



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
(Brasil)
&
MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
(Moçambique)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Frequência e epidemiologia molecular das estirpes causadoras de
meningites bacterianas agudas em crianças menores de 5 anos de idade
em Moçambique**

Aquino Albino Nhantumbo

Maputo 2014



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

AUTOR: *Aquino Albino Nhantumbo*

Frequência e epidemiologia molecular das estirpes causadoras de meningites bacterianas agudas em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique

Orientadores:

Dr. Milton Ozório Moraes, IOC – FIOCRUZ

Dr. Eduardo Samo Gudo, INS – MISAU

Data da aprovação: ____/____/____

Examinadores:

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

N576 Nhantumbo, Aquino Albino

Frequência e epidemiologia molecular das estirpes causadoras de meningites bacterianas agudas em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique / Aquino Albino Nhantumbo. – Maputo, 2015.
xv, 104 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.
Bibliografia: f. 63-83

1. M-qPCR. 2. Meningite bacteriana pediátrica. 3. Moçambique. I.
Título.

CDD 616.82

DEDICATÓRIA

Dedico com muito amor este trabalho

Ao meu querido pai Albino Nhantumbo e à minha querida mãe Judite Manuel, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade.

Faço da minha conquista o instrumento de gratidão por tudo que recebi de vocês e ambos são o meu exemplo de coragem, no qual me guio para dar continuidade aos meus ideais.

Aos meus amados irmãos, sobrinhos e à todos os familiares,

Ao Dr. Eduardo Samo Gudo, orientador a quem serei sempre grato pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos e pela amizade concedida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo (Orientador)

Pela confiança e por ter-me aceite como seu estudante, para mim foi um orgulho tê-lo como orientador. Obrigado pela sua supervisão, orientação, dedicação, atenção e empenho no decorrer deste trabalho e por ter incentivado e investido com sabedoria no meu crescimento científico. Este projecto foi possível porque um profissional determinado, sábio e capaz esteve por perto. Também agradeço por ter assumido toda parte de cooperação internacional exigida para o meu estágio no Brasil. Tenho como exemplo a sua competência e perseverança com as quais faz ciência, grande admiração!

Ao Prof. Dr. Milton Ozório Moraes (Co-orientador)

Estou muito grato por sempre acreditar no meu potencial, e pela confiança transmitida, obrigado pela supervisão, orientação, atenção acima de tudo pelos incentivos e apoios tão importantes para execução final deste trabalho, o meu muito obrigado.

Aos responsáveis das instituições onde os trabalhos foram realizados

Pela disponibilidade dos meios (infra-estruturas, equipamentos, reagentes, materiais e outros) utilizados no decurso deste trabalho, tanto em Moçambique assim como no Brasil, respectivamente Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo (Director Científico do INS) e Prof. Dr. Vlademir Cantarelli (Laboratório Qualitá, Novo Hamburgo, Rio Sul) e Prof. Dr. Cícero Dias (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UFCSPA), respectivamente. Extensivo agradecimento ao Prof. Dr. Ilesh Jani (Director geral do INS), pelas contribuições que tem dado ao INS em todos os domínios.

Aos participantes do estudo

Aos pais e/ou titulares legais dos pacientes que aceitaram participar do estudo, vossa colaboração foi importante, muito obrigado.

Aos colegas do laboratório de referência nacional de microbiologia do INS

Meus agradecimentos a todos os colegas do Laboratório de microbiologia que receberam e processaram as amostras, garantindo resultados a tempo real para o atendimento das

crianças. Especial agradecimento aos técnicos Arlindo Cuco e Octávio Alfredo, extensiva gratidão ao José Paulo Langa (chefe do Laboratório) pelos ensinamentos de técnicas de Biologia Molecular e pela amizade.

Aos pontos focais de vigilância de meningite

Clínica: aos médicos Dr. Tomáz Zimba e Dra. Eugénia Macassa (HCM); Dra. Alinea José Pedro (HCB) e Dr. Mulaja Kabeya Etienne (HCN), que carinhosamente atenderam as crianças, colheram as amostras, preencheram os formulários de notificação de casos de meningite e cuidaram delas durante o período de internamento, muito obrigado pela vossa contribuição.

Laboratório de microbiologia: aos técnicos Raul e Calvina (HCM); Aventina Artur, Ramalho Chau e Alberto Muanido (HCB) e Siasa Mendes e Natálio Daudo (HCN) que receberam e processaram as amostras, garantindo resultados a tempo real para o atendimento das crianças. Completaram os formulários, acondicionaram as amostras e garantiram o envio das mesmas ao Laboratório Nacional de Referência de Microbiologia do INS, muito obrigado pela vossa contribuição.

Aos demais departamentos do INS (Departamentos de Pesquisa, Formação e comunicação, vigilância, Plataformas Tecnológicas e Rede de Laboratórios e Serviços de Referência), e a todos os colgas que de forma directa e indirecta foram indispensáveis para realização deste trabalho, obrigado pela vossa colaboração. Expresso o meu agradecimento a Prof^a. Dra. Nilsa de Deus (Chefe do Departamento de Pesquisa), pela atenção prestada durante a minha estadia no Brazil, sempre esteve presente em momentos mais felizes e que também apoiou em momentos mais difíceis, minha eterna gratidão, você é especial.

Aos membros de vigilância de meningite

Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo, Prof. Dr. Inácio Mandomando, Dr. Tomáz Zimba, Dr^a. Cynthia Semá, Dr^a. Eugénia Macassa, Dr^a. Alinea Pedro, Dr^a. Safrina Nhamuche, Dr^a. Criménia, Dr. Mulaja Kabeya Etienne, Siasa Mendes, Natálio Daúdo, Aventina Artur, Dr.

Frequência e epidemiologia molecular das estirpes causadoras de meningites bacterianas agudas em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique

Alcides Munguambe, Dr^a. Lena Manhique e Dr^a. Charlotte Comé, Dr^a. Marla Amaro e Dr^a. Lorna Gurjal, meus sinceros agradecimentos por terem ajudado a implementar e a fortalecer o Sistema de Vigilância de Meningite. Obrigado pelos momentos partilhados.

