos naturais e pós-vacinais foi do tipo não-normal. Foram então escolhidos testes estatísticos não-paramétricos para a análise.

Para análise das diferenças entre os títulos de anticorpos naturais e pós-vacinais foi empregado o teste de soma dos "ranks" de Wilcoxon. Para as análises de associação entre os títulos geométricos médios, as proporções de crianças com títulos pré-estabelecidos e as variáveis categóricas acima relacionadas foram empregados os testes estatísticos não-paramétricos de Mann-Whitney (para comparação entre os resultados de dois grupos) e Kruskal-Wallis (para comparação entre os resultados de mais de dois grupos). As associações foram consideradas estatisticamente significativas com valores de  $P$  iguais ou menores do que 5% (ALTMAN, 1991).

Para elaboração de banco de dados e análise estatística foi utilizado o programa para computadores Epi.Info, versão 5.01 (DEAN et al., 1990).

### **3.5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto de trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e pela Comissão de Ética do Centro de Saúde de Paulínia.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Entre 80 crianças selecionadas para inclusão no estudo, foram vacinadas 79 crianças. Destas, 68 foram incluídas na análise final dos resultados, por terem preenchido todos os requisitos do projeto de trabalho.

A tabela 17 (ANEXO A) mostra uma listagem da população analisada em relação a sexo, idade, cor, procedência, lote de vacina **PRP-D** utilizado, tempo de aleitamento materno, frequência a creche, presença de irmãos em creche ou pré-escola e número de moradores no domicílio.

## 4.2. ANÁLISE DA SEGURANÇA DA VACINA PRP-D

### 4.2.1. REAÇÕES LOCAIS

Em três crianças (4,4%) foi relatada dor no local da injeção nas primeiras 48 horas após a vacinação. Eritema ou edema no local não foram relatados em nenhuma criança.

### 4.2.2. REAÇÕES SISTÊMICAS

A reação sistêmica relatada com mais frequência nas primeiras 48 horas foi irritabilidade, identificada em 8 crianças (11,8%); episódios de choro mais persistente do que o habitual foram notificados pelos pais em 5 crianças (7,4%); sonolência em 3 crianças (4,4%); amolecimento das fezes em 3 crianças (4,4%); temperatura acima de 37,8 °C nas primeiras 48 horas em 2 crianças (2,9%). No entanto, a temperatura foi medida pelos pais em apenas 34 crianças (50%) após 24 horas e em 30 crianças (44,1%) após 48 horas. Anorexia foi relatada em uma criança (1,5%); também em uma criança (1,5%) foi relatada palidez. Em uma criança (1,5%) foi relatada uma erupção cutânea do tipo maculopapular cerca de 30 horas após a administração da vacina. O médico participante do estudo que a examinou considerou a erupção secundária à aplicação de vacina triplice viral, que havia sido administrada 11 dias antes da vacina **PRP-D**.

As reações observadas nas primeiras 48 horas estão listadas na tabela 1.

Tab. 1. Reações observadas nas primeiras 48 horas após a vacinação com **PRP-D** em 68 crianças de 15 a 19 meses:

REAÇÃO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS
IRRITABILIDADE	8 (11,8%)
CHORO	5 (7,4%)
SONOLÊNCIA	3 (4,4%)
FEZES AMOLECIDAS	3 (4,4%)
DOR LOCAL	3 (4,4%)
TEMPERATURA $\geq 37,8$ °C	2 (2,9%)
ANOREXIA	1 (1,5%)
PALIDEZ	1 (1,5%)
ERUPÇÃO MACULOPAPULAR	1 (1,5%)

#### 4.2.3. EVENTOS OBSERVADOS ENTRE 48 HORAS E 30 DIAS APÓS A VACINAÇÃO

Das 68 crianças vacinadas, 15 (22,1%) necessitaram de consulta médica nos 30 dias após a vacinação. Nenhum dos problemas diagnosticados foi atribuído à vacinação com **PRP-D** (tabela 2).

Tab. 2. Diagnósticos realizados nos primeiros 30 dias após a vacinação com **PRP-D** em 68 crianças de 15 a 19 meses, porém sem relação com a vacina **PRP-D**:

DIAGNÓSTICO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS
OTITE MÉDIA AGUDA	4 (5,9%)
INFECÇÃO DE VIAS AÉREAS SUPERIORES	4 (5,9%)
IMPETIGO	2 (2,9%)
DIARRÉIA	1 (1,5%)
PNEUMONIA	1 (1,5%)
ENTEROPARASITOSE	1 (1,5%)
SINUSITE	1 (1,5%)
AMIGDALITE	1 (1,5%)

#### 4.3. ANÁLISE DA IMUNIDADE:

##### 4.3.1. IMUNIDADE NATURAL

Os títulos de anticorpos naturais mostraram uma distribuição do tipo não-normal (figura 1, p. 56). Não houve normalização após transformação logarítmica (figura 2, p. 57).

O título geométrico médio (T.G.M) de anticorpos anti-**PRP** pré-vacinação foi de 0,082 µg/ml, com 56 (82%) das crianças apresentando títulos abaixo de 0,06 µg/ml. O valor mínimo foi de 0,06 µg/ml, o máximo de 3,07 µg/ml (percentil 10 = 0,06 µg/ml ; percentil 90 = 0,257 µg/ml). Dez crianças (14,7%) apresentaram títulos superiores a 0,15 µg/ml e apenas duas (2,9%) títulos superiores a 1 µg/ml (tabela 3, p. 48).

## IMUNIDADE NATURAL EM RELAÇÃO A:

### ÁREA GEOGRÁFICA:

Não se observaram diferenças significativas no título natural de anticorpos entre as crianças moradoras em Paulínia e as residentes em Campinas (tabela 6, p. 49).

### IDADE:

No grupo etário estudado, não se observaram diferenças no título natural de anticorpos em relação à idade (tabela 7, p. 50).

### SEXO:

Não se observaram diferenças significativas no título natural de anticorpos em relação ao sexo (tabela 8, p. 51).

### COR:

Não se observaram diferenças significativas no título natural de anticorpos em relação à cor da pele (tabela 9, p. 51).

#### TEMPO DE ALEITAMENTO MATERNO:

Não se demonstraram diferenças significativas no título natural de anticorpos, em relação ao tempo de aleitamento materno, tanto em grupos de três meses como quando comparados dois grupos, até seis meses ou mais de seis meses (tabela 10, p. 52).

#### FREQÜÊNCIA A CRECHES:

Não foram observadas diferenças significativas no título natural de anticorpos em relação à freqüência a creches (tabela 12, p. 54).

#### NÚMERO DE MORADORES NO DOMICÍLIO:

Observamos que, entre as crianças que residiam em domicílios com mais de 5 moradores, uma porcentagem significativamente superior (33,7% versus 10,7%,  $P = 0,05$ ) apresentava títulos naturais superiores a  $0,15 \mu\text{g/ml}$  (tabela 13). O título geométrico médio mostrou-se também superior neste grupo, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $0,12 \mu\text{g/ml}$  versus  $0,08 \mu\text{g/ml}$ ,  $P = 0,08$ ) (tabela 13, p. 54).

#### PRESENÇA DE IRMÃOS EM CRECHE OU PRÉ-ESCOLA:

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os títulos de anticorpos naturalmente adquiridos de acordo com a presença de irmãos no mesmo domicílio em creche ou pré-escola (tabela 14, p. 55).

#### 4.3.2. IMUNIDADE ADQUIRIDA APÓS VACINAÇÃO COM PRP-D:

Os títulos de anticorpos anti-PRP pós-vacinais mostraram uma distribuição não-normal (figura 3, p. 58), com normalização após transformação logarítmica (figura 4, p. 59)

A vacinação com PRP-D levou a um aumento significativo do título de anticorpos anti-PRP. O título geométrico médio evoluiu de 0,08 µg/ml para 2,92 µg/ml, com uma taxa média de aumento de títulos de 35,4 vezes ( $P = 0$ ) (tabela 3, p. 48 e figura 5, p. 60). O valor mínimo foi de 0,106 µg/ml, e o máximo de 110 µg/ml (percentil 10 = 0,309 µg/ml; percentil 90 = 26,4 µg/ml).

A proporção de crianças a alcançar níveis protetores de anticorpos foi alta. Sessenta e seis (97,1%) alcançaram títulos superiores a 0,15 µg/ml, e 51 (75%) alcançaram títulos superiores a 1 µg/ml ( $P = 0$ ) (tabela 3, p. 48).

Das 68 crianças incluídas no estudo de imunogenicidade, 65 (95,6%) apresentaram uma taxa de aumento de títulos superior a duas vezes, sendo caracterizadas como "responsivas". Três crianças (4,4%) não alcançaram o dobro dos títulos pré-

vacinais, sendo caracterizadas como "não-responsivas". Duas destas crianças, no entanto, alcançaram níveis de anticorpos considerados protetores (0,23 µg/ml e 1,53 µg/ml).

A coleta da amostra de soro pós-vacinal foi realizada num intervalo médio de 30 dias após a imunização, variando entre 21 e 49 dias.

#### RESPOSTA À IMUNIZAÇÃO COM PRP-D EM RELAÇÃO A:

##### TÍTULOS PROTETORES NATURAIS (ACIMA DE 0,15 µg/ml):

Os títulos geométricos médios pós-vacinais tenderam a ser mais elevados nas crianças com títulos naturais acima de 0,15 µg/ml, porém a diferença de resposta em relação ao grupo com títulos não-protetores não foi significativa (7,75 µg/ml versus 2,47 µg/ml,  $P = 0,07$ ). A taxa média de aumento mostrou-se maior no grupo sem títulos protetores naturais, mas as diferenças também não se mostraram significativas (40,08 versus 17,09,  $P = 0,06$ ) (tabela 4, p. 48).

A proporção de crianças a alcançar títulos superiores a 1 µg/ml mostrou-se significativamente maior no grupo com títulos protetores naturais (100% versus 70,7%,  $P = 0,05$ ) (tabela 4, p.48).

#### LOTE DA VACINA PRP-D:

Não houve diferenças significativas entre os grupos de crianças imunizadas com doses do lote OA21133 e 5121P356 em relação aos títulos de anticorpos e à distribuição de níveis protetores (tabela 5, p. 49). Com estes resultados, ambos os grupos

foram analisados em conjunto, ao se avaliarem as associações com as demais variáveis citadas.

#### ÁREA GEOGRÁFICA:

Não houve diferenças significativas entre os grupos de crianças residentes em Campinas ou Paulínia em relação aos parâmetros de imunogenicidade analisados (tabela 6, p. 49).

#### IDADE:

Não encontramos diferenças significativas entre as idades de 15, 16, 17 e 18 meses em relação aos títulos de anticorpos pós-vacinais (tabela 7, p. 50). Tais diferenças também não se verificaram quando as crianças foram agrupadas em 15-16 e 17-18 meses (tabela 7). Quando comparados os grupos extremos (15 e 18 meses), verificamos uma tendência a títulos médios e taxas de aumento maiores no grupo de 18 meses, embora sem significância estatística para um nível de 5% (4,58 versus 2,18  $\mu\text{g/ml}$ , com  $P = 0,07$ , e 57,64 versus 29,35, com  $P = 0,07$ ) (tabela 7, p. 50). As crianças de 18 meses apresentaram também uma proporção significativamente maior com título pós-vacinação acima de 5  $\mu\text{g/ml}$  (55% versus 19,2%,  $P = 0,01$ ) (tabela 7, p. 50).

#### SEXO:

Não constatamos diferenças significativas entre meninos e meninas na resposta à vacina **PRP-D** (tabela 8, p. 51).

**COR:**

Não foram constatadas diferenças significativas entre crianças brancas, negras, pardas ou amarelas na resposta à imunização com **PRP-D**. A análise foi prejudicada devido à predominância absoluta (55 em 68, ou 80,8%) de crianças de cor branca na população de estudo, e o pequeno número de crianças de outros grupos (tabela 9, p. 51).

**TEMPO DE ALEITAMENTO MATERNO:**

Não observamos diferenças significativas na resposta à vacina **PRP-D** de acordo com o tempo de aleitamento materno (tabela 10, p. 52)

**ADMINISTRAÇÃO DE VACINA ANTI-SARAMPO OU TRÍPLICE VIRAL 15 DIAS ANTES OU APÓS **PRP-D**:**

As vacinas anti-sarampo ou tríplice viral não demonstraram influência sobre o título de anticorpos anti-**PRP** após a vacinação com **PRP-D** (tabela 11, p. 53).

**ADMINISTRAÇÃO DE VACINA DPT 15 DIAS ANTES OU APÓS **PRP-D**:**

Não constatamos diferenças significativas entre as crianças vacinadas com DPT 15 dias antes ou após **PRP-D** e as não-vacinadas em relação aos títulos de anticorpos anti-**PRP** pós-vacinais (tabela 11, p. 53).

#### FREQÜÊNCIA A CRECHES:

A resposta de anticorpos anti-PRP no grupo de crianças que freqüentavam creches caracterizou-se por títulos de anticorpos significativamente mais baixos (título geométrico de 1,49  $\mu\text{g/ml}$  versus 4,81  $\mu\text{g/ml}$ ,  $P = 0,002$ ) e taxas de aumento de título significativamente mais baixas (20,77 versus 52,52,  $P = 0,02$ ) do que as que não freqüentavam creches (tabela 12, p. 54 e figura 6, p. 61). A análise da distribuição dos títulos mostrou, no grupo de crianças de creche, uma freqüência significativamente menor de crianças com títulos acima de 5  $\mu\text{g/ml}$  (20,7% versus 51,3%,  $P = 0,01$ ) e acima de 10  $\mu\text{g/ml}$  (10,3% versus 30,8%,  $P = 0,05$ ) (tabela 12, p. 54). Adicionalmente, as três crianças com taxa de aumento de títulos menor de duas vezes (ou "não responsivas") e as duas crianças que não demonstraram títulos pós-vacinais acima de 0,15  $\mu\text{g/ml}$  pertenciam ao grupo de crianças em creches.

#### NÚMERO DE MORADORES NO DOMICÍLIO:

Não foram observadas diferenças significativas nos títulos de anticorpos pós-vacinais do grupo de crianças com mais de cinco moradores no domicílio em relação ao grupo com cinco ou menos moradores (tabela 13, p. 54).

#### PRESENÇA DE IRMÃOS EM CRECHE OU PRÉ-ESCOLA:

Não houve diferenças significativas nos grupos de crianças com ou sem irmãos em creche ou pré-escola, com relação aos títulos de anticorpos pós-vacinais (tabela 14, p. 55).

Tab. 3. Títulos de Anticorpos Anti-PRP (em µg/ml) de crianças entre 15 e 19 meses de idade, antes e após imunização com PRP-D.

ETAPA	N †	T.G.M.*	NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS				POS / PRÉ §
			≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10	
PRÉ - PRP-D	68	0,08	10 (14,4%)	2 (2,9%)	0	0	35,4
PÓS - PRP-D	68	2,92	66 (97,1%)	51 (75%)	26 (38,2%)	15 (22,1%)	
T#		4,24	17,18	12,69			
P‡		≅ 0	0	0			

† Número de crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de elevação

= Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 4. Comparação entre Títulos Naturais Protetores de Anticorpos Anti-PRP e Resposta à Vacina PRP-D em crianças entre 15 e 19 meses de idade.

TÍTULO	N †	T.G.M.*	POS/PRÉ §	NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS			
				≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
≥ 0,15	10	7,75	17,09	10 (100%)	10 (100%)	5 (50%)	4 (40%)
< 0,15	58	2,47	40,08	56 (96,6%)	41 (70,7%)	21 (36,2%)	11 (19%)
H#		3,31	3,43	0,35	3,85	0,68	2,16
P‡		0,07	0,06	0,55	0,05	0,41	0,14

† Número de crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de Elevação

= Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 5. Comparação entre Lote de Vacina Administrada, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 meses de idade.

LOTE	N †	TÍTULO GEOMÉTRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRE	POS	POS/PRE‡	PRÉ-VACINAÇÃO			POS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
OA21133	6	0,12	8,63	74,64	1 (16,7%)	1 (16,7%)	6 (100%)	5 (83,3%)	4 (66,7%)	3 (50%)
5121P36	62	0,08	2,63	32,90	9 (14,5%)	1 (1,6%)	60 (96,8)	46 (74,2%)	22 (35,5%)	12 (19,4%)
H#		0,01	2,78	1,52	0,02	4,27	0,20	0,24	2,22	2,94
P‡		0,91	0,10	0,22	0,89	0,04	0,66	0,62	0,14	0,09

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

‡ Taxa de Elevação

# Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 6. Comparação entre Município de Residência, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 meses de idade.

MUNICÍPIO	N †	TÍTULO GEOMÉTRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRE	POS	POS/PRE‡	PRÉ-VACINAÇÃO			POS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
CAMPINAS	29	0,08	3,84	48,31	2 (6,9%)	1 (3,4%)	29 (100%)	24 (82,8%)	12 (41,4%)	9 (31,0%)
PAULÍNIA	39	0,08	2,38	28,04	8 (20,5%)	1 (2,6%)	37 (94,9%)	27 (69,2%)	14 (35,9%)	6 (15,4%)
H#		0,53	1,26	2,74	2,42	0,05	1,51	1,60	0,21	2,33
P‡		0,47	0,26	0,10	0,12	0,83	0,22	0,21	0,65	0,13

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

‡ Taxa de Elevação

# Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 7. Comparação entre Idade, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 meses de idade.

IDADE	N †	TÍTULO GEOMÉTRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRE	POS	POS/PRÉ§	PRÉ-VACINAÇÃO			PÓS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
15	26	0,07	2,18	29,35	3 (11,5%)	0	26 (100%)	19 (73,1%)	5 (19,2%)	3 (11,5%)
16	9	0,10	2,25	21,38	2 (22,2%)	1 (11,1%)	8 (88,8%)	6 (66,7%)	5 (55,5%)	2 (22,2%)
17	13	0,09	3,14	34,29	3 (23,1%)	0	13 (100%)	9 (69,2%)	5 (38,5%)	3 (23,1%)
18	20	0,08	4,58	57,64	2 (10%)	1 (5%)	19 (95%)	17 (85%)	11 (55%)	7 (35%)
H#		0,81	3,39	2,31	1,67	3,53	3,53	1,66	7,39	3,58
P‡		0,85	0,33	0,13	0,64	0,32	0,32	0,65	0,06	0,31
15-16	35	0,08	2,19	27,06	5 (14,3%)	1 (2,9%)	34 (97,1%)	25 (71,4%)	10 (28,6%)	5 (14,3%)
17-18	33	0,08	3,95	46,97	5 (15,2%)	1 (3%)	32 (97%)	26 (78,8%)	16 (48,5%)	10 (30,3%)
H#		0,01	2,43	2,31	0,01	0,002	0,002	0,48	2,81	2,50
P‡		0,91	0,12	0,13	0,92	0,97	0,97	0,49	0,09	0,11
15	26	0,07	2,18	29,35	3 (11,5%)	0	26 (100%)	19 (73,1%)	5 (19,2%)	3 (11,5%)
18	20	0,08	4,58	57,64	2 (10%)	1 (5%)	19 (95%)	17 (85%)	11 (55%)	7 (35%)
H#		0	3,22	3,38	0,03	1,30	1,30	0,92	6,24	3,58
P‡		1	0,07	0,07	0,87	0,25	0,25	0,34	0,01	0,06

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de Elevação

= Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 8. Comparação entre Sexo, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 meses de idade.

SEXO	N †	TÍTULO GEOMÉTRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRE	PÓS	PÓS/PRE§	PRÉ-VACINAÇÃO			PÓS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
MASC.	42	0,08	2,65	32,31	4 (9,5%)	2 (4,8%)	41 (97,6%)	30 (71,4%)	14 (33,3%)	11 (26,2%)
FEM.	26	0,08	3,41	40,92	6 (23,1%)	0	25 (96,2%)	21 (80,8%)	12 (46,2%)	4 (15,4%)
H#		0,70	1,03	0,44	2,32	1,26	0,12	0,74	1,10	1,07
P‡		0,40	0,31	0,51	0,13	0,26	0,73	0,39	0,29	0,30

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de Elevação

# Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 9. Comparação entre Cor, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 Meses de Idade.