Aos professores do curso de Mestrado em Ciências de Saúde INS-FIOCRUZ

Que se disponibilizaram a leccionarem as matérias, as quais foram muito importantes para aumento dos nossos conhecimentos científicos, muito obrigado.

Aos colegas de Pós-graduação

Agradeço aos colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração, amizade e pelo convívio durante estes anos.

RESUMO

Introdução: Na maioria dos países da África sub-sahariana, onde a meningite bacteriana aguda (MBA) continua a ser uma das principais causas de mortalidade infantil, a vigilância de MBA é baseada principalmente em cultura. Além disso, as amostras de LCR de baixa qualidade e alta frequência de consumo de antibióticos antes da colheita de amostras, leva a uma alta taxa de resultados falso-negativos. Este estudo foi realizado com o objetivo de descrever a epidemiologia e o perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos principais agentes etiológicos da MBA, isolados em amostras de crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique.

Metodologia: Durante o período de março de 2013 a março de 2014, foram colhidas amostras de LCR de crianças menores de 5 anos de idade, internadas, e que reuniram os critérios de definição de caso da OMS para MBA, em três hospitais (quaternários) regionais. Os exames macroscópicos e citológico, cultura e qPCR foram realizadas em todas as amostras.

Resultados: Das 369 amostras de LCR colhidas em crianças com suspeita clínica da MBA. A qPCR mostrou uma elevada taxa de detecção dos patógenos bacterianos quando comparada à cultura [52.3% (193/369) para M-qPCR contra 7.3% (27/369) para a cultura]. A frequência de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *S. agalactiae*, and foi de 32.8% (121/369), 12.2%, (45/369), 3.0% (16/369) and 4.3% (11/369), respectivamente, significativamente elevada quando comparada com resultados da cultura ($p < 0,001$ para cada). Idade inferior a 12 meses foi estatisticamente associadas a MBA. Todos os isolados de pneumococos ($n = 17$) foram sensíveis à ceftriaxona, e 11,8% (2/17) foram sensíveis à penicilina. Todos os isolados de *Hib* ($n = 5$) foram sensíveis à ampicilina e 80% (4/5) foram sensíveis à cloranfenicol. Entre os 3 isolados de meningococos, apenas um foi resistente à ampicilina, ceftriaxona e cloranfenicol (33,3%) para cada um. Todos os 2 isolados de *S. agalactiae* foram sensíveis à eritromicina, levofloxacina e ceftriaxona e todos eram resistentes à vancomicina e à ampicilina. Os serotipos mais prevalentes foram 1 (18,2), 5 (15,2), 14 (12,1), 9V (12,1), 23F (9,1), 6A (9,1), 4 (9,1) e 6B (6,1). A proporção de isolados pertencentes a serotipos incluídos nas vacinas PCV-7, PCV-10, e PCV-13 foram 45,5%, 63,6% e 81,8%, respectivamente. Os serotipos 1, 3, 4, 6B, 14 e 23F foram todos resistentes à penicilina, enquanto para a ceftriaxona, todos foram sensíveis.

Conclusão: Nossos achados mostram que a MBA é altamente prevalente em crianças com meningite e que *S. pneumoniae* foi a causa mais comum de meningite bacteriana aguda em crianças <5 anos de idade. Além disso, nossos dados demonstram que a cultura apresenta um rendimento baixo no diagnóstico da MBA, e sugerem fortemente que a qPCR deve ser incorporada nas actividades de vigilância de MBA. A introdução da PCV-13 pode ser vantajoso devido a emergência dos serotipos 3 e 6A em Moçambique.

ABSTRACT

Background: In Sub-Saharan Africa, including Mozambique, acute bacterial meningitis (ABM) represents a main cause of childhood mortality. The burden of ABM is seriously underestimated because of the poor performance of culture sampling, the primary method of ABM surveillance in the region. Low quality cerebrospinal fluid (CSF) samples and frequent consumption of antibiotics prior to sample collection lead to a high rate of false-negative results. To our knowledge, this study is the first to determine the frequency of ABM in Mozambique using real-time polymerase chain reaction (qPCR) and to compare results to those of culture sampling.

Method: Between March 2013 and March 2014, CSF samples were collected at 3 regional hospitals from patients under 5 years of age, who met World Health Organization case definition criteria for ABM. Macroscopic examination, cytochemical study, culture, and qPCR were performed on all samples.

Results: A total of 369 CSF samples were collected from children clinically suspected of ABM. qPCR showed a significantly higher detection rate of ABM-causing pathogens when compared to culture (52.3% [193/369] versus 7.3% [27/369], $p = 0.000$). The frequency of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and *S. agalactiae*, and were 32.8% (121/369), 12.2%, (45/369), 3.0% (16/369) and 4.3% (11/369), respectively, significantly higher compared to that obtained on culture ($p < 0.001$ for each). All pneumococci isolates ($n=17$) were susceptible to ceftriaxone, and 11.8% (2/17) were susceptible to penicillin. All Hib isolates ($n=5$) were susceptible to ampicillin and 80% (4/5) were susceptible to chloramphenicol. Among the 3 meningococci isolates, only one was resistant to ampicillin, ceftriaxone and chloramphenicol (33.3%) for each. All the 2 isolates of group B streptococci were susceptible to erythromycin, levofloxacin and ceftriaxone and all were resistant to vancomycin and ampicillin. The most common serotypes of *S. pneumoniae* were 1 (18.2%), 5 (15.2%), 14 (12.1%), 9V (12.1%), 23F (9.1%), 6A (9.1%), 4 (9.1%) and 6B (6.1%). Serotypes 1, 5, 9V, 6A and 12 were mostly prevalent in northern Mozambique, while serotypes 23F, 4, 6B, 3 and 15B were predominant in southern. Serotype coverage of PCV-10 and PCV-13 vaccine formulations were 81.8% and 93.9%, respectively. Serotypes 1, 3, 4, 6B, 14, 23F were resistant to penicillin and sensitive to ceftriaxone.

Conclusion: Our findings demonstrate that culture is less effective for the diagnosis of ABM than qPCR. The common use of culture rather than qPCR to identify ABM results in serious underestimation of the burden of the disease, and our findings strongly suggest that qPCR should be incorporated into surveillance activities for ABM. In addition, our data showed that *S. pneumoniae* represents the most common cause of ABM in children under 5 years of age. Introduction of PCV-13 would be advantageous because of emergence of news serotypes 3 and 6A in Mozambique.