COR	N †	TÍTULO GEOMÉTRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRE	PÓS	PÓS/PRE§	PRÉ-VACINAÇÃO			PÓS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
BRANCA	55	0,08	3,26	42,75	6 (10,9%)	1 (1,8%)	54 (98,2%)	41 (74,5%)	24 (43,6%)	14 (25,5%)
PARDA	9	0,08	1,09	13,98	2 (22,2%)	0	8 (88,9%)	6 (66,7%)	0	0
AMARELA	3	0,15	3,49	23,00	1 (33,3%)	0	3 (100%)	3 (100%)	1 (33,3%)	0
NEGRA	1	1,67	26,8	16,05	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
H#		7,32	6,01	4,90	7,55	33,11	2,43	1,65	7,78	7,19
P‡		0,06	0,11	0,18	0,06	< 0,0001	0,49	0,65	0,05	0,07

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de Elevação

# Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 10. Comparação entre Tempo de Aleitamento Materno, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina **PRP-D** em Crianças entre 15 e 19 Meses de Idade.

TEMPO	N †	TITULO GEOMETRICO MÉDIO*			NUMERO DE CRIANÇAS COM TITULOS DEFINIDOS					
		PRÉ	POS	POS/PRE‡	PRÉ-VACINAÇÃO			PÓS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
< 1 M	4	0,08	3,20	42,11	1 (25%)	0	4 (100%)	4 (100%)	2 (50%)	0
1 - 3 M	13	0,09	2,31	25,69	2 (15,4%)	1 (7,7%)	13 (100%)	10 (76,9%)	3 (23,1%)	2 (15,4%)
4 - 6 M	21	0,07	2,36	31,99	3 (14,3%)	0	20 (95,2%)	13 (61,9%)	9 (42,9%)	3 (14,3%)
7 - 9 M	14	0,07	2,58	35,23	1 (7,1%)	0	14 (100%)	11 (78,6%)	4 (28,6%)	3 (21,4%)
10 - 12 M	5	0,07	3,01	43,24	0	0	4 (80%)	4 (80%)	3 (60%)	2 (40%)
> 12 M	11	0,12	6,44	53,78	3 (27,3%)	1 (9,1%)	11 (100%)	9 (81,8%)	5 (45,5%)	5 (45,5%)
H#		2,32	3,16	2,03	3,18	3,76	6,52	3,66	3,44	6,55
P‡		0,80	0,67	0,84	0,67	0,58	0,26	0,60	0,63	0,26
<= 6 M	38	0,08	2,42	30,55	6 (15,8%)	1 (2,6%)	37 (97,4%)	27 (71,1%)	14 (36,8%)	5 (13,2%)
> 6 M	30	0,09	3,70	42,57	4 (13,3%)	1 (3,3%)	29 (96,7%)	24 (80,0%)	12 (40,0%)	10 (33,3%)
H#		0,004	0,90	1,00	0,08	0,03	0,03	0,70	0,07	3,91
P‡		0,95	0,34	0,31	0,78	0,87	0,87	0,40	0,79	0,05

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

‡ Taxa de Elevação

# Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 11. Comparação entre Vacinação Anti-Sarampo ou DPT Administrados 15 Dias antes ou após a Vacinação, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 Meses de Idade.

VACINA	I	N†	TÍTULO GEOMÉTRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
			PRE	PÓS	PÓS/PRE§	PRÉ-VACINAÇÃO			PÓS-VACINAÇÃO		
						≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
<b>A.S @</b>											
	< 15	17	0,08	2,97	37,67	2 (11,8%)	0	17 (100%)	14 (82,4%)	7 (41,2%)	3 (17,6%)
	> 15	51	0,08	2,90	34,63	8 (15,7%)	2 (3,9%)	49 (96,1%)	37 (72,5%)	19 (37,3%)	12 (23,5%)
<b>H#</b>			0,24	0,01	0,16	0,15	0,68	0,68	0,64	0,08	0,25
<b>P‡</b>			0,62	0,91	0,69	0,69	0,41	0,41	0,42	0,77	0,61
<b>DPT</b>											
	< 15	9	0,09	2,38	25,76	2 (22,2%)	0	9 (100%)	7 (77,7%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)
	> 15	59	0,08	3,01	37,11	8 (13,6%)	2 (3,4%)	57 (96,6%)	44 (74,6%)	24 (40,7%)	13 (22%)
<b>H#</b>			1,28	0,41	0,54	0,46	0,31	0,31	0,04	1,11	0
<b>P‡</b>			0,26	0,52	0,46	0,50	0,58	0,58	0,84	0,29	0,99

† Número de Crianças  
 @ Anti-sarampo  
 \* Título Geométrico Médio, em µg/ml  
 § Taxa de Elevação  
 # Coeficiente do Teste  
 ‡ Nível de Significância

Tab. 12. Comparação entre Frequência a Creches, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 Meses de Idade.

CRECHE	N †	TÍTULO GEOMETRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRÉ	POS	POS/PRÉ§	PRÉ-VACINAÇÃO			POS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
SIM	29	0,072	1,49	20,77	2 (6,9%)	0	27 (93,1%)	19 (65,5%)	6 (20,7%)	3 (10,3%)
NÃO	39	0,091	4,81	52,52	8 (20,5%)	2 (5,1%)	39 (100%)	32 (82,1%)	20 (51,3%)	12 (30,8%)
H#		0,77	9,69	5,79	2,42	1,51	2,73	2,39	6,49	3,98
P‡		0,38	0,002	0,02	0,12	0,22	0,10	0,12	0,01	0,05

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de Elevação

= Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 13. Comparação entre Número de Pessoas no Domicílio, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 Meses de Idade.

PESSOAS	N †	TÍTULO GEOMETRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRÉ	POS	POS/PRÉ§	PRÉ-VACINAÇÃO			POS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
≤ 5	56	0,08	2,69	35,51	6 (10,7%)	1 (1,8%)	54 (96,4%)	42 (75%)	21 (37,5%)	11 (19,6%)
> 5	12	0,12	4,26	34,69	4 (33,3%)	1 (8,3%)	12 (100%)	9 (75%)	5 (41,7%)	4 (33,3%)
H#		2,95	0,58	0,13	3,97	1,46	0,43	0	0,07	1,06
P‡		0,08	0,44	0,72	0,05	0,25	0,51	1	0,79	0,30

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de Elevação

= Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

Tab. 14. Comparação entre Presença de Irmãos em Creche ou Pré-Escola, Títulos de Anticorpos Naturais e Resposta à Vacina PRP-D em Crianças entre 15 e 19 Meses de Idade.

GRUPO	N †	TÍTULO GEOMÉTRICO MÉDIO*			NÚMERO DE CRIANÇAS COM TÍTULOS DEFINIDOS					
		PRÉ	PÓS	PÓS/PRÉ§	PRE-VACINAÇÃO			PÓS-VACINAÇÃO		
					≥ 0,15	≥ 1	≥ 0,15	≥ 1	≥ 5	≥ 10
SIM	13	0,08	3,97	47,43	3 (23,1%)	0	13 (100%)	11 (84,6%)	5 (38,5%)	3 (23,1%)
NÃO	55	0,08	2,71	32,99	7 (12,7%)	2 (3,6%)	53 (96,4%)	40 (72,7%)	21 (38,2%)	12 (21,8%)
H#		0,30	0,44	0,29	0,88	0,48	0,48	0,78	0	0,01
P‡		0,58	0,51	0,59	0,35	0,49	0,49	0,38	0,98	0,92

† Número de Crianças

\* Título Geométrico Médio, em µg/ml

§ Taxa de Elevação

# Coeficiente do Teste

‡ Nível de Significância

FIG. 1: TITULOS NATURAIS DE ANTICORPOS

ANTI-PRP EM CRIANÇAS DE 15 A 19 MESES

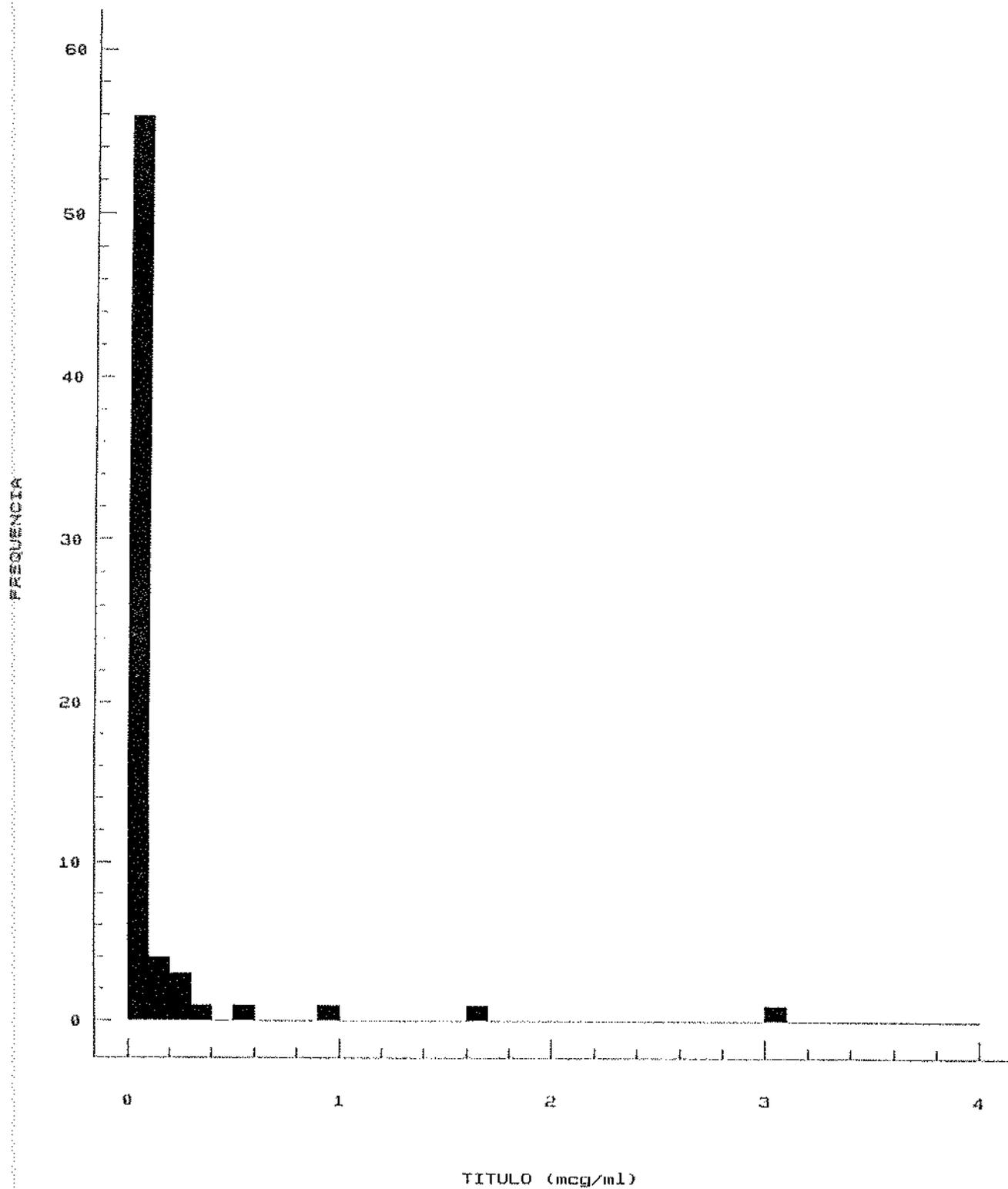


FIG. 2: TITULOS NATURAIS DE ANTICORPOS

ANTI-PRP EM CRIANCAS DE 15 A 19 MESES

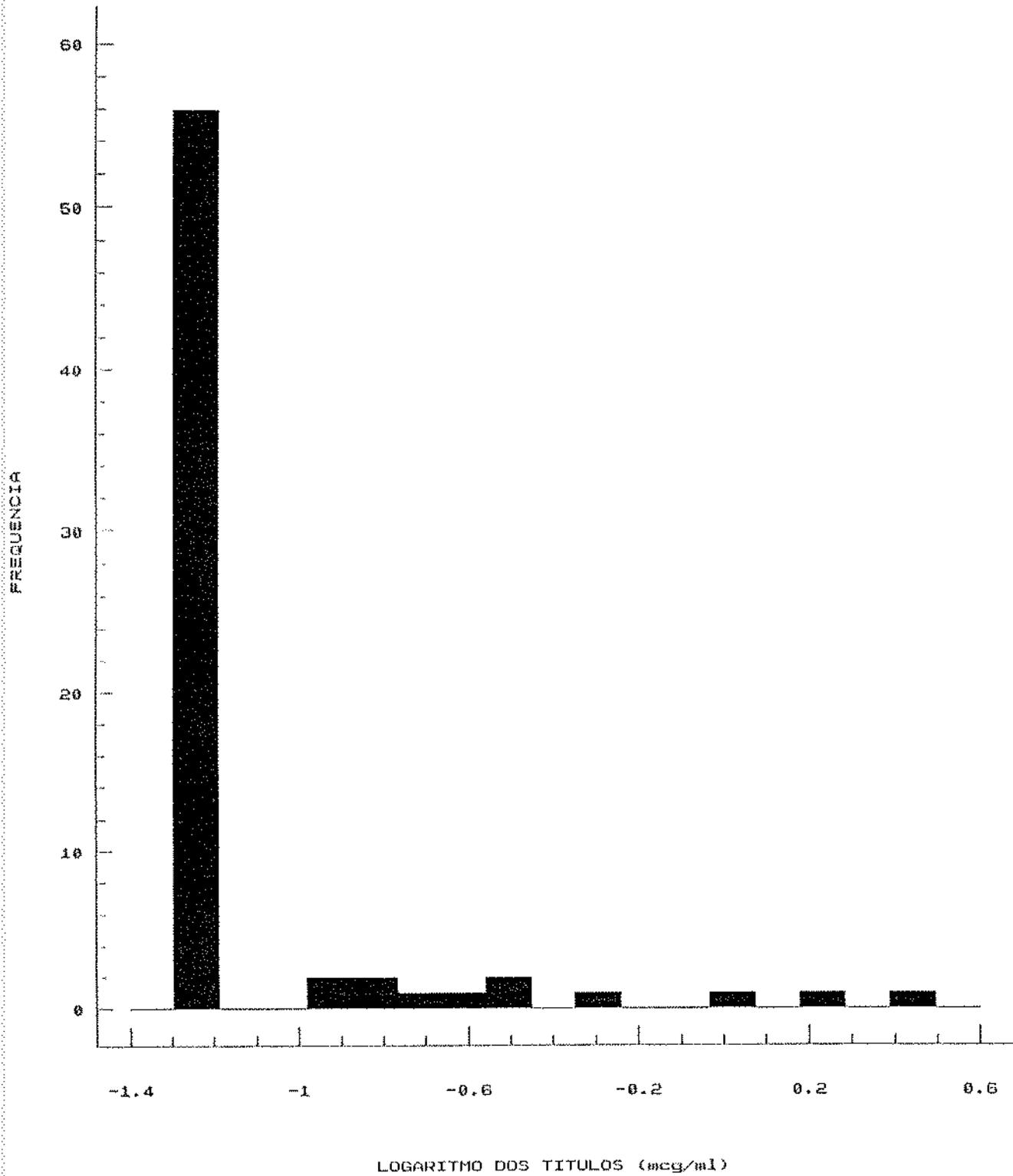


FIG. 3: TITULOS DE ANTICORPOS ANTI-PRP

APOS PRP-D EM CRIANCAS DE 15 A 19 MESES

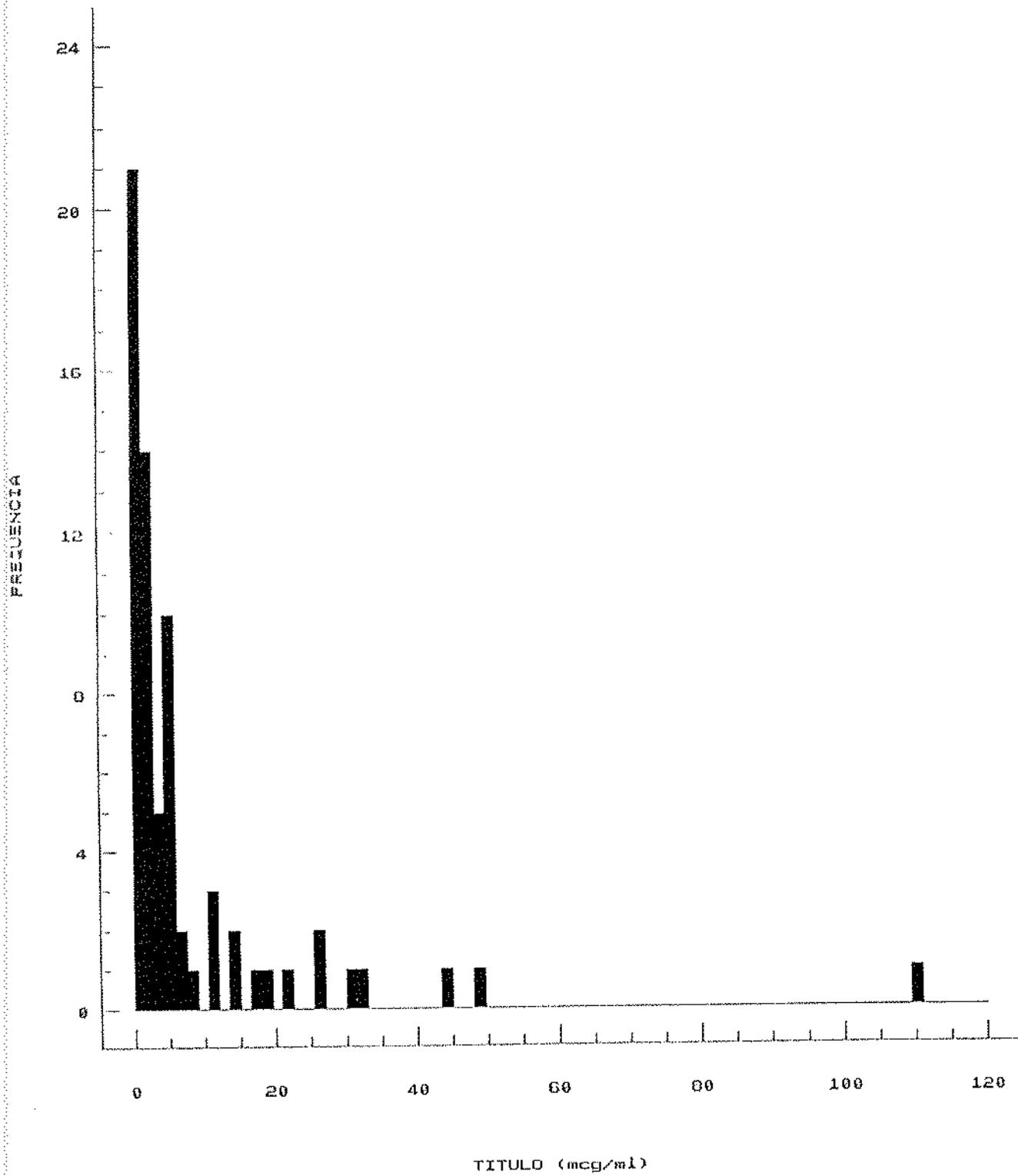


FIG. 4: TITULOS DE ANTICORPOS ANTI-PRP

APOS PRP-D EM CRIANÇAS DE 15 A 19 MESES

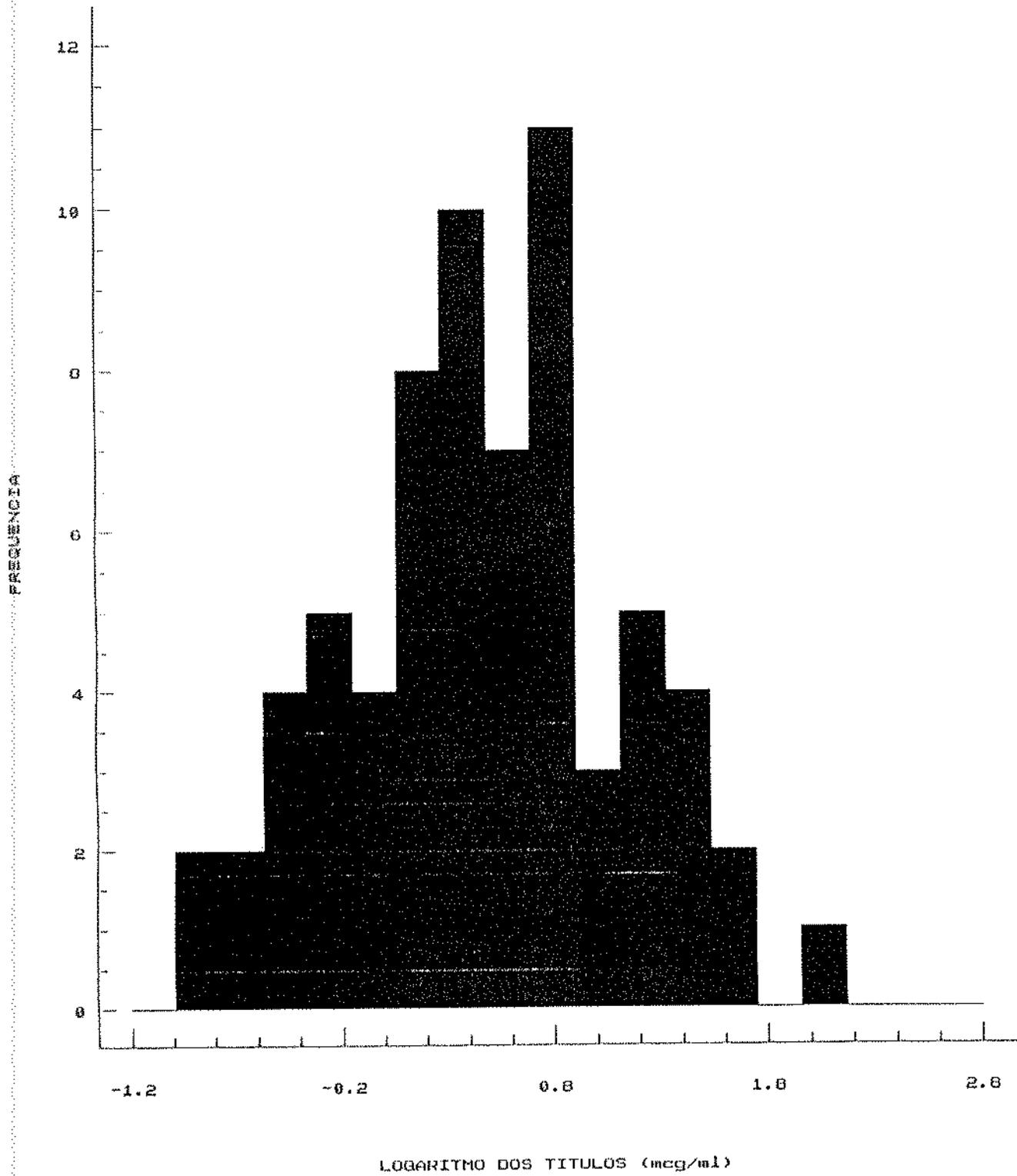


FIG. 5: COMPARAÇÃO ENTRE TITULOS DE ANTI-CORPOS ANTI-PRP ANTES E APOS PRP-D

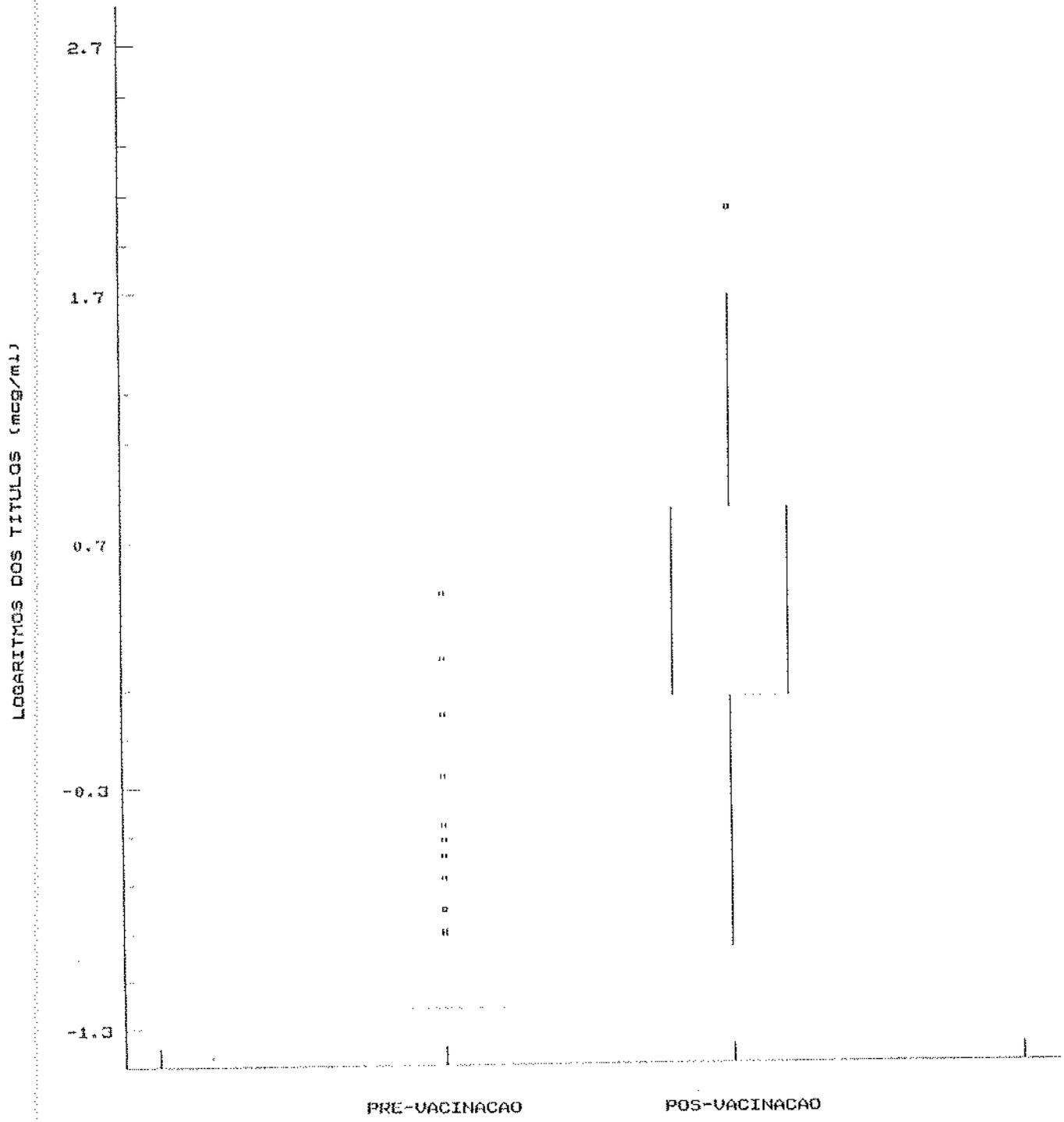
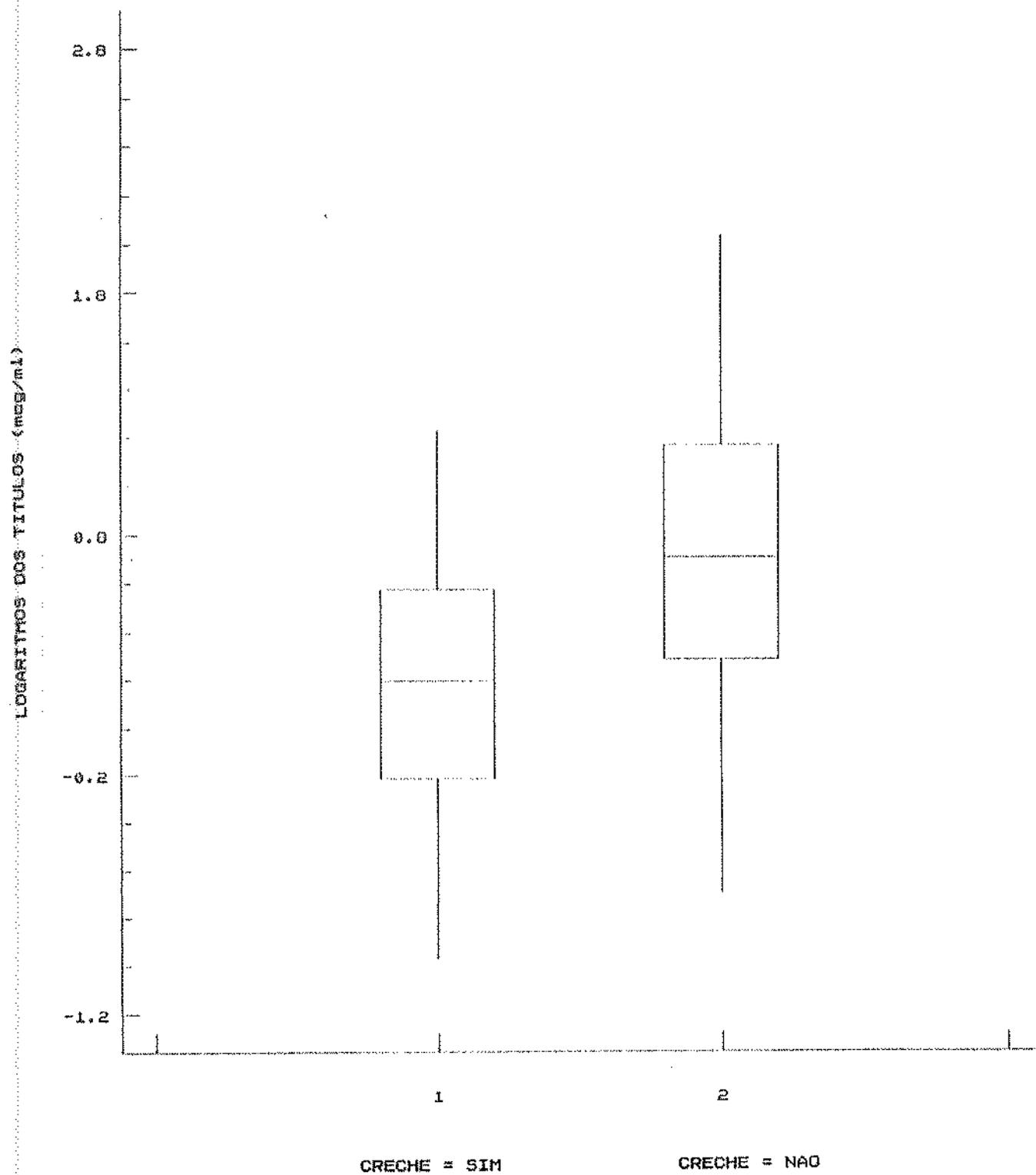


FIG.6: TITULOS POS-VACINAIS DE ANTICOR-

POS ANTI-PRP EM RELACAO A FREQ. A CRECHE



## 5. DISCUSSÃO

O título geométrico médio (T.G.M.) de anticorpos anti-**PRP** naturalmente adquiridos na população estudada mostrou-se bastante baixo (0,082  $\mu\text{g/ml}$ ). Mais importante ainda é a demonstração de que apenas 10 (14,7%) das crianças apresentavam títulos maiores de 0,15  $\mu\text{g/ml}$ , e apenas 2 (2,9%) apresentavam títulos maiores de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Das 68 crianças, 56 (82,4%) apresentavam o nível de 0,06  $\mu\text{g/ml}$ , no limite mínimo de detecção do método utilizado.

Estes resultados se assemelham aos relatados na literatura internacional. Na tabela 15 apresentamos uma seleção das principais referências encontradas sobre os títulos naturais de anticorpos anti-**PRP** determinados por radioimunoensaio em idades semelhantes. Há uma considerável variação nos resultados, devido a diferenças na metodologia e sensibilidade dos ensaios. Esta variação, porém, não descaracteriza o perfil geral dos títulos neste grupo etário, consistentemente baixos.

Tab. 15. Níveis Séricos de Anticorpos Naturais Anti-PRP em Crianças entre 8 e 24 Meses de Idade em Diferentes Países:

PAÍS	N †	IDADE (M)	T. G. M. ( $\mu\text{g/ml}$ ) ‡	$\geq$ 0,15*	$\geq$ 1*	REFERÊNCIA
<b>BRASIL</b>	<b>68</b>	<b>15-19</b>	<b>0,08</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	SILVA et al. (1993)
E.U.A.	178	15-24	0,027			BERKOWITZ et al. (1987)
E.U.A. - NAVAJO	28	18	0,39	89	18	LETSON et al. (1988)
E.U.A.	70	17-19	0,17			RAMSEY et al. (1989)
E.U.A. - APACHE	17	18	0,06			SIBER et al. (1990)
E.U.A.	313	17-19	0,17	46	6	HOLMES et al. (1991)
FINLÂNDIA	45	14-15	< 0,1			ESKOLA et al. (1990)
FINLÂNDIA	63	24	0,1			KÄYTTÖ et al. (1988)
CANADÁ	50	15-17	0,03			FRAYHA et al. (1991)
CANADÁ	87	24	0,22			AIDDERSON et al. (1991)
SUECIA	85	18-23	0,16			CLAESSON et al. (1988)
ITALIA	55	8-17		29		SANSONI et al. (1992)

\* Porcentagem de crianças a atingir os títulos definidos, em  $\mu\text{g/ml}$ .

‡ T.G.M. : Título Geométrico Médio, em  $\mu\text{g/ml}$ .

† Número de indivíduos.

A análise da imunidade natural contra o **Hib** deve levar em conta, além do título global de anticorpos, as proporções entre isotipos de imunoglobulinas e suas subclasses, bem como as diferenças de avidéz, pois tais fatores podem determinar diferenças na atividade bactericida de anticorpos. A deficiência de componentes do sistema complemento pode diminuir a atividade opsônica do soro (WINKELSTEIN & MOXON, 1992). A imunidade humoral em mucosas é importante na resistência a infecções, e deficiências seletivas de IgA e subclasses de IgG podem alterar a resposta local (BRANDTZAEG, 1992).

Os baixos níveis de anticorpos protetores em crianças abaixo dos 2 anos explicam-se pela própria ontogenia do sistema imune no homem. A resposta a antígenos "timo-independentes do tipo II", como o **PRP**, só se apresenta com títulos potencialmente protetores a partir dos 18 meses. Na maioria das crianças, antes dos 24 meses, a doença invasiva pelo **Hib** não desencadeia a síntese de anticorpos anti-**PRP** em títulos protetores (CLAESSON et al., 1988). TROLLFORS et al. (1992) demonstraram, em um grupo de crianças com infecção invasiva, que abaixo dos 12 meses apenas 2 de 7 crianças apresentaram uma resposta detectável de anticorpos. Em um estudo de coorte retrospectivo no Alaska, PETERSEN et al. (1991) não encontraram diferença significativa no título de anticorpos anti-**PRP** entre crianças com doença por **Hib** e controles da mesma idade.

A colonização faríngea pelo **Hib** pode, no entanto, estar associada à gênese de anticorpos com níveis protetores mesmo em idades relativamente precoces (HALL et al., 1987). Embora faltem estudos conclusivos para elucidar a relação entre colonização faríngea, doença invasiva e aquisição de anticorpos contra o **Hib**, estes resultados podem sugerir que um grupo das crianças que apresentam doença por **Hib** é incapaz de produzir anticorpos em resposta à exposição, ou pode apresentar maturação mais tardia em sua capacidade de síntese.

É importante ressaltar que, na natureza, a imunidade contra o **Hib** se desenvolve a partir do contacto com organismos inteiros, e não apenas com seu polissacáride capsular. Desta forma, outros componentes celulares, como as proteínas de membrana externa ou lipopolissacárides, podem atuar como carreadores, estimulando o sistema "timo-dependente" e proporcionando uma elevação gradual dos títulos de anticorpos e desenvolvimento de memória imunológica. Estes componentes podem estar presentes no próprio **Hib**, nas cepas de **Hi** não-tipável ou mesmo em bactérias que

possuam antígenos capsulares de reação cruzada com o **PRP**, como *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*. Animais experimentalmente imunizados com células inteiras de **Hib** inativadas apresentam resposta de anticorpos mais intensa do que controles imunizados com o **PRP** purificado. Assim, a exposição contínua ao ambiente microbiano também explicaria a dependência da síntese de anticorpos em relação à idade. Em crianças maiores de 5 anos e adultos, o contacto com o **PRP** leva a uma resposta de anticorpos vigorosa e sustentada (ROBBINS et al., 1973).

Entre as variáveis que procuramos relacionar ao título natural de anticorpos, a única que demonstrou associação estatisticamente significativa foi o número de moradores no domicílio. Em nossa casuística, as crianças que moravam em residências com mais de 5 indivíduos apresentaram títulos naturalmente protetores (acima de 0,15 µg/ml) em uma proporção significativamente maior (33,7% versus 10,7%,  $P = 0,05$ ). Não encontramos na literatura outros trabalhos que estabelecessem tal associação. Já está estabelecido por estudos epidemiológicos que a aglomeração de famílias em moradias pequenas é um fator de risco para infecções por **Hib** (COCHI et al., 1986). Um estudo realizado no Alaska demonstrou haver um aumento do risco de infecções por **Hib** em crianças que residiam em casas com três ou mais moradores além dos componentes da família nuclear. Especulou-se que crianças suscetíveis em "famílias estendidas" estão expostas a um maior número de cuidadores, e que tais pessoas podem ser portadoras assintomáticas do **Hib**. Tal exposição poderia levar a uma incidência maior de colonização faríngea nestas crianças, com desenvolvimento de imunidade natural. Este mesmo estudo, no entanto, não demonstrou associação entre o número de moradores e a aquisição natural de anticorpos (PETERSEN et al., 1991).

Decidimos investigar a associação entre aleitamento materno e títulos naturais de anticorpos devido ao já demonstrado efeito protetor do aleitamento materno em relação à infecção pelo **Hib** nos primeiros 6 meses de vida (ISTRE et al., 1985; COCHI et al., 1986). Não encontramos tal associação, embora, na idade de nossa população de estudo, o aleitamento materno tenha sido apenas um dado histórico. O mecanismo mais aceito para este efeito protetor é a passagem de anticorpos do leite materno para as vias respiratórias superiores do lactente. O leite materno apresenta concentrações significativas de IgA e IgG específicos para o **Hib**, que são transferidas ao lactente (KASSIM et al., 1989). A literatura a respeito do efeito do leite materno sobre a imunorregulação do lactente ainda é escassa, porém há estudos experimentais demonstrando a ação de proteínas do leite humano sobre a proliferação de linfócitos T (MINCHEVA-NILSSON et al., 1990). Há também a possibilidade de que anticorpos anti-idiotípicos da classe IgA, secretados no leite, desempenhem funções imunoestimulatórias, levando a uma primoestimulação precoce do sistema imune das mucosas (BRANDTZAEG, 1992). PABST & SPADY (1990) mostraram, em lactentes imunizados com a vacina **HbOC**, que aqueles alimentados com leite materno por um período mínimo de um mês apresentaram níveis de anticorpos significativamente mais altos após 3 doses da vacina em relação aos alimentados exclusivamente por fórmula. Este estudo ilustra a necessidade da inclusão do aleitamento materno como uma importante variável em estudos de imunogenicidade de vacinas.