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Pág.
Figura 1.	Meninges do encéfalo normal inflamado.....	5
Figura 2:	Taxa de incidência de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
Figura 3.	Aspecto microscópico de <i>S. pneumoniae</i> na amostra de LCR corado pelo método de Gram.....	9
Figura 4.	Cepas capsuladas e não capsuladas de <i>S. pneumoniae</i>	9
Figura 5.	Aspecto microscópico de <i>H. influenzae</i> na amostra de LCR corado pelo método de Gram.....	11
Figura 6:	Cinturão de meningite africano.....	12
Figura 7.	<i>N. meningitidis</i> na amostra de LCR, corado pelo método de Gram.....	13
Figura 8:	Distribuição global dos serotipos de <i>N. meningitidis</i> por país e por região.....	13
Figura 9.	Mecanismo fisiopatológico de meningite pneumocócica.....	17
Figura 10.	Mecanismo de a adesão de <i>S. pneumoniae</i> , invasão, multiplicação, reconhecimento por APCs.....	19
Figura 11.	Localização dos hospitais centrais em Moçambique.....	28
Figura 12:	Morfologia das colônias de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
Figura 13.	Teste de optoquina em cultura de <i>S. pneumoniae</i>	32

Figura 14. Teste de bile solubilidade.....33

Figura 15. **A:** Morfologia das colônias de *H. influenzae*, **B:** Teste de satelitismo para identificação de *H. influenzae*.....33

Figura 16. **A:** Morfologia das colônias *N. meningitidis*, **B:** teste de oxidase e **C:** provas de identificação.....34

Figura 17. Teste de CAMP para *S. agalactiae* (CAMP positivo).....35

Figura 18. Placa de antibiograma de *S. pneumoniae* (método de disco difusão).....36

Figura 19. Placas de antibiograma para *S. pneumoniae* (método de E-Teste).....38

Figura 20: Curvas de dissociação dos controlos positivos de *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae*.....39

Figura 21: Curvas de dissociação de amostras positivas para *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*.....40

Figura 22. PCR multiplex sequencial. Dedução dos serotipos capsulares de *S. pneumoniae*.....42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Proporção de amostras positivas para *S. pneumoniae* e de outros patógenos em amostras de LCR de casos suspeitos de meningite em Moçambique de 2013 – 2014, usando M-qPCR.....45

Gráfico 2. Variação mensal de frequência de amostras colhidas e testadas e a frequência relativa de espécies bacterianas em crianças <5 anos de idade usando M-qPCR.....46

Gráfico 3. Distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* e proporção de isolados pertencentes a serotipos incluídos nas vacinas. NV indica serotipos não vacinais.....50

Gráfico 4. Distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* mais frequentes por região geográfica.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupo de risco para os principais agentes etiológicos da MBA.....7

Tabela 2. Ajuste das temperaturas, tempos, número de repetições por ciclo e função de cada etapa para reacção de PCR no termociclador.....41

Tabela 3. Desempenho da técnica de M-qPCR em comparação com a cultura.....44

Tabela 4. Estratificação de idade de pacientes com MBA, baseado no M-qPCR.....45

Tabela 5. Análise univariada e multivariada.....47

Tabela 6. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos patógenos de MBA.....48

Tabela 7. Distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* de acordo com os grupos etários de crianças menores de 5 anos de idade.....50

Tabela 8. Perfil de susceptibilidade dos serotipos de *S. pneumoniae* isolados em amostras de LCR.....52

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Formulário de notificação de casos de meningite.....84

Anexo 2. Fluxograma geral de testagem.....86

Anexo 3. Reacções, serotipos, sequência e concentração de iniciadores e produto de PCR.....85

ÍNDICE	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. JUSTIFICAÇÃO.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
5. METODOLOGIA	27
5.1 ÁREA DE ESTUDO	27
5.2 DESENHO DE ESTUDO E DEFINIÇÃO DE CASO DE MBA	28
5.3 REGISTO DOS CASOS DE MBA E COLHEITA DE AMOSTRAS DE LCR.....	29
5.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL (MICROBIOLÓGICO).....	30
5.4.1 EXAME MACROSCÓPICO DO LCR.....	30
5.4.2 EXAME CITOQUÍMICO DO LCR.....	30
5.4.3 EXAME MICROSCÓPICO DO LCR.....	30
5.4.4 CULTURA DOS ISOLADOS DE LCR.....	30
5.4.5 IDENTIFICAÇÃO DE S. PNEUMONIAE.....	31
5.4.6 IDENTIFICAÇÃO DE H. INFLUENZAE.....	33
5.4.7 IDENTIFICAÇÃO DE N. MENINGITIDIS	34
5.4.8 IDENTIFICAÇÃO DE S. AGALACTIAE.....	35
5.4.9 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	36
5.4.10 TESTAGEM MOLECULAR	38
5.4.10.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRA DE LCR E ISOLADOS	38
5.4.10.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS PATÓGENOS DE MBA POR M-QPCR.....	38
5.4.10.3 SEROTIPAGEM DOS PNEUMOCOCOS	40
5.4.10.4 ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE	41
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
6. RESULTADOS	44
7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÃO	62
9. BIBLIOGRAFIA.....	63

ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
ATCC	Coleções de Culturas Tipo Americanas (do inglês <i>American Type Culture Collection</i>)
BGN	Bacilos gram negativos
BHE	Barreira hematoencefálica
Cbp	Proteínas de ligação à colinas (Cbp, do inglês <i>choline binding protein</i>)
CDC	Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC, do inglês <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI, do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
DGN	Diplococos gram negativos
DGP	Diplococos gram positivos
dL	decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	trifosfato de deoxiribonucleotídeos
EUA	Estados Unidos de América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCB	Hospital Central da Beira
HCM	Hospital Central de Maputo