Não encontramos diferenças significativas no título de anticorpos naturais em relação à idade (em meses) das crianças de nossa amostra. Tais diferenças não eram esperadas, por se tratar de um grupo etário bastante estreito.

Apesar das limitações descritas acima, podemos inferir, baseados na análise dos níveis de anticorpos, que a população estudada é composta por uma grande parcela de crianças ainda suscetíveis à infecção pelo **Hib**.

A vacina **PRP-D** demonstrou boa imunogenicidade na população de estudo, obtendo-se um título geométrico médio de anticorpos anti-**PRP** de 2,92  $\mu\text{g/ml}$ , com uma taxa média de aumento de títulos de 35,4 vezes. O nível mínimo protetor, de 0,15  $\mu\text{g/ml}$ , foi observado em 66 crianças (97,1%), e o nível associado com proteção a longo prazo (1  $\mu\text{g/ml}$ ) foi observado em 51 crianças (75%).

Na tabela 16 relacionamos os resultados obtidos em uma seleção dos principais trabalhos consultados em nossa pesquisa, realizados em crianças de idades semelhantes. São mostrados resultados de estudos de primovacinação com a vacina **PRP** e com as quatro vacinas conjugadas atualmente em uso.

Tab. 16. Níveis de Anticorpos Anti-PRP após Vacinação de Crianças entre 15 e 25 Meses de Idade, com diferentes vacinas:

VACINA	LOCAL	N *	IDADE (M)	T.G.M. PRÉ #	≥ 0,15 †	≥ 1 ‡	T.G.M. PÓS §	≥ 0,15 †	>=1 ‡	ELEV. ¶	REFERENCIA
<b>PRP</b>											
	E.U.A.	147	15-24	0,035			0,154	45,7	25,6	4,4	BERKOWITZ et al. (1987)
	E.U.A. - APACHE	17	18	0,06			0,15			2,5	SIBER et al. (1990)
	FINLÂNDIA	40	24	0,13	25	6	3,45	97	68	26,5	KÄYHTY et al. (1988)
<b>PRP-D</b>											
	BRASIL	68	15-19	0,08	15	3	2,92	97	75	36,5	SILVA et al. (1993)
	E.U.A.	178	15-24	0,027			2,17	94	67	80,4	BERKOWITZ et al. (1987)
	E.U.A.	46	17-22		28		4,24	91	72		TURNER et al. (1991)
	FINLÂNDIA	43	24	0,13			8,82			67,8	KÄYHTY et al. (1988)
	FINLÂNDIA	54	23-25	0,15			9,72			64,8	KÄYHTY et al. (1991)
<b>HbOC</b>											
	E.U.A. - NAVAJO	28	18	0,39	89	18	2,33	100	89	6,0	LETSON et al. (1988)
	E.U.A.	171	15-23	0,2		10	13,77		99	68,8	MADORE et al. (1990)
<b>PRP-T</b>											
	SUÉCIA	28	18-23	0,16			26,8		100	167,5	CLAESSON et al. (1988)
<b>PRP-OMP</b>											
	E.U.A.	71	15-17				3,3		80		CDC (1990)

\* : Número de indivíduos

# : Título Geométrico Médio pré-vacinação

† : Porcentagem de indivíduos com títulos  $\geq 0,15$  mcg/ml‡ : Porcentagem de indivíduos com títulos  $\geq 1$  mcg/ml

§ : Título Geométrico Médio pós-vacinação

¶ : Taxa de Elevação de Títulos.

A análise dos dados da tabela 16 mostra que a vacina **PRP-D** apresenta uma imunogenicidade superior à vacina polissacarídica. Observa-se que a partir dos 15 meses não há diferenças importantes de imunogenicidade entre as quatro vacinas conjugadas, embora os títulos geométricos médios e a porcentagem de crianças que alcançam títulos iguais ou superiores a 1 µg/ml sejam em geral menores nas crianças que receberam a vacina **PRP-D**.

As diferenças de planejamento entre os estudos, e, principalmente, nos métodos de determinação dos títulos de anticorpos anti-**PRP**, dificultam a interpretação comparativa dos resultados. A realização de estudos comparativos entre duas ou mais vacinas conjugadas, dentro de um mesmo protocolo, com a determinação dos títulos de anticorpos anti-**PRP** simultaneamente em um mesmo laboratório, permitiu que se estabelecesse um perfil mais preciso da imunogenicidade de cada uma delas. Comentaremos de maneira mais pormenorizada os trabalhos que seguem este planejamento:

TURNER et al. (1991) estudaram a resposta de 134 crianças saudáveis entre 17 e 22 meses às vacinas **PRP** (não-conjugada), **PRP-D** e **HbOC**. Os títulos geométricos médios (T.G.M.) 1 mês após a vacinação foram significativamente mais altos para as vacinas conjugadas (4,24 µg/ml para a **PRP-D** e 6,82 µg/ml para a **HbOC**) em relação à vacina de **PRP** (0,79 µg/ml). A porcentagem de crianças que alcançaram títulos maiores ou iguais a 1 µg/ml foi de 49% no grupo de **PRP**, 72% no grupo de **PRP-D** e 96% no grupo de **HbOC**. A resposta de anticorpos para **PRP-D** e **HbOC** foi predominantemente da classe IgG e da subclasse IgG1.

HOLMES et al. (1991) compararam as quatro vacinas conjugadas em um grupo de 313 crianças saudáveis com idades entre 17 e 19 meses, de diferentes áreas

geográficas dos E.U.A.. Um mês após a vacinação, na amostra total, o T.G.M. mostrou um aumento de 0,17  $\mu\text{g/ml}$  (pré-vacinação) para 7,3  $\mu\text{g/ml}$ . Oitenta e nove por cento das crianças responderam com títulos iguais ou superiores a 1  $\mu\text{g/ml}$ . As 143 crianças com títulos pré-vacinação iguais ou superiores a 0,15  $\mu\text{g/ml}$  apresentaram títulos pós-vacinação significativamente mais altos do que as 170 com títulos pré-vacinação menores que 0,15  $\mu\text{g/ml}$ . Os dois grupos foram então analisados separadamente. No grupo de crianças "pré-ímmunes", não houve diferenças significativas entre os T.G.M. para as diferentes vacinas. No grupo de 170 crianças com níveis menores de 0,15  $\mu\text{g/ml}$ , houve pequenas diferenças de imunogenicidade, com as vacinas **PRP-T** e **PRP-OMP** tendendo a T.G.M. mais altos. Os autores concluem que as 4 vacinas conjugadas demonstraram ser imunogenicamente efetivas na população estudada.

GRANOFF et al. (1992) conduziram um estudo em 458 lactentes saudáveis comparando as vacinas **HbOC**, **PRP-T** e **PRP-OMP** administradas aos 2, 4 e 6 meses. Após 1 ou 2 doses, a vacina **PRP-OMP** mostrou ser a mais imunogênica das três, com a **PRP-T** como intermediária e a **HbOC** a menos imunogênica. Após a terceira dose, não houve diferenças significativas nos T.G.M. entre as 3 vacinas, e 88% a 97% dos lactentes desenvolveram títulos iguais ou superiores a 1  $\mu\text{g/ml}$ .

DECKER et al. (1992) compararam as 4 vacinas conjugadas administradas aos 2, 4 e 6 meses a 252 lactentes. A vacina **PRP-OMP** foi a única a produzir elevação significativa no T.G.M. após 2 doses, porém sem um efeito "booster" verificável na maioria das crianças. Após 3 doses, a melhor resposta foi observada com a **PRP-T** e a **HbOC**. A vacina **PRP-D** demonstrou a menor imunogenicidade do grupo em lactentes. A porcentagem de crianças a alcançar níveis iguais ou superiores a 1  $\mu\text{g/ml}$  após 3 doses foi de 29% para a **PRP-D**, 55% para a **PRP-OMP**, 75% para a **HbOC** e 83% para a **PRP-T**.

A vacina **PRP-OMP** demonstrou ser capaz de induzir os títulos mais elevados de anticorpos nas primeiras duas doses. Estas propriedades tornam seu uso especialmente promissor em populações que apresentem uma incidência significativa da doença nos primeiros seis meses. Porém, sua capacidade de desencadear um efeito "booster" nos primeiros seis meses de vida é limitada. Os títulos de anticorpos anti-**PRP** por ela induzidos tendem a cair rapidamente, sendo necessária uma dose de reforço aos 12 meses.

As vacinas **HBOC** e **PRP-T** apresentam baixa imunogenicidade na primeira dose (em torno dos 2 meses), porém têm a capacidade de desencadear um efeito "booster" a partir da segunda dose, sendo que após a terceira mais de 90% das crianças apresentam níveis protetores. Tais títulos protetores se mantêm com segurança até a dose de reforço, entre 15 e 18 meses.

Quando utilizada a partir dos dois meses de idade, a vacina **PRP-D** apresenta importantes diferenças de imunogenicidade em relação às três outras vacinas conjugadas. Níveis protetores de anticorpos são obtidos apenas em cerca de 50% dos lactentes jovens após 3 doses, enquanto para as vacinas **HbOC**, **PRP-OMP** e **PRP-T** estes níveis são alcançados em mais de 90% das crianças. Os resultados do estudo controlado com a vacina **PRP-D** no Alaska dão uma dimensão prática destas diferenças de imunogenicidade, tendo-se demonstrado baixa eficácia protetora da vacina. A razão da discrepância entre os resultados do estudo do Alaska e as altas taxas de proteção obtidas no estudo realizado com a vacina **PRP-D** na Finlândia são atribuídas, pela maioria dos pesquisadores, às diferenças epidemiológicas no risco de infecção por **Hib** entre as duas populações (WARD, 1990). GRANOFF & HOLMES (1991), ao analisarem a imunogenicidade comparativa das vacinas conjugadas, ressaltam que, apesar das diferenças de imunogenicidade serem importantes, todas as vacinas conjugadas têm a

capacidade de primoestimulação e efeito "booster", o que pode ser suficiente para conferir proteção mesmo na ausência de níveis séricos "protetores" de anticorpos.

Após os 15 meses, a imunogenicidade das quatro vacinas conjugadas já testadas mostrou-se semelhante. Uma constatação importante dos estudos comparativos neste grupo etário é de que a vacina **PRP-D** demonstrou induzir níveis mais elevados de anticorpos quando utilizada como reforço, entre os 15 e 18 meses, mesmo quando a série primária foi realizada com as vacinas **PRP-OMP**, **HbOC** ou **PRP-T** (DECKER et al., 1993).

Estudos sobre a persistência de títulos protetores mostram que as vacinas **PRP-T** e **HbOC** induzem níveis com duração significativamente mais longa do que as vacinas **PRP-OMP** e **PRP-D** (SHAPIRO & WARD, 1991).

Em ensaios experimentais, os anticorpos proporcionados por todas as vacinas conjugadas demonstraram capacidade de ativação de complemento, ação opsonofagocítica e capacidade de proteção passiva a animais inoculados com cepas de **Hib**. Houve diferenças importantes em relação à avidéz: anticorpos sintetizados após imunização com **PRP-T** e **HbOC** apresentam avidéz significativamente maior do que após imunização com **PRP-D** ou **PRP-OMP** (HETHERINGTON & RUTKOWSKI, 1990; SCHLESINGER & GRANOFF, 1992).

Estes estudos demonstram que, embora compartilhem características comuns, como antígenos "timo-dependentes", as vacinas conjugadas apresentam importantes diferenças de imunogenicidade, principalmente em lactentes jovens.

A causa das diferenças de imunogenicidade observadas entre a vacina **PRP-D** e as demais vacinas conjugadas pode, pelo menos em parte, residir na composição destes produtos. Como apresentado no quadro 1 (p. 19), há importantes diferenças de composição e estrutura química entre as vacinas conjugadas. Tais diferenças têm o

potencial de influenciar a apresentação e o processamento dos antígenos vacinais, resultando em diferenças de imunogenicidade.

De acordo com PENNEY (1987), o objetivo da pesquisa na composição e estrutura de novas vacinas semi-sintéticas deve ser a manutenção de uma apresentação do antígeno ótima com uma alta especificidade química.

O "design" imunoquímico mais apropriado para a composição de vacinas conjugadas de polissacarídes com proteínas ainda não está completamente estabelecido (DINTZIS, 1992). Em relação ao polissacáride, alguns grupos de pesquisadores defendem que compostos de baixo peso molecular (oligossacarídes), com menor número de determinantes antigênicos, seriam mais apropriados para o composto sacarídeo, quando usado como hapteno. Outros grupos consideram importante a identificação recente de que os epítomos no sacarídeo dependem do comprimento da molécula para melhor estabilização (JENNINGS, 1992). A relação proteína / sacarídeo desempenha um papel importante na apresentação do imunógeno, devendo apresentar pequenas variações. A forma de ativação química da molécula de sacarídeo para a ligação covalente com a proteína tem o potencial de influir sobre a imunogenicidade. Moléculas grandes de sacarídeos requerem conjugação através de ativação aleatória. Moléculas pequenas podem ser conjugadas através de ativação seletiva, com a conjugação ocorrendo em sítios específicos da molécula, geralmente em seus componentes terminais, diretamente entre a proteína e o sacarídeo, sem a necessidade de ligantes.

Na produção da vacina **PRP-D**, polissacarídes de alto peso molecular são ativados com brometo de cianogênio para a ligação à molécula do carreador. Esta ativação gera sítios de ligação mal definidos e pouco reproduzíveis, levando a ligações variáveis entre o polissacáride e o carreador, o que resulta em modificações químicas em ambos os antígenos. O tratamento do toxóide diftérico com formaldeído pode alterar a

composição do carreador de maneira imprevisível, aumentando ainda mais a heterogeneidade do componente proteico. Os grupos ligantes, compostos de dihidrazida adípica, adicionam novos componentes de toxicidade e antigenicidade desconhecida, além de diminuir a estabilidade química do produto. A vacina **PRP-D**, desta forma, tenderia a ser um produto de composição e atividade biológica variáveis (SMITH et al., 1989).

SMITH et al. (1989) postulam que, das vacinas conjugadas atualmente disponíveis, a vacina **HbOC** é a que melhor corresponde aos critérios de "design" imunológico relacionados com segurança e imunogenicidade. Destacam a ausência de ligantes entre o sacarídeo e a proteína, a estabilidade da ligação entre ambos, a proporção proteína / sacarídeo, e o emprego de uma proteína "natural" (produzida por uma cepa mutante do bacilo diftérico) que, ao contrário dos toxóides, não sofre alterações químicas em sua preparação. Sua posição, no entanto, é contestada por outros pesquisadores, e várias vacinas conjugadas encontram-se em fase de desenvolvimento (BRODEUR et al., 1992; ETLINGER, 1992; EVENBERG et al., 1992). É importante ressaltar que as vacinas **PRP-T** e **PRP-OMP** são produzidas por processo análogo ao da **PRP-D**, apresentando imunogenicidade em lactentes igual ou superior à **HbOC**.

Das 68 crianças incluídas no protocolo, 3 (4,4%) não apresentaram uma elevação mínima de duas vezes no nível de anticorpos pós-vacinação, em relação aos títulos naturais. Constatamos também que duas destas três crianças apresentavam títulos prévios próximos a níveis protetores (0,123 µg/ml e 0,977 µg/ml). Portanto, já deveriam estar naturalmente primocestimuladas, como demonstrado por HOLMES et al. (1991). Como as demais crianças incluídas no estudo, estas crianças eram previamente saudáveis e eutróficas, sem história clínica sugestiva de imunodepressão.

Em estudos de imunogenicidade com a vacina polissacarídica, crianças que não apresentavam elevação mínima de duas vezes no nível de anticorpos foram consideradas "não-responsivas". A maioria das crianças nesta categoria era previamente saudável, sem história de infecções recorrentes. Quando novamente estimuladas alguns meses após a imunização inicial, costumavam responder com a síntese de níveis normais de anticorpos. É provável que estas crianças apresentem uma maturação retardada na resposta a antígenos "timo-independentes" (WASSERMAN, 1990). A característica de "não-responsividade" foi considerada como o principal fator a explicar a ocorrência de infecções invasivas em crianças vacinadas.

HOLMES & GRANOFF (1992), estudando um grupo de crianças que desenvolveram infecção invasiva por **Hib** apesar da vacinação com **PRP**, constataram que a maioria apresentava má resposta à vacinação e níveis baixos de anticorpos mesmo após infecção natural com mais de dois anos de idade. Uma avaliação pormenorizada destas crianças não demonstrou deficiências de contagem de linfócitos, subpopulações linfocitárias ou resposta a testes de proliferação. Também não havia deficiência de subclasses de IgG neste grupo. A resposta destas crianças à imunização com o polissacaríde do pneumococo do tipo III era normal. A expressão do idiotipo Hib1d, marcador sorológico do grupo de genes responsável pela resposta ao **PRP** no ser humano, também era normal, mostrando que a falha na resposta não se devia a diferenças genéticas na capacidade de resposta ao **PRP**. Posteriormente, a vacinação destes pacientes com **PRP-D** levou a uma resposta normal de anticorpos, o que reforçou a hipótese de que a causa da má resposta ao **PRP** fosse um retardo de maturação de resposta a este imunógeno. Outra hipótese levantada foi a de tolerância transitória induzida pela vacinação com o **PRP**, um risco sempre considerado na vacinação com antígenos polissacarídicos. Em ambos os casos, a má resposta tende a ser específica,

transitória e superável pela imunização com vacinas conjugadas, pois estas promovem a liberação de linfocinas que estimulam clones de células B inicialmente não-responsivas seja por retardo de maturação ou por indução de tolerância.

Em um grupo de 25 crianças que desenvolveram infecção apesar do uso de vacina conjugada acima dos 18 meses, 10 (40%) apresentavam concentrações subnormais de imunoglobulinas, principalmente IgG2 e IgM. Nenhuma delas tinha história de infecções recorrentes. A análise dos títulos de anticorpos na fase de convalescença da infecção demonstrou que, no grupo que desenvolveu doença após os 2 anos de idade, apenas 2 crianças tinham títulos subnormais de anticorpos. A causa da má resposta a vacinas conjugadas em crianças normais não está plenamente esclarecida, mas estes resultados sugerem um retardo na maturação do sistema imune ou uma disfunção na resposta de algum isótipo, como a IgM (CHACKO & GRANOFF, 1990).

Crianças portadoras de anemia falciforme, atresia de vias biliares, neoplasias malignas sob terapia imunossupressiva, transplante de medula óssea e imunodeficiências congênitas apresentam baixos níveis de anticorpos após vacinação com PRP. Estas crianças respondem com níveis séricos protetores de anticorpos ao uso de vacinas conjugadas, embora com títulos geométricos médios menores que em crianças saudáveis (WEINBERG & GRANOFF, 1990; KAPLAN et al., 1992; RUBIN et al., 1992).

Em nosso estudo, o título geométrico médio de anticorpos anti-PRP após vacinação mostrou-se mais alto no grupo de crianças com níveis pré-vacinação naturalmente protetores (7,75 µg/ml versus 2,47 µg/ml). Tal diferença, no entanto, não mostrou significância estatística, embora a possibilidade de uma associação ao acaso tenha ficado próxima a 5% ( $P = 0,07$ ). Adicionalmente, a porcentagem de crianças a atingir títulos pós-vacinais acima de 1 µg/ml foi maior no grupo com títulos naturais

acima de 0,15 µg/ml (100% versus 70,7%, P = 0,05). Provavelmente, com uma amostra maior de pacientes, as diferenças entre os dois grupos fossem melhor caracterizadas, pois as crianças com títulos protetores prévios devem estar naturalmente primoestimuladas, tendo condições de apresentar efeito "booster" após a imunização. HOLMES et al. (1991), em estudo comparativo com vacinas conjugadas, demonstraram nítida associação entre títulos prévios acima de 0,15 µg/ml e títulos médios pós-vacinação mais altos.

O objetivo de incluirmos a variável cor da pele como parâmetro de análise de imunogenicidade foi investigar possíveis diferenças na capacidade de síntese de anticorpos anti-PRP entre diferentes etnias, conforme sugerido por pesquisadores para crianças negras norte-americanas e para crianças nativas dos grupos Apache, Navajo e Esquimó.

Em crianças brasileiras de regiões urbanas, no entanto, há dificuldades pela taxa de miscigenação relativamente alta e por não se dispor de critérios precisos para a definição de cor. Em nossa casuística, a grande predominância de crianças de cor branca não permitiu a formação de grupos que propiciassem a investigação de diferenças significativas de imunogenicidade.

Vários pesquisadores tentaram correlacionar uma série de marcadores genéticos, como o sistema HLA, tipos eritrocitários MNS, e polimorfismos no gene da enzima Uridino-monofosfato-quinase, com estados de suscetibilidade aumentada à infecção por **Hib**, sem resultados conclusivos (WARD & COCHI, 1988).

Outros marcadores, como os alótipos de imunoglobulinas, foram estudados em relação à imunogenicidade das vacinas anti-**Hib**. GRANOFF & MUNSON (1986) constataram que crianças negras norte-americanas que não expressam o alótipo Km(1) de

imunoglobulina apresentam uma menor resposta à vacina polissacáridica do que crianças negras que expressam o mesmo alótipo. Atribuíram esta diferença a uma maior capacidade de síntese de IgG2, observada nas crianças positivas para Km(1). Tais diferenças não foram constatadas em crianças brancas, em relação ao mesmo alótipo. Estes estudos, no entanto, foram realizados com um número reduzido de crianças.

Foi também estudada a influência da presença do alótipo G2m(23) sobre a resposta à vacina **PRP**. Em adultos brancos homozigotos para este alótipo, observou-se uma maior capacidade de produção de IgG2 em resposta ao **PRP**. Estas mesmas diferenças não foram observadas em crianças brancas vacinadas com a vacina **PRP** ou com vacinas conjugadas (GRANOFF & HOLMES, 1992).

Atualmente, a maioria dos pesquisadores considera que, em populações saudáveis, fatores dependentes de suscetibilidade individual do hospedeiro, relacionados a seu patrimônio genético, não sejam os responsáveis pelas principais diferenças de suscetibilidade ao **Hib** e de resposta à vacinação. São considerados mais importantes os fatores relacionados a características ambientais, como aglomeração domiciliar, desnutrição com deficiências vitamínicas e infecções recorrentes por outros patógenos, principalmente virais (ROBBINS & SCHNEERSON, 1990; MÄKELÄ et al., 1992).

Não encontramos associação entre a idade (em meses) à vacinação e os títulos geométricos médios de anticorpos, nem entre idade e taxa de aumento de títulos, embora no grupo de 15-16 meses o título geométrico médio tenha sido mais baixo do que no grupo de 17-18 meses (2,19 µg/ml versus 3,95 µg/ml,  $P = 0,12$ ). Adicionalmente, observamos que, comparando os grupos extremos de idade (15 e 18 meses), houve uma tendência a T.G.M. mais alto no grupo de 18 meses (4,57 versus 2,18,  $P = 0,07$ ) e uma diferença significativa na proporção a alcançar títulos acima de 5 µg/ml (55% versus

19,2%,  $P = 0,05$ ). Tal associação não foi encontrada em outro estudo com metodologia semelhante, este realizado com a vacina **HbOC**, em um grupo de crianças com idades de 15 a 23 meses (MADORE et al., 1990).

Estudos em lactentes jovens, com as quatro vacinas conjugadas, mostraram que a idade apresenta influência na aquisição de títulos pós-vacinais principalmente em relação à vacina **PRP-D**. Em consequência dos resultados de estudos de imunogenicidade em idades precoces, bem como da baixa proteção demonstrada no estudo populacional com lactentes no Alaska, a vacina **PRP-D** não foi liberada pela FDA para imunização primária, embora seja recomendada para esta finalidade na Europa (WARD, 1990). Após uma série de 3 doses, a vacina **PRP-D** demonstrou capacidade para o desenvolvimento de memória imunológica. Doses de reforço aos 15 meses nestas crianças levam à secreção de altos títulos de anticorpos, quer seja com **PRP-D** ou com **PRP-T**. Independentemente da vacina usada na série primária, o reforço com **PRP-D** propicia altos títulos de anticorpos (DECKER et al., 1993).

Baseados em nossos resultados e nos dados da literatura, consideramos que a vacinação com **PRP-D** pode também em crianças brasileiras ser realizada aos 15 meses, para primovacinação ou reforço, com previsão de imunogenicidade satisfatória.

Comparando os grupos de crianças imunizadas em relação à frequência a creches, nossa análise mostrou importantes diferenças de imunogenicidade. Os títulos geométricos médios, a magnitude de aumento de títulos e a proporção de crianças a alcançar títulos acima de 5  $\mu\text{g/ml}$  e 10  $\mu\text{g/ml}$  foram significativamente inferiores no grupo que frequentava creches. Adicionalmente, as únicas duas crianças que não alcançaram títulos protetores após a vacinação e as únicas três crianças consideradas "não-responsivas" pertenciam ao grupo de creche. Não foram detectadas diferenças

significativas entre os dois grupos em relação a idade, presença de títulos protetores prévios ou número de moradores no domicílio, fatores estes que poderiam potencialmente influenciar a aquisição natural ou pós-vacinal de anticorpos anti-PRP.

Em revisão da literatura não encontramos nenhum estudo que, ao analisar títulos de anticorpos anti-PRP, levasse em consideração a frequência a creche como fator de possível influência sobre a imunogenicidade das vacinas. Decidimos incluir esta variável por duas razões: nos últimos anos, um número progressivamente maior de crianças se encontra aos cuidados destas instituições, e a frequência a creches é um fator de risco para infecções por Hib determinado em estudos epidemiológicos (TAKALA & CLEMENS, 1992).

Pelas próprias características do ambiente, as crianças em creches têm um potencial para a exposição a agentes infecciosos semelhantes à de uma grande família. As práticas higiênicas das crianças e dos profissionais destas instituições, as instalações sanitárias, os procedimentos de manipulação de alimentos, o espaço físico, a idade das crianças e sua proporção em relação ao número de profissionais, são todos fatores que podem afetar a incidência de infecções. Já está comprovado que além do Hib, outros agentes infecciosos, como bactérias enteropatogênicas e vírus infectantes de vias aéreas, têm sua transmissão facilitada no ambiente das creches. Patógenos virais comprovadamente podem afetar a função linfocitária, com potencial para prejudicar a síntese de anticorpos. Experimentalmente, tal efeito já foi demonstrado em relação aos vírus do sarampo, rubéola, influenza e aos vírus do grupo herpes (CASALI et al., 1984). Além deste mecanismo, lesões na mucosa de vias aéreas induzidas por vírus respiratórios podem afetar a modulação da resposta imune a antígenos que tenham contato com as mucosas (BRANDTZAEG, 1992). Desta forma, infecções virais frequentes podem

influenciar a resposta a antígenos vacinais, determinando diferenças na imunogenicidade destes antígenos.

No grupo de crianças que freqüentavam creches, 38% (11 em 29) apresentaram intercorrências infecciosas, na grande maioria virais, no período de 1 mês antes ou após a vacinação. No grupo de crianças mantidas em casa, este percentual foi de 18% (7 em 39). As diferenças entre os grupos neste aspecto, porém, não foram significativas ( $P = 0,07$ ). Também não foi possível demonstrar a influência da história de infecções 30 dias antes ou após a vacinação sobre os títulos geométricos pós-vacinais, tanto na população geral do estudo como nos grupos de crianças mantidas em creches ou no domicílio.

Os achados de um estudo realizado em crianças da nação Apache, nos Estados Unidos, podem fornecer importantes subsídios para a análise das diferenças de imunogenicidade da vacina em crianças de creche. Crianças nativas americanas apresentam risco mais alto de infecções por **Hib**, além de outras infecções respiratórias e entéricas. Comparadas com a população infantil norte-americana, estas crianças vivem em ambientes com maior aglomeração de pessoas, as chamadas "famílias estendidas", com vários membros da mesma e de outras famílias em um domicílio. Também apresentam uma incidência mais alta de desnutrição.

SIBER et al. (1990) administraram a vacina **PRP** a um grupo de crianças apaches aos 18 e 24 meses e a crianças brancas de idade similar. As crianças apaches apresentavam um título natural de anticorpos duas vezes menor. Após a vacinação, apresentavam um título médio de anticorpos dez vezes menor e uma taxa de elevação de títulos cinco vezes menor. A proporção de crianças a atingirem títulos acima de 0,15  $\mu\text{g/ml}$  e de 1  $\mu\text{g/ml}$  também foi significativamente menor em crianças apaches. As concentrações de IgG, IgM e IgA específicas também foram menores. Também foi

constatada a presença de títulos significativamente mais baixos de anticorpos anti-toxóide diftérico nas crianças indígenas. A análise das concentrações de IgM, IgG e IgA totais mostrou que as crianças apaches tinham níveis significativamente mais altos do que as crianças brancas, com exceção de IgG2 e IgG4, que eram mais baixos. Os únicos marcadores genéticos de imunoglobulinas comparados entre as duas populações, os alótipos Km(1) e G2m(n), não demonstraram influir significativamente nos níveis de anticorpos. Os autores sugerem a hipótese de que as crianças apaches poderiam apresentar uma imunodeficiência associada com uma diminuição de resposta a antígenos T-independentes, como o **PRP**, e com uma diminuição provavelmente mais leve na resposta a antígenos proteicos, como o toxóide diftérico. Ao considerar os possíveis mecanismos para tais diferenças, é comentada a possibilidade de que fatores epidemiológicos, como condições de vida e nutrição, possam ser importantes. Embora diferenças genéticas no potencial de síntese de anticorpos também tenham sido consideradas, nenhum estudo de marcadores genéticos até o momento mostrou diferenças significativas entre crianças nativas e crianças brancas (PETERSEN et al., 1987).

Considerando a possibilidade de estabelecer uma analogia entre crianças nativas norte-americanas e as crianças em creches, devido à característica comum da exposição precoce a uma carga antigênica aumentada, a menor imunogenicidade da vacina **PRP-D** em nosso estudo poderia se dever a uma deficiência de resposta tanto ao carreador (o toxóide diftérico) como ao hapteno (o **PRP**).

Outro aspecto a ser discutido é a possibilidade que uma exposição intensa aos antígenos do **Hib** ou a antígenos de reação cruzada presentes em outros patógenos, através da mucosa respiratória ou intestinal, tenha o potencial de alterar mecanismos moduladores da síntese de anticorpos a antígenos administrados por via parenteral.

Segundo ROSALES et al. (1984), através do mecanismo de tolerância oral, a colonização de superfícies mucosas com bactérias inibiria o desenvolvimento de anticorpos circulantes contra os antígenos colonizantes, possivelmente por ativação seletiva de células T supressoras em mucosas que migrariam para o baço e suprimiriam a produção de IgM e IgG específicas, mas não IgA. Como a tolerância oral é limitada ao lactente, este fenômeno de supressão desapareceria com a maturação. Alternativamente, a produção de anticorpos antipolissacarídicos no tecido linfóide de mucosa poderia ser regulada por um mecanismo separado do tecido linfóide sistêmico.

Sugerimos a hipótese de que, em consequência de uma exposição precoce e intensa a diferentes antígenos em mucosas respiratórias e entéricas, crianças que frequentam creches possam apresentar uma resposta de anticorpos diminuída a determinados antígenos vacinais. Os mecanismos para tal diferença de resposta podem envolver as consequências de infecções frequentes, principalmente virais, ou fenômenos de tolerância. Sugerimos que a frequência a creches seja incluída como variável em futuros estudos de imunogenicidade de vacinas, e, caso as diferenças de imunogenicidade sejam confirmadas em outros estudos, sejam realizados estudos dos níveis de imunoglobulinas totais e específicas, incluindo suas subclasses.

Um aspecto merece ser considerado: a consequência das diferenças de imunogenicidade de vacinas em crianças de creches sobre sua eficácia. No caso específico da imunização contra o **Hib**, este impacto provavelmente seria muito pequeno, pois o esquema atual com o uso de três doses de vacinas conjugadas em lactentes seguidas de reforço entre os 12 e 18 meses já demonstrou ser imunogênico e eficaz em estudos populacionais.

Não observamos em nosso estudo uma associação significativa entre o tempo de aleitamento materno e os títulos de anticorpos anti-PRP pós-vacinação, a não ser pelo achado de que, no grupo de crianças amamentadas por mais de seis meses, uma proporção maior (33,3% versus 13,2%,  $P = 0,05$ ) ter apresentado títulos maiores ou iguais a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

PABST & SPADY (1990) mostraram, em lactentes imunizados com a vacina **HbOC**, que aqueles alimentados com leite materno por um período mínimo de um mês apresentaram níveis de anticorpos significativamente mais altos após 3 doses da vacina em relação aos alimentados exclusivamente por fórmula (29,8  $\mu\text{g/ml}$  versus 17,5  $\mu\text{g/ml}$ ,  $P < 0,04$ ). Não havia diferenças significativas nos títulos pré-vacinais. Embora as diferenças de imunogenicidade mostradas neste estudo tenham sido verificadas apenas em lactentes jovens após uma série primária de vacina conjugada, consideramos a hipótese de que os efeitos imunorreguladores do leite materno poderiam ter levado a uma primoestimulação natural, com conseqüências duradouras. Apenas 25% das crianças de nossa casuística foram amamentadas por menos de três meses. Mesmo este tempo relativamente curto de aleitamento pode ter proporcionado uma estimulação imune de longa duração.

No intervalo de 14 dias antes ou após a imunização com **PRP-D**, não encontramos associação entre nenhum dos parâmetros de imunogenicidade estudados e a administração de vacina anti-sarampo.

A imunodepressão que acompanha a infecção natural pelo vírus do sarampo é bem conhecida dos clínicos, e demonstrada em estudos clínicos e experimentais. O vírus do sarampo tem a capacidade de infectar linfócitos, sem alterar sua sobrevivência, mas afetando a atividade de células "natural killer" e inibindo a síntese de imunoglobulinas (CASALI et al., 1984). É válido considerar-se a possibilidade de que o vírus vacinal

atenuado, possa, em menor grau do que o vírus "selvagem", influir na síntese de anticorpos dirigidos a outros antígenos. Caso tal efeito fosse confirmado, poderia haver problemas no esquema de vacinação, com a impossibilidade da administração simultânea ou próxima entre as vacinas anti-sarampo e anti-**Hib**.

DASHEFSKY et al. (1990) compararam o efeito da administração simultânea, em sítios diferentes, das vacinas **PRP-OMP** e tríplice viral. Não foram encontradas diferenças nos títulos de anticorpos anti-**PRP** nem na seroconversão para sarampo, caxumba e rubéola entre o grupo de crianças que recebeu ambas as vacinas simultaneamente e o grupo que recebeu tríplice viral um mês antes ou após a **PRP-OMP**. Não encontramos em revisão da literatura estudos semelhantes para as outras três vacinas conjugadas. O Comitê de Doenças Infecciosas da ACADEMIA AMERICANA DE PEDIATRIA (1990), ao recomendar o uso das vacinas conjugadas aos 15 meses, em novembro de 1990, liberou a administração simultânea das vacinas conjugadas com a vacina tríplice viral, embora reconhecendo que não havia testes de imunogenicidade para todas as vacinas nestas condições.

Na comparação entre os grupos de crianças que receberam a vacina DPT num intervalo de 14 dias antes ou após a administração de **PRP-D** e aquelas que não a receberam, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros de imunogenicidade avaliados.

Decidimos avaliar a possibilidade da interação entre as duas vacinas devido ao fenômeno, relatado de forma geral para vacinas conjugadas, de "primoestimulação pelo carreador". Este fenômeno consiste na intensificação da resposta de anticorpos para o hapteno de uma vacina conjugada administrada após a imunização prévia com a proteína carreadora isolada (WEINBERG & GRANOFF, 1988). Existem, no entanto,

controvérsias sobre as conseqüências da administração prévia deste componente. Segundo alguns autores, este efeito é variável, podendo até mesmo ser inibitório (ETLINGER, 1992).

A importância da "primoestimulação pelo carreador" foi confirmada experimentalmente para as vacinas conjugadas anti-**Hib**. SCHNEERSON et al. (1984); VELLA & ELLIS (1991) demonstraram, em filhotes de macacos Rhesus, que tanto as vacinas **PRP-T** como **HbOC** apenas proporcionavam respostas significativas de anticorpos anti-**PRP** e efeito "booster" quando administradas simultaneamente com os toxóides tetânico e diftérico, respectivamente. BARRINGTON et al. (1991), em um estudo com a vacina **PRP-D** em adultos, concluíram que após a imunização tanto a magnitude como a cinética da resposta de células B anti-polissacáride são influenciadas pelo estado imunitário prévio em relação à molécula do carreador. Já a vacina **PRP-OMP** foi capaz de levar à síntese de níveis significativos de anticorpos anti-**PRP** após a primeira dose mesmo em filhotes de macacos Rhesus não-primoestimulados, sendo encontrado efeito "booster" após a segunda e terceira imunizações (VELLA & ELLIS, 1991). A principal conseqüência prática destas diferenças seria que, em populações de alto risco para infecção por **Hib** em idades precoces, a vacina **PRP-OMP** poderia ser o agente imunizante de escolha. Adicionalmente, em crianças nas quais o uso dos toxóides diftérico ou tetânico fosse contraindicado, talvez o imunógeno mais indicado fosse a vacina **PRP-OMP**. Esta última situação, no entanto, é bastante rara na população geral.

A ausência do fenômeno de "primoestimulação pelo carreador" na imunização com a vacina **PRP-OMP** reforça a constatação de que, ao invés de comportar-se exclusivamente como um antígeno "timo-dependente" o carreador (complexo proteico da membrana externa do meningococo do grupo B, não totalmente purificado, podendo também conter lipopolissacárides) comporta-se também como um antígeno "timo-

independente do tipo I" (STEIN, 1992). Graças a estas características, a imunização com **PRP-OMP** em lactentes jovens proporciona os títulos mais altos de todas as vacinas conjugadas após a primeira dose. No entanto, a magnitude do efeito "booster" e a persistência a longo prazo de anticorpos protetores após a primoimunização com esta vacina em lactentes é inferior ao observado com as vacinas **HbOC** e **PRP-T** (DECKER et al., 1993).

O comportamento como antígeno "timo-independente do tipo I" do carreador proteico da **PRP-OMP** também pode explicar uma importante diferença em sua atividade funcional. SCHLESINGER & GRANOFF (1992), após vacinação de um grupo de lactentes aos 2, 4 e 6 meses com **PRP-OMP**, **HbOC** e **PRP-T**, demonstraram que os anticorpos sintetizados a partir da administração de **PRP-OMP** apresentaram avidéz significativamente menor em relação aos sintetizados após imunização com **HbOC** e **PRP-T**. A avidéz mais baixa mostrou-se, no mesmo estudo, relacionada com menor atividade bactericida mediada por complemento. Os mesmos resultados foram obtidos em um grupo de crianças primoimunizadas com **PRP-OMP** ou **HbOC**.

A avaliação indireta do fenômeno de "primoestimulação pelo carreador" em nossa casuística, através de diferenças no título de anticorpos anti-**PRP**, foi certamente prejudicada pelo fato de as crianças de ambos os grupos já haverem recebido ao menos três doses do toxóide diftérico como parte do esquema de vacinação com DPT aos 2, 4 e 6 meses de idade.