HCN	Hospital Central de Nampula
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>)
INE	Instituto Nacional de Estatística
INS	Instituto Nacional de Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LNRM	Laboratório Nacional de Referência de Microbiologia
MBA	Meningite bacteriana aguda
mg	miligramas
MISAU	Ministério da Saúde
mL	mililitros
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Factor de activação plaquetária
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBP	Proteínas de ligação à penicilina (do inglês <i>penicillin-binding proteins</i>)
PCR	Reacção da polimerase em cadeia (PCR, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)

PCV-7	Vacina pneumocócica conjugada heptavalente
PCV-10	Vacina pneumocócica conjugada decavalente
PCV-13	Vacina pneumocócica conjugada tridecavalente
PPV	Vacina pneumocócica polissacarídica
Psp	Proteínas de superfície pneumocócica
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacção da polimerase em cadeia em tempo real
SNC	Sistema nervoso central
UFC	Unidades formadoras de colónias
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

1. Introdução

A meningite bacteriana aguda (MBA) é uma das principais causas de morbimortalidade infantil no mundo (Dash *et al.*, 2008; Peltola, 2001; Theodoridou *et al.*, 2007), acometendo também indivíduos idosos e imunossuprimidos de todas idades (Black *et al.*, 2010; Vanderkooi, 2011).

Estima-se que no mundo pelo menos 1,2 milhões de casos de MBA ocorrem por ano em crianças menores de 5 anos de idade, dos quais mais de 180.000 resultam em óbito (Edmond *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Mais de 50% dessas mortes acontecem nos países em desenvolvimento da África e Ásia, sendo a África Sub-sahariana a região com maior número de mortes (Luksic *et al.*, 2013; Peltola, 2001). Além da mortalidade, 10 a 20% dos sobreviventes desenvolvem sequelas neurológicas graves e muitas vezes irreversíveis, como surdez, cegueira, labirintite ossificante com perda auditiva e retardo neuropsicomotor (Ciana, 1995; Edmond *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

A MBA é uma doença infecciosa grave e potencialmente fatal, e constitui um problema de saúde pública a nível nacional e mundial, dado ao seu potencial epidêmico, sua letalidade e pela gravidade de sequelas. Embora existam vacinas altamente eficazes para os principais agentes etiológicos da MBA, esta doença, continua sendo uma das principais causas de hospitalização e mortalidade em crianças menores de 5 anos no continente africano (Adegbola *et al.*, 2005; Cowgill *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2013; Saha *et al.*, 2012). Por isso, o diagnóstico precoce e correcto, e a intervenção rápida, incluindo a terapia antibiótica, são vitais para melhorar o prognóstico destes pacientes (Modi & Anand, 2013; van de Beek *et al.*, 2012). A incidência média anual é mais elevada em África, estimando-se que ocorrem 143.6 novos casos por 100.000 pessoas, enquanto que na Ásia, Europa, América a incidência é estimada em 26.8, 20.8 e 16.6 casos por 100.000 pessoas, respectivamente (Luksic *et al.*, 2013).

Estudos realizados em África e outras regiões do mundo mostram que após o período neonatal, a MBA é causada principalmente por uma tríade de espécies: *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis*, que representam cerca de 90% dos casos confirmados (Ciana, 1995; Kim, 2010; O'Brien *et al.*, 2003; Peltola, 2001).

Em Moçambique, dados sobre o peso da meningite bacteriana em crianças menores de 5 anos de idade são escassos. Além disso, dos poucos estudos existentes, foram realizados em dois diferentes hospitais no país (Sigauque *et al.*, 2008; Roca *et al.*, 2009; Zimba *et al.*, 2009; Ibarz-Pavon *et al.*, 2011). No entanto, os resultados desses estudos não são representativos para toda população pediátrica em Moçambique, uma vez que foram realizadas somente na região sul de Moçambique e, não há dados disponíveis para outras regiões do país. O conhecimento sobre a epidemiologia de MBA em outras regiões do país é cruciais para melhor entendimento da epidemiologia a nível nacional e para a tomada de decisões de saúde pública.

Os métodos clássicos de diagnóstico de meningites bacterianas são a bacterioscopia, a cultura, e a pesquisa de antígenos capsulares pelo teste de látex, sendo a cultura considerada o padrão ouro. A sensibilidade desses métodos (Gram e cultura) é afectada por uma série de factores, tais como o uso prévio de antibióticos antes da punção lombar, a demora no envio de amostra ao laboratório e a disponibilidade local de laboratório de microbiologia (Bell & McCormick, 1981; Thomson & Bertram, 2001; Wu *et al.*, 2013). A prática de administração precoce de antibióticos parenterais antes da punção lombar é apontada como factor crucial na redução da sensibilidade da cultura e, conseqüentemente, do percentual dos casos confirmados de meningite bacteriana (Corless *et al.*, 2001). Assim, a implementação da técnica da reacção da polimerase em cadeia (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) para o diagnóstico etiológico das MBA tem sido fortemente proposta como uma ferramenta de diagnóstico alternativo para superar a baixa sensibilidade e outras desvantagens técnicas relacionadas com a cultura, e tem aumentado significativamente a taxa de detecção dos patógenos da meningite bacteriana (Black *et al.*, 2010; Brouwer *et al.*, 2010b; Bryant *et al.*, 2004; Chavez-Bueno & McCracken, 2005).

A confirmação laboratorial precoce e eficaz de patógenos que causam a MBA é fundamental não só para o manuseio clínico dos pacientes, mas também para o monitoramento do impacto da vacinação contra a meningite bacteriana, uma vez que muitos países estão implementando vacinas contra os principais patógenos da MBA nos

programas rotineiros de vacinação (Clark *et al.*, 2013; Commey *et al.*, 1994). Em Moçambique, a vacina conjugada contra *Hib* e a vacina pneumocócica conjugada decavalente (PCV-10) foram introduzidas em Abril de 2009 e Abril de 2013, respectivamente. A monitorização do impacto dessas vacinas através de vigilância de base laboratorial é fundamental. Em Moçambique, a vigilância de MBA é fraca, tradicionalmente concentrada no sul do país e baseada principalmente em métodos tradicionais (ex.: cultura) por muitos anos. Recentemente, o Laboratório Nacional de Referência de Microbiologia expandiu a vigilância de MBA para outras duas regiões (centro e norte) e implementou a PCR em tempo real.