Uma outra consideração importante ao analisarmos a interação entre componentes das vacinas conjugadas anti-**Hib** e da vacina DPT é a possibilidade de administração conjunta de ambas em uma mesma injeção, com o uso da mesma seringa. Tal procedimento proporcionaria importante economia de recursos, uma vez que as idades de imunização com os dois preparados são as mesmas. Também o desconforto

para as crianças vacinadas e o risco de complicações teriam o potencial de diminuir, com a diminuição do número de injeções.

WATEMBERG et al. (1991), em lactentes israelenses, constataram que a administração conjunta de **PRP-T** e DPT, comparada a DPT e placebo, demonstrou em relação a anticorpos anti-**PRP** imunogenicidade semelhante a outros estudos com o uso da **PRP-T** isolada. Não foi também afetada a resposta de anticorpos aos toxóides tetânico e diftérico e às aglutininas da *B. pertussis*.

FERRECIO et al. (1991) conduziram um estudo em lactentes chilenos, com a formação de três grupos. Os grupos foram designados para receberem três doses de **PRP-T** e DPT simultaneamente mas em locais diferentes, **PRP-T** e DPT misturados na mesma seringa e DPT e placebo. Em relação à resposta anti-**PRP**, tanto o grupo que recebeu **PRP-T** e DPT separadas quanto o que recebeu as vacinas na mesma seringa apresentou porcentagens semelhantes de obtenção de títulos protetores. Porém, o título geométrico médio de anticorpos anti-**PRP** foi significativamente mais baixo no grupo que recebeu as duas vacinas na mesma seringa. Nos mesmos grupos de crianças, CLEMENS et al. (1992) analisaram a resposta de anticorpos aos toxóides tetânico e diftérico e às aglutininas da *B. pertussis*. Constataram que a administração concorrente da vacina **PRP-T** com DPT, na mesma seringa ou em locais separados, levou a uma menor seroconversão para os antígenos de *B. pertussis*. Embora o significado clínico destas diferenças de resposta não esteja determinado, os resultados apontam a necessidade de avaliação cuidadosa do uso simultâneo das vacinas. A resposta para os toxóides tetânico e diftérico não foi alterada.

Em suma, novos estudos prospectivos são necessários para caracterizar a possibilidade de interação biológica entre os componentes de vacinas conjugadas anti-**Hib** e componentes das vacinas do tipo DPT, até que se possa concluir que a

combinação de ambos numa mesma via, operacionalmente desejável, se revele segura e imunogênica. É importantíssimo também confirmar com ensaios clínicos a possibilidade de que mesmo a administração separada, mas simultânea, das duas vacinas, interfira com a imunogenicidade de algum de seus componentes.

Investigamos a possibilidade de associação entre número de moradores no domicílio e presença de irmãos em creche ou pré-escola com a resposta à vacinação com **PRP-D** por serem estas variáveis associadas a um maior risco de infecção por **Hib** em estudos epidemiológicos (TAKALA & CLEMENS, 1992). Não encontramos associação entre nenhum dos parâmetros de imunogenicidade avaliados e o número de moradores na casa ou a presença de irmãos em creche ou pré-escola. Vale ressaltar que a média de moradores por domicílio em nossa casuística foi relativamente baixa (média de 4,5 pessoas), o que pode ter influenciado na análise dos resultados. Apenas 12 crianças residiam em domicílios com mais de 5 moradores.

O título geométrico médio após a vacinação foi mais alto no grupo de crianças de domicílios com 5 ou mais moradores. No entanto, tais diferenças não demonstraram significância estatística. Estes dados sugerem que tais crianças já poderiam estar naturalmente primoestimuladas, o que corresponderia ao fato de termos encontrado, conforme discutido ao comentarmos a imunidade natural, títulos médios e proporção de títulos protetores mais altos nas crianças deste grupo.

A incidência de reações locais ou sistêmicas após a vacinação com **PRP-D** foi bastante baixa em nossa casuística. A reação adversa mais comum foi a irritabilidade (em oito casos, ou 11,8%). Apenas duas crianças (2,9%) apresentaram temperatura acima de

37,8 °C. O único caso de erupção cutânea registrado ocorreu 11 dias após vacinação com triplice viral, não permitindo uma associação de causa com a vacinação com **PRP-D**.

No seu conjunto, as vacinas conjugadas demonstraram ser bastante seguras. A avaliação de sua reatogenicidade é dificultada pelo fato de, freqüentemente, serem administradas concomitantemente à vacina DPT.

Em 230.000 doses da vacina **PRP-D** administradas em estudo populacional na Finlândia, houve notificação de apenas 31 casos de reações adversas consideradas clinicamente importantes. Não houve reações anafiláticas, mortes ou seqüelas permanentes (ESKOLA et al., 1990).

VADHEIM et al. (1990), analisaram em um estudo prospectivo a segurança da vacina **PRP-D** administrada a quase 30.000 crianças de 18 a 60 meses de idade na Califórnia, entre abril de 1988 e julho de 1989. O acompanhamento se deu em dois períodos: 48 horas e 30 dias após a imunização. A incidência de reações locais ou sistêmicas foi bastante baixa. Cerca de 2% das crianças apresentaram temperatura acima de 38 °C nas primeiras 48 horas. As incidências de eritema, edema e dor local nas primeiras 48 horas foram de 2%, 2% e 25%, respectivamente. O uso simultâneo de DPT e **PRP-D** não aumentou a reatogenicidade além daquela verificada com a DPT isolada. Houve 44 internações hospitalares e 29 casos de convulsão no grupo de crianças vacinadas nos 30 dias após a imunização, por causas que não puderam ser atribuídas à vacinação. Uma criança de 29 meses apresentou um episódio fulminante de septicemia por **Hib** com início 24 horas após a vacinação.

Em cerca de 600 lactentes que receberam **PRP-D** num ensaio nos E.U.A., houve uma incidência de 4,5% de eritema local, 9,3% de irritabilidade e 0,5% de casos de temperatura acima de 38 °C (LEPOW, 1987).

Após o licenciamento da vacina **PRP-D** nos E.U.A., foram relatados 3 casos de Síndrome de Guillain-Barré cuja sintomatologia havia iniciado em torno de 1 semana após a vacinação. O número de pacientes acometidos, no entanto, foi insuficiente para se estabelecer uma relação de causalidade (CRUZ et al., 1989).

Os diversos estudos clínicos e a experiência de uso rotineiro com as vacinas **HbOC**, **PRP-OMP** e **PRP-T** demonstraram padrão semelhante de reatogenicidade e segurança (SANTOSHAM et al., 1991; BLACK et al., 1992; FRITZELL & PLOTKIN, 1992).

A análise da experiência internacional e de nossos dados nos permite concluir que, no seu conjunto, as vacinas conjugadas são seguras, com amplas perspectivas de uso também em crianças brasileiras.

## 6. CONCLUSÕES

Considerando a população estudada e os métodos utilizados podemos concluir que:

O nível natural de anticorpos séricos anti-**PRP** na população estudada foi baixo. Na faixa etária de 15 a 19 meses, a minoria (14,7%) apresentou níveis séricos considerados protetores (acima de 0,15 µg/ml).

Crianças residentes em domicílios com mais de 5 moradores tenderam a ter títulos naturais protetores com maior frequência (33,7% versus 10,7%,  $P = 0,05$ ).

A vacinação com **PRP-D** promoveu um aumento significativo dos títulos de anticorpos anti-**PRP**, tanto em relação ao Título Geométrico Médio como em relação à proporção de crianças a alcançarem níveis considerados protetores.

Houve associação significativa entre o título de anticorpos anti-**PRP** após a vacinação e:

- Títulos naturais de anticorpos acima de 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (o grupo de crianças com títulos naturais protetores apresentou uma proporção maior a alcançar títulos superiores a 1  $\mu\text{g/ml}$ );

- Idade (as crianças de 18 ou mais meses apresentaram uma proporção maior de títulos superiores a 5  $\mu\text{g/ml}$ , em relação às de 15 meses);

- Frequência a creche (as crianças que freqüentavam creche apresentaram título geométrico médio e razão de aumento de títulos inferiores, bem como menor proporção de crianças com títulos superiores a 5  $\mu\text{g/ml}$  e 10  $\mu\text{g/ml}$ ).

A vacina **PRP-D** mostrou-se segura, com baixa reatogenicidade na população estudada.

## **7. ANEXOS**

## **7.1. ANEXO A**

### **CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO**

## ANEXO A.

Tab. 17 - Principais Características da População de Estudo:

ORDEM	IDADE (M.)	SEXO	COR	CRECHE	CIDADE	TIT. PRE	TIT. POS	LOTE	LEITE MAT. (M)	INT. A.-S.	INT. DPT	PESSOAS/ CASA	IRMÃOS/ CRECHE
1	18	M	B	N	C	3,07	110	1	> 12	> 15 D	> 15 D	4	N
2	19	F	B	N	C	0,06	48,3	1	4-6	> 15 D	> 15 D	6	N
3	17	M	B	S	C	0,06	0,275	1	> 12	> 15 D	> 15 D	3	N
4	17	M	B	N	C	0,06	14,7	1	10-12	> 15 D	> 15 D	4	N
5	18	F	A	N	C	0,06	6,84	1	10-12	> 15 D	> 15 D	4	N
6	18	M	B	N	C	0,06	2,8	1	1-3	> 15 D	> 15 D	4	N
7	17	M	P	S	C	0,06	0,721	2	7-9	> 15 D	> 15 D	4	N
8	18	F	B	N	C	0,06	6,56	2	7-9	> 15 D	> 15 D	4	N
9	15	F	A	S	C	0,06	4,08	2	7-9	> 15 D	> 15 D	5	S
10	19	M	B	S	C	0,06	14,6	2	> 12	> 15 D	> 15 D	5	N
11	18	M	B	N	C	0,06	11,8	2	> 12	> 15 D	> 15 D	4	N
12	17	M	A	S	C	0,977	1,53	2	7-9	> 15 D	> 15 D	4	N
13	19	M	B	S	C	0,06	1,31	2	7-9	> 15 D	> 15 D	3	N
14	15	M	B	S	C	0,06	1,56	2	10-12	> 15 D	> 15 D	3	N
15	19	F	B	N	C	0,06	11,2	2	7-9	> 15 D	> 15 D	5	N
16	18	M	B	N	C	0,06	1,35	2	7-9	> 15 D	> 15 D	4	S
17	18	M	B	N	C	0,06	18,1	2	4-6	> 15 D	> 15 D	4	S
18	15	M	B	N	C	0,06	7,71	2	< 1	> 15 D	> 15 D	5	S
19	15	M	B	S	C	0,123	0,231	2	1-3	≤ 15 D	≤ 15 D	4	N
20	15	M	B	N	C	0,06	2,35	2	> 12	≤ 15 D	≤ 15 D	6	N
21	15	F	B	N	C	0,06	4,91	2	4-6	> 15 D	> 15 D	5	N
22	15	M	P	S	C	0,06	1,69	2	7-9	> 15 D	> 15 D	4	S
23	15	M	B	N	C	0,06	0,6	2	4-6	> 15 D	> 15 D	4	S
24	15	M	B	N	C	0,06	4,38	2	1-3	> 15 D	> 15 D	3	N
25	16	M	P	S	C	0,06	2,33	2	1-3	> 15 D	> 15 D	5	N
26	18	M	B	N	C	0,06	2,71	2	4-6	≤ 15 D	> 15 D	4	N
27	15	M	B	N	C	0,06	21,1	2	7-9	> 15 D	> 15 D	3	N
28	19	F	B	S	C	0,06	0,55	2	7-9	> 15 D	> 15 D	5	N
29	18	M	B	S	C	0,126	11,5	2	10-12	≤ 15 D	> 15 D	3	N
30	16	M	B	S	P	0,06	0,309	2	7-9	> 15 D	> 15 D	3	N
31	15	F	B	N	P	0,551	31,4	2	> 12	≤ 15 D	≤ 15 D	8	N
32	15	M	B	S	P	0,06	1,3	2	< 1	≤ 15 D	≤ 15 D	5	N
33	15	M	B	N	P	0,06	0,62	2	4-6	≤ 15 D	≤ 15 D	7	N
34	16	F	B	N	P	0,06	5,52	2	4-6	> 15 D	> 15 D	4	N

Legenda:

N = NÃO — S = SIM — M = MASCULINO — F = FEMININO — B = BRANCA — A = AMARELA — P = PARDA — N = NEGRA — P = PAULÍNIA — C = CAMPINAS  
 LOTE 1 = 0A21133 — LOTE 2 = 5121P36

Tab. 17 (cont.) - Principais Características da População de Estudo:

ORDEM	IDADE (M)	SEXO	COR	CRECHE	CIDADE	TIT. PRÉ	TIT. POS	LOTE	LEITE MAT. (M)	INT. A. - S	INT. DPT	PESSOAS / CASA	IRMÃOS / CRECHE
35	15	M	B	N	P	0,06	0,968	2	4-6	> 15 D	> 15 D	3	N
36	17	M	B	S	P	0,06	3,25	2	4-6	> 15 D	> 15 D	3	N
37	17	F	B	N	P	0,06	5,1	2	< 1	> 15 D	> 15 D	8	N
38	15	F	P	N	P	0,06	0,2	2	4-6	> 15 D	> 15 D	3	N
39	17	F	B	N	P	0,208	2,13	2	1-3	> 15 D	> 15 D	3	N
40	17	F	B	N	P	0,06	43,8	2	> 12	> 15 D	> 15 D	3	S
41	15	F	B	N	P	0,06	3,57	2	> 12	> 15 D	> 15 D	4	S
42	17	F	B	S	P	0,06	0,605	2	4-6	> 15 D	> 15 D	4	N
43	16	M	B	N	P	0,06	0,292	2	1-3	> 15 D	> 15 D	3	N
44	16	F	P	S	P	0,06	0,106	2	4-6	> 15 D	> 15 D	4	N
45	17	M	B	N	P	0,06	31,6	2	7-9	> 15 D	> 15 D	4	N
46	16	M	B	S	P	0,06	5,1	2	4-6	≤ 15 D	> 15 D	3	N
47	18	M	B	S	P	0,06	0,137	2	10-12	> 15 D	> 15 D	4	N
48	17	F	P	N	P	0,257	4,55	2	> 12	> 15 D	> 15 D	8	N
49	18	F	B	N	P	0,06	0,991	2	> 12	> 15 D	> 15 D	4	N
50	18	F	P	S	P	0,06	2,92	2	> 12	> 15 D	> 15 D	3	N
51	18	F	B	S	P	0,157	1,99	2	4-6	> 15 D	> 15 D	4	S
52	15	F	P	N	P	0,155	2,06	2	< 1	≤ 15 D	≤ 15 D	5	N
53	16	M	N	N	P	1,67	26,8	2	1-3	> 15 D	> 15 D	9	N
54	17	F	B	S	P	0,06	5,33	2	4-6	> 15 D	> 15 D	5	N
55	15	F	B	N	P	0,06	1,64	2	1-3	> 15 D	> 15 D	9	N
56	15	M	B	N	P	0,06	1,91	2	1-3	> 15 D	> 15 D	3	N
57	15	M	B	S	P	0,06	0,343	2	4-6	> 15 D	> 15 D	6	N
58	16	F	B	N	P	0,343	5,29	2	4-6	> 15 D	> 15 D	5	S
59	17	M	B	N	P	0,06	0,89	2	4-6	> 15 D	> 15 D	3	N
60	15	F	B	N	P	0,06	5,13	2	4-6	≤ 15 D	> 15 D	4	N
61	15	M	B	S	P	0,06	0,64	2	1-3	≤ 15 D	> 15 D	6	S
62	15	M	B	S	P	0,06	2,77	2	1-3	≤ 15 D	> 15 D	6	S
63	15	M	B	N	P	0,3	26,4	2	4-6	> 15 D	> 15 D	8	S
64	18	F	B	N	P	0,06	5,66	2	4-6	≤ 15 D	> 15 D	4	N
65	18	M	B	S	P	0,06	5,34	2	1-3	≤ 15 D	> 15 D	3	N
66	15	M	B	S	P	0,06	3,73	2	7-9	≤ 15 D	≤ 15 D	3	N
67	15	M	P	S	P	0,06	1,38	2	7-9	≤ 15 D	≤ 15 D	5	N
68	16	M	B	S	P	0,06	16,8	2	1-3	≤ 15 D	≤ 15 D	3	N

Legenda:

N = NÃO --- S = SIM --- M = MASCULINO --- F = FEMININO --- B = BRANCA --- A = AMARELA --- P = PARDA --- N = NEGRA --- P = PAULÍNIA --- C = CAMPINAS  
 LOTE 1 = 0A21133 --- LOTE 2 = 5121P36

## **7.2. ANEXO B**

### **PROTOCOLO CLÍNICO**

# Vacina PRP-D

## Ficha Individual

### Dados Pessoais

Nome: \_\_\_\_\_ Reg: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Número de pessoas na mesma casa: \_\_\_\_\_ Número de cômodos da casa: \_\_\_\_\_

Número de pessoas que dormem no mesmo cômodo da criança: \_\_\_\_\_

Frequenta creche? \_\_\_\_\_ Horas/dia: \_\_\_\_\_ Dias/semana: \_\_\_\_\_

Tem irmãos menores de 5 anos em creche ou pré-escola? \_\_\_\_\_

Idade	Horas/dia	Dias/semana

Renda familiar: Cr\$ \_\_\_\_\_

### Aleitamento materno?

Exclusivo: \_\_\_\_\_ De \_\_\_ a \_\_\_ meses

Misto: \_\_\_\_\_ De \_\_\_ a \_\_\_ meses

### Idade gestacional ao nascimento:

A termo? \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ semanas

Pré-termo? \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ semanas

Peso ao nascer: \_\_\_\_\_ gramas

**História Médica**

	Sim	Não
Seu filho esteve com boa saúde desde nossa última visita? Se não, descreva que problemas ocorreram:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<hr/>		

Seu filho já teve alguma doença grave que necessitasse hospitalização? Se sim, descreva:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<hr/>		

Seu filho recebeu alguma transfusão de sangue ou usou imunoglobulina nos últimos 3 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
---	--------------------------	--------------------------

**Verificação Pré-imunização**

Seu filho está doente hoje?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Seu filho teve febre hoje?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Seu filho tem alergia a ovo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sim Não

Seu filho está tomando algum medicamento? Se sim, por favor descreva:

---

---

---

---

---

☞ A imunização será adiada se a criança tiver febre ou alguma doença aguda.

### Dados do Dia da Vacinação

Idade: \_\_\_\_\_ meses

Peso: \_\_\_\_\_ Percentil: \_\_\_\_\_

Estatura: \_\_\_\_\_ Percentil: \_\_\_\_\_

Peso para a estatura, percentil: \_\_\_\_\_

Vacinação básica completa? \_\_\_\_\_

Se incompleta, discriminar:

---

---

---

---

---

Data em que recebeu a última dose das vacinas:

Anti-sarampo: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

MMR: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Tríplice: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Pólio: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Imunização com PRP-D**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora: \_\_\_:\_\_\_ Lote: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ ml

Local de vacinação: \_\_\_\_\_

Vacinas dadas simultaneamente:

Tipo	Fabricante	Lote	Validade	Local

Pessoa que aplicou a vacina: \_\_\_\_\_

- |  | Sim                      | Não                      |
|--|--------------------------|--------------------------|
| Foi observada alguma reação adversa nos primeiros 15 minutos após a vacinação? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Foi colhido sangue pré-vacinação?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Foi colhida cultura de orofaringe?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**Observações 48 Horas Após a Imunização**

Seu filho apresentou algum sinal de doença nas 48 horas após a imunização?  Sim  Não  
 Caso sim, descreva:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Foi diagnosticada por médico?  Sim  Não

	Sim	Não
Após 24 horas havia vermelhidão no local da injeção? Se sim, qual o tamanho? _____ mm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Após 48 horas havia vermelhidão no local da injeção? Se sim, qual o tamanho? _____ mm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Após 24 horas havia inchaço no local da injeção?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Após 48 horas havia inchaço no local da injeção?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Após 24 horas o local da injeção estava dolorido?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Após 48 horas o local da injeção estava dolorido?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Se sim, como era a dor?		
<input type="checkbox"/> Leve		
<input type="checkbox"/> Moderada		
<input type="checkbox"/> Intensa		
Após 6 horas, foi medida a temperatura da criança? Se sim, qual foi? _____ °C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Após 20-24 horas, foi medida a temperatura? Se sim, qual foi? _____ °C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Após 40-48 horas, foi medida a temperatura? Se sim, qual foi? _____ °C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Caso não tenha sido medida a temperatura, os pais consideraram a criança:		
<input type="checkbox"/> Normal		
<input type="checkbox"/> Febril		

Sim Não

Seu filho esteve irritado nos últimos 2 dias? Se sim, assinale a situação que melhor descreve a irritabilidade:



- Inquieto e choroso
- Difícil de por para dormir
- Outra situação (descreva):

---



---



---



---



---

Seu filho chorou mais do que o habitual nos últimos 2 dias? Se sim, assinale qual situação se aplica melhor:



- Inquieto e choroso
- Não parava de chorar mesmo se posto no colo, abraçado e embalado
- Chorando sem parar. Por quanto tempo? \_\_\_\_\_
- Nunca chorou desta forma. Descrever o tipo de choro:

---



---



---



---



---

Sim Não

Seu filho esteve mais sonolento do que o habitual? Se sim, assinale a situação que melhor se aplica:

- Sonolento, mas fácil de despertar
- Dormindo profundamente, difícil de despertar
- Fora do habitual, mas diferente das situações acima (descrever):

---



---



---



---

Seu filho alimentou-se normalmente após a vacinação? Se não, assinale a situação que se aplica melhor:

- Comendo menos do que o habitual
- Recusando a alimentação
- Com vômitos. Quantas vezes? \_\_\_\_\_

Houve alguma alteração nas evacuações do seu filho? Se sim, assinale a melhor descrição:

- Mais vezes do que o habitual, com fezes líquidas
- Mais vezes do que o habitual, com fezes normais

Alguma outra alteração em seu filho o preocupou? Se sim, descrever, anotando data, hora e evolução do ocorrido:

---



---



---



---

Baseado na descrição dos pais, esta alteração lembrava:

- Uma convulsão
- Um episódio hipotônico-hiporresponsivo
- Nenhum dos acima

☛ Caso esta alteração lembre uma convulsão ou um episódio hipotônico-hiporresponsivo, notificar o investigador principal.

Caso tenha havido durante os primeiros 2 dias qualquer problema não abrangido por estas perguntas, descrevê-lo, com data e duração:

---



---



---



---



---

Sim                  Não

Foi consultado um médico para qualquer possível reação à imunização? Se sim, descreva o diagnóstico do médico:

---



---



---



---



---

Qual a impressão dos pais sobre as reações:

- Nenhuma
- Leve
- Moderada
- Grave

No caso de reação grave, qual foi?

---

---

---

---

---

**Observações Um Mês Após a Imunização**

Sim                  Não

Houve algum problema de saúde desde a última visita? Se sim, descrever (caso tenha havido necessidade de internação, consultar prontuário médico):

---

---

---

---

---

Seu filho recebeu outras vacinas desde a última visita? Se sim, descrever, com data:

---

---

---

---

---

Ficha preenchida por: \_\_\_\_\_

**7.3. ANEXO C**

**CONSENTIMIENTO ESCLARECIDO**



**UNICAMP**

ESCLARECIMENTO AOS PAIS E RESPONSÁVEIS  
RESPOSTA SOROLÓGICA À VACINA CONJUGADA POLISSACÁRIDE  
CAPSULAR DO HEMOPHILUS INFLUENZAE DO TIPOB-TOXÓIDE  
DIFTÉRICO EM CRIANÇAS BRASILEIRAS.

Prezados Pais:

O *Hemophilus influenzae* é uma bactéria que causa doenças graves (meningite, pneumonia) em crianças menores de 5 anos. No Brasil, é o principal causador de meningite em crianças fora dos períodos de epidemia.

Há cerca de cinco anos já está em uso nos Estados Unidos, Japão e Europa a vacina contra o *Hemophilus*. Já está comprovado em vários estudos no exterior que esta vacina é eficaz (confere proteção) e segura (tem poucos efeitos colaterais), quando aplicada a partir da idade de uma ano e três meses. Consideramos muito importante que esta vacina seja usada também no Brasil, e precisamos determinar a resposta das crianças brasileira a ela.

A vacina é dada em uma só dose, por injeção intramuscular, no braço. A aplicação será feita na sala de vacinação do Ambulatório de Pediatria, no 3º andar do Hospital das Clínicas. A vacinação será efetuada às Quartas-feiras, das 8 às 12 horas. A grande maioria das crianças não apresenta efeitos colaterais. Em algumas (cerca de 3%) ocorrem dor, vermelhidão e discreto inchaço no local da injeção. Pode também ocorrer febre, com pouca frequência (em menos de 1% das crianças que recebem a vacina a temperatura ultrapassa 38,5°C). Com a finalidade de medir a proteção que esta vacina confere, será preciso colher 3 ml de sangue antes da aplicação e 1 mês após. Nas duas ocasiões, a criança deverá estar em jejum. Será também feita, no dia da aplicação da vacina, a coleta de secreção da faringe com um "cotonetete", para verificar se a criança não alberga a bactéria na faringe.



**UNICAMP**

Caso sejam notados efeitos colaterais como os já relatados, ou outros, após a dose da vacina, os pais poderão entrar em contato com Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva nos telefones 398531 (das 13 às 19 horas - UTI PEDIÁTRICA DO HC-UNICAMP) ou 531006 (RESIDÊNCIA), ou trazer seu filho ao Ambulatório de Pediatria.

Seu filho poderá deixar de participar do projeto a qualquer tempo, sem que isto implique na suspensão dos cuidados médicos.

Todos os resultados obtidos na análise das amostras de sangue das crianças vacinadas serão comunicados aos pais, que receberão um certificado de vacinação.

Atenciosamente,

MARCOS TADEU NOLASCO DA SILVA  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA  
FCM - UNICAMP



UNICAMP

SEGURANÇA E IMUNOGENICIDADE DA  
VACINA CONJUGADA DO POLISSACÁRIDE  
CAPSULAR DO HAEMOPHILUS INFLUENZAE  
DO TIPO B COM O TOXÓIDE DIFTÉRICO,  
DADA A CRIANÇAS BRASILEIRAS SAUDÁVEIS  
COM 15 A 18 MESES DE IDADE.

O projeto de vacinação foi claramente explicado a mim e eu pude ler e compreender as informações fornecidas. Compreendo que uma pequena parte das crianças vacinadas pode algumas vezes não desenvolver imunidade adequada às doenças causadas pelo Haemophilus.

Concordo em incluir meu (minha) filho(a) neste projeto.

NOME DA CRIANÇA: \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_

ASSINATURA: \_\_\_\_\_

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Expliquei claramente aos pais ou responsáveis da criança acima mencionada a natureza, os procedimentos e os riscos previsíveis deste projeto de vacinação.

ASSINATURA: \_\_\_\_\_

FUNÇÃO: \_\_\_\_\_

LOCAL E DATA: \_\_\_\_\_

#### **7.4. ANEXO D**

### **RÉGUA PARA MONITORIZAÇÃO DE REAÇÕES LOCAIS**

**F** CONNAUGHT  
LABORATORIES LIMITED  
A PASTEUR MÉRIEUX COMPANY

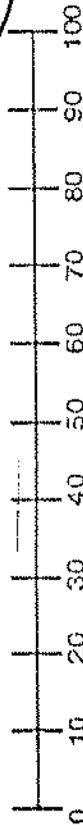
10

15

25

40

50



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDERSON, E.E.; CHISOLM, N.; HALPERIN, S.A. Immunization with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine at 18 and 24 months of age: evidence of decreased immunogenicity. **Clin. Invest. Med.** v. 14, p. 338-45, 1991.

ALEXANDER, H.E.; HEIDELBERGER, M.; LEIDY, G. The protective or curative element in type b *H. influenzae* rabbit serum. **Yale J. Biol. Med.** v. 16, p. 425-34, 1944 apud GRANOFF, D.M. & MUNSON, R.S., 1986.

ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research.** London, Chapman & Hall, 1991.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines: immunization of children at 15 months of age. **Pediatrics**, v. 86, p. 794-5, 1990.

ANDERSON, P.; JOHNSTON, R.B.; SMITH, D.H. Human serum activity against *Haemophilus influenzae* type b. **J. Clin. Invest.**, v. 51, p. 31-8, 1972.

ANDERSON, P. Intrinsic tritium labeling of the capsular polysaccharide antigen of *Haemophilus influenzae* type b. **J. Immunol.**, v. 120, p. 866-70, 1978.

BARBOUR, M.L.; BOOY, R.; CROOK, D.W.M.; GRIFFITHS, H.; CHAPEL, H.M.; MOXON, E.R.; MAYON-WHITE, D. *Haemophilus influenzae* type b carriage and immunity four years after receiving the *Haemophilus influenzae* oligosaccharide-CRM 197 (HbOC) conjugated vaccine. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 12, p. 478-83, 1993.

BARENKAMP, S.J. Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides of nontypeable *Haemophilus influenzae*. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S181-S184, 1992. Supplement 1.

BARINGTON, T.; KRISTENSEN, K.; HENRICHSEN, J.; HEILMANN, C. Influence of prevaccination immunity on the human B-lymphocyte response to a *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine. **Infect. Immun.** v. 59, p. 1057-64, 1991.

BERKOWITZ, C.D.; WARD, J.I.; MEIER, K.; HENDLEY, J.O.; BRUNELL, P.A.; BARKIN, R.A.; ZAHRADNIK, J.M.; SAMUELSON, J.; GORDON, L. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and polysaccharide-diphtheria toxoid conjugated vaccines in children 14 to 24 months of age. **J. Pediatr.**, v. 110, p. 509-14, 1987.

BIJLMER, H.A. & ALPHEN, L. A prospective, population-based study of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in the Gambia and the possible consequences. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S29-S32, 1992. Supplement 1.

BLACK, S.B.; SHINEFIELD, H.R.; FIREMAN, B.; HIATT, R.; POLEN, M.; VITTINGHOFF, E. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugated *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61,080 children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 97-106, 1991.

BLACK, S.B. & SHINEFIELD, H.R. Immunization with oligosaccharide conjugated *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine on a large health maintenance organization population: extended follow-up and impact on *Haemophilus influenzae* disease epidemiology. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 11, p. 610-13, 1992.

BLACK, S.B.; SHINEFIELD, H.R.; FIREMAN, B.; HIATT, R. Safety, immunogenicity, and efficacy in infancy of oligosaccharide conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine in a United States population: possible implications for optimal use. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S139-S143, 1992. Supplement 1.

BRANDTZAEG, P. Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S167-176, 1992. Supplement 1.

BRINTON, C.C.; CARTER, M.J.; DERBER, D.B.; KAR, S.; KRAMARIK, J.A.; TO, A.C.C.; TO, S.C.M.; WOOD, S.W. Design and development of pilus vaccines for *Haemophilus influenzae* diseases. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 8, p. S54-S61, 1989. Supplement.

BROOME, C.V. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections: United States. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 779-82, 1987.

CAMPBELL, H.; BYASS, P.; AHONKAI, V.; VELLA, P.; GREENWOOD, B.M.; Serologic responses to an *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-Neisseria meningitidis outer membrane protein conjugated vaccine in very young gambian infants. **Pediatrics**, v. 86, p. 102-7, 1990.

CASALI, P.; RICE, G.P.A.; OLDSTONE, M.B.A. Viruses disrupt functions of human lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 159, p. 1322-37, 1984.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). Supplementary statement: Change in administration schedule for *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines. **M.M.W.R.**, v. 39, p. 232-3, 1990.

CHACKO, A. & GRANOFF, D.M. In vitro induction of IgG1 and IgG2 secretion by B cells of children who developed invasive *Haemophilus influenzae* disease despite vaccination. **Pediatr. Res.**, v. 30, p. 124-9, 1991.

CLAESSON, B.A.; LAGERGARD, T.; TROLLFORS, B.; Development of serum antibodies of the Immunoglobulin G class and subclasses against the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b in children and adults with invasive infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 2549-53, 1988.

CLAESSON, B.A.; TROLLFORS, B.; LAGERGARD, T.; TARANGER, J.; BRYLA, D.; OTTERMAN, G.; CRAMTON, T.; YANG, Y.; REIMER, C.B.; ROBBINS, J.B.; SCHNEERSON, R. Clinical and immunologic responses to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b alone or conjugated to tetanus toxoid in 18- to 23-month-old children. **J. Pediatr.**, v. 112, p. 695-702, 1988.

CLEMENS, J.D.; FERRECCIO, C.; LEVINE, M.M.; HORWITZ, I.; RAO, M.R.; EDWARDS, K.M.; FRITZELL, B. Impact of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugated vaccine on responses to concurrently administered diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. **J.A.M.A.**, v. 267, p. 673-78, 1992.

COCHI, S.L.; BROOME, C.V.; HIGHTOWER, A.W. Immunization of US children with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine. **J.A.M.A.**, v. 253, p. 521-9, 1985.

COCHI, S.L.; FLEMING, D.W.; HIGHTOWER, A.W.; LIMPAKARJANARAT, K.; FACKLAM, R.R.; SMITH, J.D.; SIKES, R.K.; BROOME, C.V. Primary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: a population-based assessment of risk factors. **J. Pediatr.**, v. 108, p. 887-96, 1986.

COULTON, J.W.; CHIN, A.C.; VACHON, V. Recombinant porin of *Haemophilus influenzae* type b. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S188-S191, 1992. Supplement 1.

CRUZ, O.F.; SHAPIRO, E.D.; SPIEGELMAN, K.N.; LEICHER, C.R.; BRENINGSTALL, G.N.; KHATRI, B.O.; DOBYNS, W.B. Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (Guillain-Barré syndrome) after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine. **J. Pediatr.**, v. 155, p. 743-6, 1989.

DASHEFSKY, B.; WALD, E.; GUERRA, N.; BYERS, C. Safety, tolerability, and immunogenicity of concurrent administration of *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine (meningococcal protein conjugate) with either measles-mumps-rubella vaccine or diphtheria-tetanus-pertussis and oral poliovirus vaccines in 14 to 23-month-old infants. **Pediatrics**, v. 85, p. 682-89, 1990. Supplement.

DEAN, J.; DEAN, A.; BURTON, A.; DICKER, R. **EPI INFO version 5.01b**. Centers for Disease Control, Atlanta, 1991.

DECKER, M.D.; EDWARDS, K.M.; BRADLEY, R.; PALMER, P. Comparative trial in infants of four conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccines. **J. Pediatr.**, v. 120, p. 184-9, 1992.

DECKER, M.D.; EDWARDS, K.M.; BRADLEY, R.; PALMER, P. Responses of children to booster immunization with their primary conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine or with polyribosylribitol phosphate conjugated with diphtheria toxoid. **J. Pediatr.**, v. 122, p. 410-3, 1993.

DINTZIS, R.Z. Rational design of conjugate vaccines. **Pediatr. Res.**, v. 32, p. 376-85, 1992.

ESKOLA, J.; PELTOLA, H.; TAKALA, A.K.; KÄYHTY, H.; HAKULINEN, M.; KARANKO, V.; KELA, E.; REKOLA, P.; RÖNNBERG, P.R.; SAMUELSON, J.; GORDON, L.K.; MÄKELÄ, P.H. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugated vaccine in infancy. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 717-22, 1987.

ESKOLA, J.; KÄYHTY, H.; TAKALA, A.K.; PELTOLA, H.; RÖNNBERG, P.R.; KELA, E.; PEKKANEN, E.; McVERRY, P.H.; MÄKELÄ, P.H. A randomized, prospective field trial of a conjugated vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1381-7, 1990.

ETLINGER, H.M. Carrier sequence selection - one key to successful vaccines. **Immunol. Today**, v. 13, p. 52-5, 1992.

FARHAT, C. K. & MANTESE, O. C. Meningites bacterianas purulentas. In: TONELLI, E. ed. **Doenças Infecciosas na Infância**. Rio de Janeiro, MEDSI, 1988. p. 365-78.

FARHAT, C.K.; GONÇALVES, S.E.C.; GUARNIERI, C.E.; CARVALHO, L.H.R.; SOKOLOWSKY, W.; HELDLER, O. Meningites na infância - estudo de 2.734 casos. II. Distribuição segundo a idade. In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PEDIATRIA. Salvador, 1993. **Anais**, res. n° 115.

FARR, R.S. A quantitative immunological measure of the primary interaction between I\*BSA and antibody. **J. Infect. Dis.**, v. 103, p. 239, 1958.

FERRECIO, C.; ORTIZ, E.; ASTROZA, L.; RIVERA, C.; CLEMENS, J.; LEVINE, M. A population-based retrospective assessment of the disease burden resulting from invasive *Haemophilus influenzae* in infants and young children in Santiago, Chile.

**Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 9, p. 488-94, 1990.

FERRECIO, C.; CLEMENS, J.; AVENDANO, A.; HORWITZ, I.; FLORES, C.; AVILA, L.; CAYAZZO, M.; FRITZELL, B.; CADOZ, M.; LEVINE, M. The clinical and immunological response of Chilean infants to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugated vaccine coadministered in the same syringe with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine at two, four and six months of age.

**Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 764-71, 1991.

FOTHERGILL, L.D. & WRIGHT, J. Influenzal meningitis: The relation of age incidence to bactericidal power of blood against causal organism. **J. Immunol.**, v. 24, p. 273-84, 1933 apud ROBBINS, J.B. & SCHNEERSON, R., 1987, p. 791.

FRAYHA, H.H.; DENT, P.; SHANNON, H.S.; JOHNSON, S.E.; GORDON, L. Safety and immunogenicity of subcutaneous *Haemophilus influenzae* vaccines in 15-17 month-old children. **Clin. Invest. Med.** v. 14, p. 379-87, 1991.

FRITZELL, B. & PLOTKIN, S. Efficacy and safety of a *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus protein conjugated vaccine. **J. Pediatr.**, v. 121, p. 355-62, 1992.

FUNKHOUSER, A.; STEINHOFF, M.C.; WARD, J. *Haemophilus influenzae* disease and immunization in developing countries. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S542-S554, 1991. Supplement 6.

GILSDORF, J.R. & McDONNELL, M. Mucosal antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. **Pediatr. Res.**, v. 29, p. 420-23, 1991.

GRANOFF, D.M. & CATES, K.L. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. **J. Pediatr.**, v. 107, p. 330-6, 1985.

GRANOFF, D.M. & MUNSON, R.S. Prospects for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease by immunization. **J. Infect. Dis.**, v. 153, p. 448-61, 1986.

GRANOFF, D.M.; SHACKELFORD, P.G.; SUAREZ, B.K.; NAHM, M.H.; CATES, K.L.; MURPHY, T.V.; KARASIC, R.; OSTERHOLM, M.T.; PANDEY, J.P.; DAUM, R.S. *Haemophilus influenzae* type b disease in children vaccinated with type b polysaccharide vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v. 315, p. 1584-90, 1986.

GRANOFF, D.M. & HOLMES, S.J. Comparative immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Vaccine**, v.9, p. S30-S34, 1991. Supplement.

GRANOFF, D.M. & HOLMES, S.J. G2m(23) immunoglobulin allotype and immunity to *Haemophilus influenzae* type b. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S66-S69, 1992. Supplement 1.

GRANOFF, D.M.; ANDERSON, E.L.; OSTERHOLM, M.T.; HOLMES, S.J.; McHUGH, J.E.; BELSHE, R.B.; MEDLEY, F.; MURPHY, T.V. Differences in the immunogenicity of three *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines in infants. **J. Pediatr.**, v. 121, p. 187-94, 1992.