A emergência de estirpes resistentes a antibióticos e a múltiplas drogas, especialmente as estirpes de *S. pneumoniae*, vem aumentando em todo mundo, o que representa um grande problema para o tratamento das meningites bacterianas agudas (Arbique *et al.*, 2004; Corless *et al.*, 2001). A resistência do pneumococo à penicilina aumentou rapidamente a partir da década de 1980, e actualmente essas estirpes são encontradas em todo o mundo, com taxas acima de 70% (Appelbaum, 1996; Greenberg *et al.*, 2002; WHO, 2014). Em relação a Ásia, a resistência do pneumococo à penicilina é de 58% a 74.5% (Dagan *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 2002; Isaacman *et al.*, 2010; Kam *et al.*, 1996; Lyon *et al.*, 1996; Mastro *et al.*, 1991; Song *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2012). Na Europa as taxas de resistência variam de 23% a 56.7% (Isaacman *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2013a; Jones *et al.*, 2014). Um estudo recente realizado na América Latina sobre o perfil de susceptibilidade de *S. pneumoniae* aos antibiótico mostrou uma taxa de resistência à penicilina de 70% (Mott *et al.*, 2013). Em África, a resistência à penicilina varia de 45 a 72.8% (Tali-Maamar *et al.*, 2012; von Gottberg *et al.*, 2013). A resistência de *S. pneumoniae* à penicilina e a beta-lactâmicos está associada a mutações das proteínas de ligação da penicilina (PBP), resultando na diminuição da afinidade da penicilina aos PBPs (Jacoby, 1994; WHO, 2014). O impacto das resistências à penicilina e a múltiplas drogas resulta no prolongamento das doenças e aumento da mortalidade no mundo (WHO, 2014). Assim, o presente estudo teve como objectivos i) Determinar e comparar a frequência de patógenos envolvidos na etiologia da MBA com base na cultura e M-qPCR, ii) Determinar o perfil de susceptibilidade aos

Frequência e epidemiologia molecular das estirpes causadoras de meningites bacterianas agudas em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique

antibióticos, iii) e determinar a frequência e a distribuição dos serotipos capsulares de *S. pneumoniae* associados a meningite em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique.

2. Revisão de literatura

As meninges são as membranas que revestem o sistema nervoso central (SNC) e são formadas por três camadas: a pia-máter, a mais interna e em íntima relação com o parênquima do cérebro e da medula espinhal, a dura-máter, a mais externa, aderida ao revestimento ósseo, e a aracnoide, entre as duas primeiras (Figura 1). O líquido cefalorraquidiano (LCR) ou líquor circula no espaço entre a aracnoide e a pia-máter. O LCR é produzido maioritariamente (85%) nos plexos coróides, localizados no sistema ventricular, sendo o restante produzido por difusão do parênquima através da pia-máter (Ross *et al.*, 1993).

A meningite é definida como um processo inflamatório envolvendo as leptomeninges (pia-máter e aracnoide) (figura 1A), caracterizada pela migração de glóbulos brancos (leucócitos), detectável no exame microscópico. Quando esse processo infeccioso estende-se ao parênquima cerebral e à medula espinhal, o quadro é definido meningoecefalite (Ayieko & English, 2007). Alternativamente, o processo infeccioso pode acometer apenas o cérebro, na ausência de resposta inflamatória no espaço subaracnoídeo, neste caso, denominado encefalite (Girgis *et al.*, 1993).

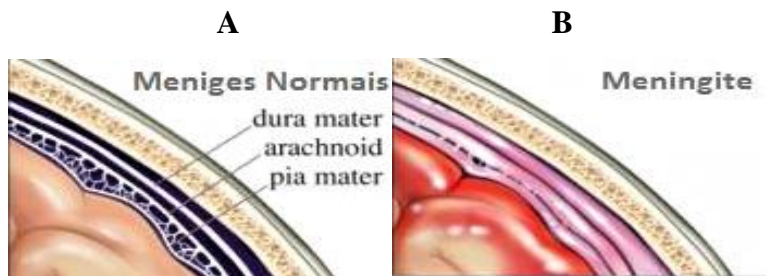


Figura 1. A: meninges do encéfalo normal; B: meninges do encéfalo com inflamação
Fonte: http://www.ninds.nih.gov/disorders/encephalitis_meningitis/detail_encephalitis_meningitis.htm. Acessado em 24 de Dezembro de 2014

As meningites podem ser causadas por diferentes agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos, helmintos e protozoários) e não infecciosos (neoplasias, drogas, doenças inflamatórias e granulomatosas). Quanto ao tempo de evolução podem ser classificadas como agudas (normalmente bacteriana e viral), quando o quadro clínico inicia em horas até 7 dias e meningite subaguda ou crônica (normalmente bacteriana ou fúngica), quando

ocorre por mais de uma semana. Geralmente, a meningite crônica ocorre em indivíduos com o sistema imune comprometido. Quanto ao tipo de expressão inflamatória, as meningites são divididas em linfocitárias e neutrofílicas ou purulentas. As meningites bacterianas são na sua maioria de evolução aguda e com padrão neutrofílicas (Tunquel, 2005).

O quadro clínico de uma meningite bacteriana aguda ou supurativa é caracterizada por início súbito de febre ($> 38^{\circ}\text{C}$ de temperatura axilar ou $> 38,5^{\circ}\text{C}$ de temperatura rectal), rigidez da nuca, abaulamento da fontanela (crianças menores de 12 meses), perda de consciência, convulsões, sinais neurológicos focais, irritabilidade, dificuldade em alimentar (neonatos), sonolência e outros sinais meníngeos, embora nem todos os sinais e sintomas estejam presentes num dado paciente (WHO, 2001).