GREENBERG, D.P.; VADHEIM, C.M.; BORDENAVE, N.; ZIONTZ, L.; CHRISTENSON, P.; WATERMAN, S.H.; WARD, J.I. Protective efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and conjugated vaccines in children 18 months of age and older. **J.A.M.A.**, v. 265, p. 987-92, 1991.

HAM, S.M.; ALPHEN, L.; MOOI, F.R. Fimbria-mediated adherence and hemagglutination of *Haemophilus influenzae*. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S97-99, 1992. Supplement 1.

HAMILL, P.V.V.; DRIZD, T.A.; JOHNSON, C.L.; REED, R.B.; ROCHE, A.F.; MOORE, W.M.; Physical growth: National Center for Health Statistics percentiles. **Am. J. Clin. Nutrition**, v. 32, p. 607-29, 1979.

HETHERINGTON, S.V. & RUTKOWSKI, A.F. Antibody affinity in infants after immunization with conjugated capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 1185-89, 1990.

HOLMES, S.J.; MURPHY, T.V.; ANDERSON, R.S.; KAPLAN, S.L.; ROTHSTEIN, E.P.; GAN, V.N.; GRANOFF, D.M. Immunogenicity of four *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines in 17- to 19-month-old children. **J. Pediatr.**, v. 118, p. 364-71, 1991.

HOLMES, S.J. & GRANOFF, D.M. The biology of *Haemophilus influenzae* type b vaccination failure. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S121-S128. Supplement 1.

ISTRE, G.R.; CONNER, J.S.; BROOME, C.V.; HIGHTOWER, A.; HOPKINS, R.S. Risk factors for primary invasive *Haemophilus influenzae* disease: increased risk from day care attendance and school-aged household members. **J. Pediatr.**, v. 106, p. 190-5, 1985.

JONSDOTTIR, K.E.; STEINGRIMSSON, O.; OLAFSSON, O. Immunization of infants in Iceland against *Haemophilus influenzae* type b. [letter]. **Lancet**, v. 340, p. 252-3, 1992.

KAPLAN, S.L.; DUCKETT, T.; MAHONEY, D.H.; KENNEDY, L.L.; DUKES, C.M.; SCHAFFER, D.M.; MASON, E.O. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugated vaccine in children with sickle hemoglobinopathy or malignancies, and after systemic *Haemophilus influenzae* type b infection. **J. Pediatr.**, v. 120, p. 367-70, 1992.

KASSIM, O.O.; RAPHAEL, D.H.; AKO-NAI, A.K.; TAIWO, O.; TORIMIRO, S.E.A.; AFOLABI, O.O. Class-specific antibodies to *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in human breast milk and maternal-infant sera. **Ann. Trop. Pediatr.**, v. 9, p. 226-32, 1989.

KÄYHTY, H.; MÄKELÄ, O.; ESKOLA, J.; SAARINEN, L.; SEPPÄLÄ, I. Isotype distribution and bactericidal activity of antibodies after immunization with *Haemophilus influenzae* type b vaccines at 18-24 months of age. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 973-82, 1988.

KÄYHTY, H.; PELTOLA, H.; ESKOLA, J.; Immunogenicity and reactogenicity of four *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccines in Finnish 24-month-old children. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 7, p. 574-77, 1988.

KÄYHTY, H.; ESKOLA, J.; PELTOLA, H.; RONNBERG, P.R.; KELA, E.; KARANKO, V.; SAARINEN, L. Antibody response to four *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines. **A.J.D.C.**, v. 145, p. 223-27, 1991.

LEPOW, M. Clinical trials of the *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-diphtheria toxoid conjugated vaccine. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 6, p. 804-7, 1987.

LETSON, G.W.; SANTOSHAM, M.; REID, R.; PRIEHS, C.; BURNS, B.; JAHNKE, A.; GAHAGAN, S.; NIENSTADT, L.; JOHNSON, C.; SMITH, D.; SIBER, G. Comparison of active and combined passive/active immunization of Navajo children against *Haemophilus influenzae* type b. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 7, p. 747-52, 1988.

LOUGHLIN, A.M.; MARCHANT, C.D.; LETT, S.; SHAPIRO, E.D. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b vaccines in Massachusetts children 18 to 59 months of age. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 11, p. 374-9, 1992.

MADORE, D.V.; JOHNSON, C.L.; PHIPPS, D.C.; MYERS, M.G.; EBY, R.; SMITH, D.H. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-CRM 197 conjugated vaccine in infants aged 15 to 23 months. **Pediatrics**, v. 86, p. 527-34, 1990.

MÄKELÄ, P.H.; TAKALA, A.K.; PELTOLA, H.; ESKOLA, J. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S2-S6, 1992. Supplement 1.

MARWICK, C. FDA committee recommends combined DTP-*Haemophilus influenzae* vaccine. **J.A.M.A.**, v. 268, p. 3415, 1992.

MENDELMAN, P.M. & SMITH, A.L. *Haemophilus influenzae*. In: FEIGIN, R.D. & CHERRY, J.D., ed. **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1987. p. 1142-63.

MOHLE-BOETANI, J.C.; AJELLO, G.; BRENNEMAN, E.; DEEVER, K.A.; HARVEY, C.; PLIKAYTIS, B.D.; FARLEY, M.M.; STEPHENS, D.S.; WENGER, J.D. Carriage or *Haemophilus influenzae* type b in children after widespread vaccination with conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccines. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 12, p. 589-93, 1993.

MOXON, E.R. Molecular basis of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S77-S81, 1992. Supplement 1.

MUNSON, R.S.; KABEER, M.H.; LENOIR, A.A.; GRANOFF, D.M. Epidemiology and prospects for prevention of disease due to *Haemophilus influenzae* in developing countries. **Rev. Infect. Dis.**, v. 11, p. S588-S597, 1989. Supplement 3.

MURPHY, T.V.; GRANOFF, D.M.; CHRANE, D.F.; OLSEN, K.D.; BARENKAMP, S.J.; DOWELL, S.F.; McCracken, G.H. Pharyngeal colonization with *Haemophilus influenzae* type b in children in a day care center without invasive disease. **J. Pediatr.**, v. 106, p. 712-6, 1985.

NELSON, M.B.; MURPHY, T.F.; KEULEN, H.; REKOSH, D.; APICELLA, M. Studies on P6, an important outer-membrane protein antigen of *Haemophilus influenzae*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, p. S331-S335, 1988. Supplement 2.

NOEL, G.J.; HOISETH, S.K.; EDELSON, P.J. Type b capsule inhibits ingestion of *Haemophilus influenzae* type b by murine macrophages: studies with isogenic encapsulated and unencapsulated strains. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p. 178-82, 1992.

NÚCLEO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP. III BOLETIM. Campinas, 1992.

PABST, H.F. & SPADY, D.W. Effect of breast-feeding on antibody response to conjugated vaccine. **Lancet**, v. 336, p. 269-70, 1990.

PARKE, J.C. Capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b as a vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 795-8, 1987.

PELTOLA, H.; KÄYHTY, H.; VIRTANEN, M; MÄKELÄ, P.H. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v. 310, p. 1561-6, 1984.

PELTOLA, H.; KILPI, T.; ANTTILA, M. Rapid disappearance of *Haemophilus influenzae* type b meningitis after routine childhood immunization with conjugated vaccines. **Lancet**, v. 340, p. 592-94, 1992.

PENNEY, C.L. Chemical perspectives in the design of a pediatric meningitis vaccine. **N.Y. State J. Med.**, v.

PETER, G.; LEPOW, M.; McCracken, G.H.; PHILLIPS, C.F.; ed. **Red Book - Doenças infecciosas em Pediatria**. São Paulo, Panamericana, 1991. p. 207-220.

PETERSEN, G.M.; SILIMPERI, D.R.; CHIU, C.Y.; WARD, J.I. Effects of age, breast feeding, and household structure on *Haemophilus influenzae* type b disease risk and antibody acquisition in Alaskan Eskimos. **Am. J. Epidemiol.**, v. 134, p. 1212-21, 1991.

PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. **J. Exp. Med.** v. 53, p. 471-95, 1931 apud ROBBINS, J.B. & SCHNEERSON, R., 1987, p. 791.

PITTMAN, M. The action of type-specific *H. influenzae* antiserum. **J. Exp. Med.**, v. 58, p. 683-706, 1933 apud WARD, J. & COCHI, S., 1988, p. 300.

RAMSEY, K.P.; POPEJOY, L.A.; JESSE, S.W.; GONZALES-TORRES, I.; *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine. Antibody kinetics in 17- to 71-month-old children. **A.J.D.C.**, v. 143, p. 28-30, 1989.

- ROBBINS, J.B.; PARKE, J.C.; SCHNEERSON, R.; WHISNANT, J.K. Quantitative measurement of "natural" and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies. **Pediatr. Res.** v. 7, p. 103-10, 1973.
- ROBBINS, J.B & SCHNEERSON, R. *Haemophilus influenzae* type b: the search for a vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 791-4, 1987.
- ROBBINS, J.B & SCHNEERSON, R. Evaluating the *Haemophilus influenzae* type b PRP-D conjugated vaccine. [Editorial]. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1415-6, 1990.
- ROSALES, S.V.; LASCOLEA, L.J., OGRA, P.L. Development of respiratory mucosal tolerance during *Haemophilus influenzae* type b infection in infancy. **J. Immunol.**, v. 132, p. 1517-21, 1984.
- RUBIN, L.G.; VOULALAS, D.; CARMODY, L. immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine in children with sickle cell disease. **A.J.D.C.**, v. 146, p. 340-2, 1992.
- SANSONI, A.; RAPPUOLI, R.; VITI, S.; CONSTANTINO, P.; FANTI, O.; CELLESI, C. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b on sample population from central Italy. **Vaccine**, v. 10, p. 627-30, 1992.
- SANTOSHAM, M.; HILL, J.; WOLFF, M.; REID, R.; LUKACS, L.; AHONKHAI, V. Safety and immunogenicity of a *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine in a high risk american indian population. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 113-118, 1991.

SANTOSHAM, M.; RIVIN, B.; WOLFF, M.; REID, R.; NEWCOMER, W.; LETSON, G.W.; HILL, J.; THOMPSON, C.; SIBER, G.R. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b infections in Apache and Navajo children. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S144-S151, 1992. Supplement 1.

SCHLESINGER, Y. & GRANOFF, D.M. Avidity and bactericidal activity of antibody elicited by different *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines. **J.A.M.A.**, v. 267, p. 1489-94, 1992.

SCHNEERSON, R.; RODRIGUES, L.P.; PARKE, J.C.; ROBBINS, J.B. Immunity to disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. **J. Immunol.**, v. 107, p. 1081-89, 1971.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. **Imunizações: atualização.** v. 4, n.1, p.72-74, 1991.

SELL, S.H. *Haemophilus influenzae* type b meningitis: manifestations and long-term sequelae. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 775-8, 1987.

SHAPIRO, E.D. New vaccines against *Haemophilus influenzae* type b. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 37, p. 567-83, 1990.

SHAPIRO, E.D. & WARD, J. The epidemiology and prevention of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. **Epidemiol. Rev.**, v. 13, p. 113-42, 1991.

SIBER, G.R.; SANTOSHAM, M.; REID, G.R.; THOMPSON, C.; ALMEIDO-HILL, J.; MORELL, A.; DeLANGE, G.; KETCHAM, J.K.; CALLAHAN, E.H. Impaired antibody response to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and low IgG2 and IgG4 concentrations in Apache children. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1387-92, 1990.

SILVA, M.T.N.; VILELA, M.M.S.; ANTONIO, M.A.R.; BARRETO, L.; CARNIEL, E.F.; ANDRADE, M.G.; MELLONE, O.C. Segurança e imunogenicidade da vacina conjugada do polissacáride capsular do *Haemophilus influenzae* do tipo b com o toxóide diftérico em crianças brasileiras. In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PEDIATRIA. Salvador, 1993. **Anais**, res. n° 226.

SMITH, D.H.; MADORE, D.V.; EBY, R.J.; ANDERSON, P.W.; INSEL, R.A.; JOHNSON, C.L. *Haemophilus b* oligosaccharide-CRM 197 and other *haemophilus b* conjugated vaccines: a status report. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 251, p. 65-82, 1989.

SOOD, S.K.; SCHREIBER, J.R.; SIBER, G.R.; DAUM, R.S. Postvaccination susceptibility to invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in infant rats. **J. Pediatr.**, v. 113, p. 814-9, 1988.

SOOD, S.K. & DAUM, R.S. Disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in the immediate period after homologous immunization: immunologic investigation. **Pediatrics**, v. 85, p. 698-704. Supplement.

STEIN, K.E. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S49-S52, 1992. Supplement I.

TAKALA, A.K.; ESKOLA, J.; PALMGREN, J.; RONNBERG, P.R.; KELA, E.; REKOLA, P.; MÄKELÄ, P.H. Risk factors of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease among children in Finland. **J. Pediatr.**, v. 115, p. 694-701, 1989.

TAKALA, A.K. & CLEMENTS, D.A. Socioeconomic risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S11-S15, 1992. Supplement 1.

TAKALA, A.K.; SANTOSHAM, M.; HILL, J.; WOLFF, M.; NEWCOMER, W.; REID, R.; KÄYHTY, H.; ESKO, E.; MÄKELÄ, P.H. Vaccination with *Haemophilus influenzae* type b meningococcal protein conjugated reduces oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b among American Indian children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 12, p. 593-99, 1993.

TROLLFORS, B.; LAGERGARD, T.; CLAESSON, B.A.; THORNBERG, E.; MARTINELL, J.; SCHNEERSON, R. Characterization of the serum antibody response to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b in children with invasive infections. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p. 1335-9, 1992.

TURNER, R.B.; CIMINO, C.O.; SULLIVAN, B.J. Prospective comparison of the immune response of infants to three *Haemophilus influenzae* type b vaccines. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 108-12, 1991.

VADHEIM, C.M.; GREENBERG, D.P.; MARCY, S.M.; FROESCHLE, J.; WARD, J.I. safety evaluation of PRP-D *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine in children immunized at 18 months of age and older: follow-up study of 30000 children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 9, p. 555-61, 1990.

VELLA, P.P.; ELLIS, R.W. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccines in infant Rhesus monkeys. **Pediatr. Res.**, v. 29, p. 10-13, 1991.

WARD, J.; FRASER, D.W.; BARAFF, L.J.; PLIKAYTIS, B.D. *Haemophilus influenzae* meningitis. A national study of secondary spread in household contacts. **N. Engl. J. Med.**, v. 301, p. 122-6, 1979.

WARD, J. & COCHI, S. *Haemophilus influenzae* vaccines. In: PLOTKIN, S.A. & MORTIMER, E.A., ed. **Vaccines**. Philadelphia, W.B. Saunders, 1988. p.300-32.

WARD, J. Commentary: results of efficacy trials in Alaska and Finland of *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine. **Pediatrics**, v. 85, p. 667, 1990. Supplement.

WARD, J.; BRENNEMAN, G.; LETSON, G.W.; HEYWARD, W.L. Limited efficacy of a *Haemophilus influenzae* type b conjugated vaccine in Alaska native infants. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1393-401, 1990.

WASSERMAN, R.L. [editor] Antibody deficiency: IgG subclass deficiency and vaccine nonresponder states. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 9, p. 424-33, 1990.

WATEMBERG, N.; DAGAN, R.; ARBELLI, Y.; BELMAKER, I.; MORAG, A.; HESSEL, L.; FRITZELL, B.; BAJARD, A.; PEYRON, L. safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b-tetanus protein conjugated vaccine, mixed in the same syringe with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in young infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 758-63, 1991.

- WEINBERG, G.A.; GRANOFF, D.M.; NAHM, M.H.; SHACKELFORD, P.G.  
Functional activity of different IgG subclass antibodies against type b capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae*. **J. Immunol.**, v. 136, p. 4232-38, 1986.
- WEINBERG, G.A. & GRANOFF, D.M. Polysaccharide-protein conjugated vaccines for the prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. **J. Pediatr.**, v. 113, p. 621-31, 1988.
- WEINBERG, G.A. & GRANOFF, D.M. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugated vaccines in children with conditions associated with impaired antibody responses to type b polysaccharide vaccine. **Pediatrics**, v. 85, p. 654-61, 1990. Supplement.
- WENGER, J.D.; WARD, J.I.; BROOME, C.V.; Prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease: vaccines and passive prophylaxis. **Curr. Clinical Topics Infect. Dis.**, v. 10, p. 306-339, 1989.
- WENGER, J.D.; PIERCE, R.; DEEVER, K.A.; PLIKAYTIS, B.D.; FACKLAM, R.R.; BROOME, C.V. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid DJ vaccine in US children aged 18 to 59 months. **Lancet**, v. 338, p. 395-8, 1991.
- WILFERT, C.M. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections. **Pediatrics**, v. 85, p. 631-35, 1990. Supplement.
- WILLIAMS, A.E.; MASKELL, D.J.; MOXON, E.R. Relationship between intracellular survival in macrophages and virulence of *Haemophilus influenzae* type b. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 1366-9, 1991.

WINKELSTEIN, J.A. & MOXON, E.R. The role of complement in the host's defense against *Haemophilus influenzae*. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. S62-S65, 1992. Supplement 1.

WRIGHT, P.F. Approaches to prevent acute bacterial meningitis in developing countries. **Bull. WHO**, v. 67, p. 479-86, 1989.

## ABSTRACT

Humoral immunity to *Haemophilus influenzae* type **b** (**Hib**) was studied in 68 healthy Brazilian children between 15 and 19 months of age. The evaluation was done by the measure, by radioimmunoassay, of the levels of antibodies against the capsular polysaccharide of **Hib** (**PRP**). The children enrolled in the trial received one intramuscular dose of the conjugate vaccine of the capsular polysaccharide of **Hib** and diphtheria toxoid (**PRP-D**, containing 25 µg of **PRP** and 18 µg of diphtheria toxoid per dose of 0.5 ml). Two samples of sera were collected, one immediately before vaccination and the other 1 month after. The safety of **PRP-D** vaccine was evaluated by adverse reactions monitoring 48 hours and 1 month after vaccination.

The geometric mean titer (GMT) of naturally occurring anti-**PRP** antibodies was 0.082 µg/ml. Ten children (14.7%) had titers above 0.15 µg/ml, considered naturally protective. Children that lived in houses with more than 5 dwellers showed titers above 0.15 µg/ml with a higher frequency (33.7% vs 10.7%,  $P = 0.05$ ).

After vaccination with **PRP-D**, the GMT rised to 2.92 µg/ml, with a ratio of postvaccination to prevaccination levels of 35.4. Sixty-six (97,1%) children reached titers above 0.15 µg/ml, and 51 (75%) above 1 µg/ml. Three variables showed association with the response to **PRP-D** vaccine:

Natural levels: children with natural levels above 0.15 µg/ml showed a higher frequency of postvaccination titers above 1 µg/ml (100% vs 70,7%, P = 0.05).

Age: children at 18 or more months showed a higher frequency of titers above 5 µg/ml, compared to the ones at 15 months (55% vs 19.2%, P = 0.05).

Day-care attendance: the antibody response in the group of children who attended day care was characterized by lower GMTs (1.49µg/ml vs 4.81 µg/ml, P = 0.002), lower postvaccination to prevaccination ratios (20.77 vs 52.52, P = 0,02) and lower frequency of children with levels above 5 µg/ml (20.7% vs 51.32%, P = 0.01) and above 10 µg/ml (10.3% vs 30.8%, P = 0.05).

The PRP-D vaccine was safe in the study population. Within 48 hours of immunization, 2 children (2.9%) had temperatures above 37.8 °C, 3 (4.4%) complained of pain in the site of injection and 8 (11.8%) showed irritability.

We conclude that naturally acquired immunity against **Hib** is low in the study population. The **PRP-D** vaccine proved to be immunogenic and safe.