O diagnóstico de meningite é baseado na suspeita clínica, porém o diagnóstico definitivo é estabelecido com base em resultados dos exames laboratoriais do LCR. O LCR normal é claro, não contém hemácias, o número de leucócitos não ultrapassa cinco células/ mm^3 , sendo virtualmente 100% do tipo mononuclear (linfócitos e monócitos), tem uma concentração de glicose entre 45 e 100 mg/dl, dependendo do nível de açúcar no sangue, uma concentração protéica entre 14 e 45 mg/dl, e é estéril (Nathan, 1999). Porém, na MBA o LCR geralmente torna-se turvo ou purulento, como consequência do aumento do conteúdo de células polimorfonucleares e do nível de proteínas, assim como pela presença de bactérias. Na MBA são observados tipicamente pleocitose neutrofílica que varia de 10 a >10.000 leucócitos, hipoglicorraquia (< 40 mg/dL) e hiperproteínoorraquia (geralmente $>$ de 100 mg/dL) (Tunquel, 2005).

As bactérias envolvidas na etiologia das MBA variam de acordo com o grupo etário e outros factores de risco. A MBA dos neonatos (até 28 dias de vida) geralmente resulta de infecções adquiridas da mãe, no útero, durante o período gestacional ou no canal vaginal, durante parto (Bale & Murph, 1997; Ziai & Haggerty, 1958). Outro mecanismo reportado é a transmissão horizontal através das mãos contaminadas dos profissionais de saúde

(Tunquel, 2005). As bactérias usualmente responsáveis pela MBA nas diferentes faixas etárias e em certos grupos de risco estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1: Grupo de risco para os principais agentes etiológicos da MBA

Factor de risco	Patógenos bacterianos
Idade	
< de 28 meses	<i>S. agalactiae, Escherichia coli</i>
1 a 3 meses	<i>S. agalactiae, E. coli, S. pneumoniae, H. influenzae e N. meningitidis</i>
4 meses a 5 anos	<i>N. meningitidis, S. pneumoniae e H. Influenzae</i>
6 a 50 anos	<i>N. meningitidis e S. pneumoniae</i>
Mais de 50 anos	<i>N. meningitidis, S. pneumoniae, bastonetes gram negativos (BGN) aeróbios e L. monocytogenes</i>
Indivíduos com resposta imunológica comprometida por doenças congénitas, ou adquirida (pacientes com HIV) e/ou por tratamento com imunossuppressores	<i>N. meningitidis, S. pneumoniae, BGN (incluído <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Lysteria monocytogenes</i></i>
Indivíduos que vivem em aglomerados e ambientes fechados; infecções por vírus respiratórios	<i>S. pneumoniae, N. meningitidis e H. Influenzae</i>
Portadores de anemia hemolítica e falciforme, tabagismo, fractura craniana e fístula liquórica	<i>S. pneumoniae</i>
Traumatismo craniano e neurocirurgia	<i>Staphylococcus aureus, S. epidermidis e BGN aeróbicos (incluindo <i>P. aeruginosa</i>)</i>

Fonte: (Briks & Berezin, 2006; Winn *et al.*, 2006)

2.1 Epidemiologia

2.1.1 Meningite pneumocócica

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é um dos principais agentes etiológicos de otite média, sinusites, bacteriemia, pneumonia, sepse e meningite em crianças em todo o mundo, acometendo também indivíduos idosos e imunossuprimidos de todas as idades. É mais frequente em crianças menores de 2 anos e adultos maiores de 65 anos (Black *et al.*,

2007; Vanderkooi, 2011) e facilmente é transmitido por aerossóis (gotículas de secreções) de pessoa para pessoa (O'Brien *et al.*, 2003).

Estima-se que no mundo morrem por ano mais de 100.000 crianças por meningite pneumocócica (Greenwood, 1999; Mook-Kanamori *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2009). A incidência anual de infecções causadas por *S. pneumoniae* apresentam uma variação quanto a região (figura 2). Em África a taxa de incidência de meningite pneumocócica varia de 12 a 38 casos por 100.000 habitantes por ano (Kisakye *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2009; O'Dempsey *et al.*, 1996) e nos países desenvolvidos varia de 1.1 a 10 casos por 100.000 habitantes (Berg *et al.*, 1996; O'Brien *et al.*, 2009).

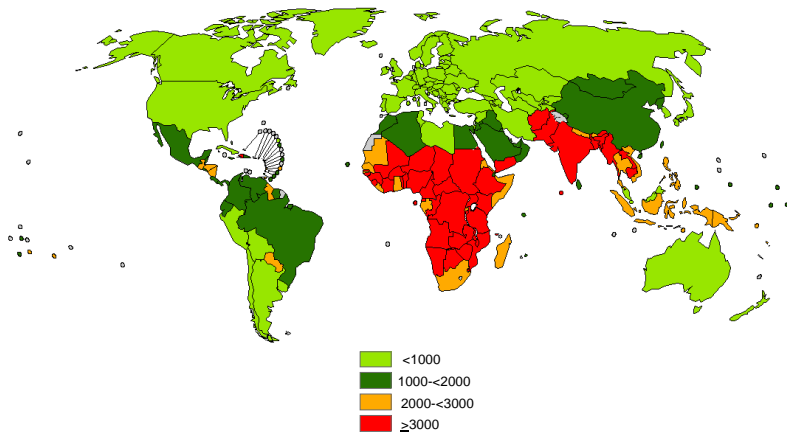


Figura 2: Taxa de incidência de *Streptococcus pneumoniae* (por 100,000 crianças menores de 5 anos).

Fonte: http://www.who.int/entity/nuvi/pneumococcus/db_pneumo1.ppt. Acessado em 19 de Dezembro de 2014.

O *S. pneumoniae* pertence ao reino Monera; filo Firmicutes; classe Bacilli; ordem Lactobacillales; família Streptococcaceae; gênero *Streptococcus*; espécie *Streptococcus pneumoniae* (Arbique *et al.*, 2004), é uma bactéria gram positiva, e apresenta-se em forma de cocos lanceolados, comumente agrupados aos pares, também chamado de diplococos (figura 3).

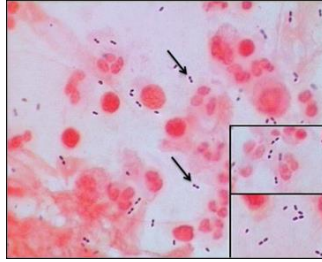


Figura 3. Aspecto microscópico de *S. pneumoniae* na amostra de LCR corado pelo método de Gram.

Fonte: <http://www.microbelibrary.org>.

Como todos os estreptococos, os pneumococos são cocos (bactéria de forma arredondada), com um diâmetro que varia entre 0,5 e 1,2 μm . São anaeróbios facultativos. As estirpes patogénicas possuem cápsula na sua parede celular (figura 4A e 4B). Esta bactéria produz pneumolisina ou α -hemolisina, enzima que degrada parcialmente a hemoglobina, com conseqüente formação de um halo verde em redor das colónias de pneumococos em placas de ágar sangue (Winn *et al.*, 2006). A cápsula polissacarídica presente na sua parede celular, confere-lhe uma maior virulência e escape do sistema imunológico do hospedeiro (Malley *et al.*, 2001). Em virtude dessas características a cápsula é utilizada na formulação de vacinas contra a meningite e outras doenças pneumocócicas (Brueggemann *et al.*, 2003; Hausdorff *et al.*, 2005).



Figura 4 (A e B): Cepas capsuladas e não capsuladas de *S. pneumoniae*
A: Bactéria encapsulada; **B:** Bactéria não encapsulada

Fonte: Coffey *et al.*, 1998.

As diferenças na constituição e composição da cápsula polissacarídica permitem classificar a bactéria em vários serotipos. Actualmente existem 95 serotipos, sendo os serotipos 11E, 6C, 6D e 20A e 20B recentemente descritos por Calix & Nahm, 2010; Bratcher *et al.*, 2010, Park *et al.*, 2007 e Calix *et al.*, 2012, respectivamente, porém, cerca

de 20% destes serotipos são virulentos com capacidade de causar a doença pneumocócica invasiva, principalmente a meningite pneumocócica (Scott *et al.*, 1996).

Globalmente, os serotipos mais frequentes são 1, 5, 6A, 6B, 14, 19F e 23F, sendo os serotipos 1, 5, 6A e 14 os mais frequentes em países em desenvolvimento, enquanto que os serotipos 19F, 6B, 23F e 14 são os mais frequentes em países desenvolvidos. Essa característica pode estar relacionada ao facto de que esses serotipos estão frequentemente associados a resistência aos antimicrobianos (Black *et al.*, 2010; Hausdorff *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 1996). A distribuição dos serotipos varia segundo a localização geográfica, sazonalidade, apresentação clínica e idade. Por exemplo, no nordeste da China (Beijing, Tianjin e Shenyang) predominam os serotipos 19F, 14, 19A, 6B e 23F (Ma *et al.*, 2013) enquanto que no sudeste (Nanjing, Wenzhou, Hefei e Shenzhen) predominam os serotipos 6B, 23F, 14, e 19F (Xue *et al.*, 2010).

Em relação a sazonalidade, um estudo realizado em dois países africanos (Burkina Faso e Togo) mostrou que os casos de meningite por pneumococos ocorrem entre os meses de Janeiro a Março, sendo o pico da doença no mês de Fevereiro, onde os serotipos mais predominantes eram 1, 2, 5 e 6A (Traore *et al.*, 2009).

Na Inglaterra, descreveram que os serotipos 18C, 19F, 6B, 14, 22F e 33F foram mais frequentes em crianças menores de 5 anos de idade, enquanto que nos adultos os serotipos mais encontrados foram 6A, 10A, 23A, 35F, 6C e 18C (van Hoek *et al.*, 2012).

Em relação a África, os serotipos 1, 5, 6A e 14 são os mais prevalentes em crianças menores de 5 anos de idade (Black *et al.*, 2010), sendo o serotipo 1 associado a surtos de meningite em Ghana e Burkina Faso (Leimkugel *et al.*, 2005; Yaro *et al.*, 2006b). Em outras partes do mundo, como por exemplo em Canadá, o serotipo 5 foi descrito como a principal causa de surtos de meningite (Vanderkooi, 2011).

2.1.2 Meningite por *H. influenzae*

H. influenzae foi a causa mais comum de meningite bacteriana antes da introdução de vacinas, principalmente em crianças de 1 mês a 2 anos, com pico de incidência entre 6 e 12 meses de idade (Kaplan, 1999; Saez-Llorens & O'Ryan, 2001). A incidência anual de

meningite por *Hib* na África sub-sahariana varia entre 50 a 60 casos por 100.000 crianças menores de 5 anos de idade. O impacto da introdução da vacina conjugada *Hib* na redução das doenças invasivas é significativo em vários países de África (Adegbola *et al.*, 2005; Cowgill *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2013). Por exemplo, em Gâmbia, a taxa de incidência de meningite por *Hib* diminuiu em 90%, após um a quatro anos de introdução da vacina na rotina de imunização (Mulholland *et al.*, 1997).

O *H. influenzae* pertence à família Pasteurellaceae e apresenta-se como um cocobacilo gram negativo, aeróbico (figura 5), classificado em 6 serotipos (a, b, c, d, e, f), pela diferença antigénica da cápsula polissacarídica (Murray, 2006). A bactéria não capsulada está presente nas vias respiratórias de forma endógena e pode causar infecções assintomáticas ou doenças não invasivas, como a bronquite, sinusite e otite. A forma capsulada, principalmente *H. influenzae* do tipo b (*Hib*), é responsável por mais de 95% dos casos de doença invasiva, provocando bacteremias a partir de sítios infecciosos e evoluindo para meningite, septicemia, pneumonia, epiglote, artrite séptica, osteomielite e pericardite (Peltola, 2000; Ulanova & Tsang, 2014). *H. influenzae* frequentemente coloniza o trato respiratório superior e a transmissão ocorre através de contacto com gotículas de secreções (Barbour, 1996).

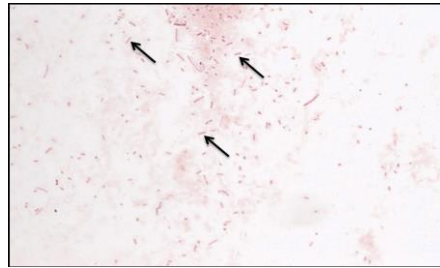


Figura 5. Aspecto microscópico de *H. influenzae* na amostra de LCR corado pelo método de Gram.

Fonte: WHO, 2011

2.1.3 Meningite meningocócica

N. meningitidis, também designada de meningococo, produz um amplo espectro clínico de doença, incluído patologias focais e invasivas, sendo a meningite a forma mais grave e, é a principal causa da doença meningocócica epidémica especialmente no

cinturão africano de meningite (Senegal a Etiópia) (figura 6). A meningite meningocócica é a mais grave e altamente transmissível. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 5-10% das pessoas que contraem a doença meningocócica morrem, e muitas vezes dentro de 24-48 horas após os primeiros sintomas, mesmo se eles são diagnosticados e recebem tratamento precoce apropriado (WHO, 2002). Sem tratamento, a taxa de mortalidade por doença meningocócica é de 70 a 90%. A meningite meningocócica ocorre principalmente em crianças com idade entre 3 meses e 5 anos, adolescentes e adultos, com pico de incidência em crianças maiores de 3 anos de idade. O meningococo para além de causar infecções nas meninges, tem a capacidade causar sepse, uma infecção generalizada, e como a *Hib* e pneumococo é transmitido por aerossóis (Stephens *et al.*, 2007).



Figura 6: Cinturão africano de meningite. Países da África sub-sahariana com elevado risco epidémico por meningite meningocócica.

Fonte: WHO, 2011

N. meningitidis é membro da família Neisseriaceae, apresenta-se em forma de um diplococo gram negativo (fig. 7). É imóvel, não esporulada, fermentadora de glicose e maltose, possui cápsula e fimbrias. É classificado em 13 serogrupos com base na sua constituição capsular: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y e Z. Destes, somente os serotipos A, B, C, W-135 e Y são a causa mais comum de doenças invasivas, especialmente a meningite (Harrison, 2006).

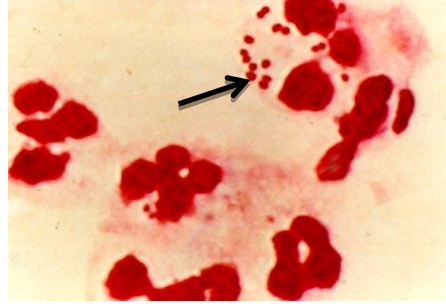


Figura 7. *N. meningitidis* na amostra de LCR, corado pelo método de Gram.

Fonte: WHO, 2011

O serogrupo A é responsável por mais de 80% das epidemias na África sub-sahariana e Ásia, e os serogrupos B e C são mais comuns Europa, Austrália, e América (figura 8) (Rosenstein, 2001; WHO, 2013).

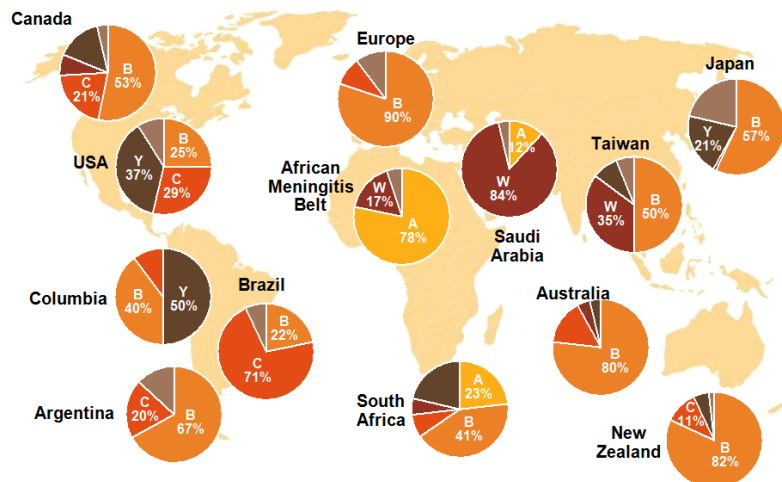


Figura 8: Distribuição global dos serotipos de *N. meningitidis* por país e por região

Fonte: http://www.nfid.org/pdf/meningitis/FINALChanging_Epidemiology_of_Meningococcal_Disease.pdf. Acessado em 19 de Dezembro de 2014

2.1.4 Factores de virulência

2.1.4.1 *S. pneumoniae*

A cápsula polissacarídica é o principal factor de virulência do *S. pneumoniae*, conferindo a este maior capacidade de resistir à opsonização, fagocitose e morte celular pelas células fagocíticas (Hausdorff *et al.*, 2005; Mac and Kraus, 1950; Wasfy *et al.*,

2005). Além da cápsula, outros factores de virulência incluem parede celular, as proteínas de ligação à colinas (Cbp, do inglês *choline binding protein*), que são um grupo de moléculas responsáveis pela adesão do patógeno às células do epitélio da nasofaringe, permitindo a colonização do hospedeiro, e pelo processo de endocitose, que permite a invasão do epitélio e consequente bacteremia e disseminação hematogênica; proteínas de superfície do pneumococo A e C (PspA e PspC), que impedem a ligação da componente C3 do complemento na superfície pneumocócica; neuraminidase, que contribui para o processo de adesão às células epiteliais (Baril *et al.*, 2006; Briles *et al.*, 1997; Shaper *et al.*, 2004); hialuronidase (*Hyl*), que facilita a propagação dos microorganismos nos tecidos; IgA₁ protease, que inactiva a IgA secretora, facilitando a colonização do microorganismo e a invasão subsequente das mucosas (Berry *et al.*, 1994); a enolase (Eno) e a proteína de adesão e virulência (PavA) são duas adesinas de superfície de pneumococo que se ligam as componentes da matriz extracelular fibronectina e plasminogénio, respectivamente. A pneumolisina inibe a actividade bactericida das células fagocíticas, interrompe a motilidade celular, estimula a produção de citocinas pelos macrófagos [IL-1, IL-8 e factor de necrose tumoral (TNF)] e activa a via clássica do complemento (Cockeran *et al.*, 2002a; Cockeran *et al.*, 2002b; Rubins *et al.*, 1996) autolisina A (*Lyt A*), que actua no processo da degradação da bactéria na fase exponencial de crescimento, causando a dispersão lítica da pneumolisina e α -hemolisina, as proteínas transportadoras de metais (Psa A), proteínas aquiridoras de ferro A (Pia A), proteínas exportadoras de ferro (Piu A), estão envolvidas na resistência ao *stress* oxidativo, figura 4A (Kadioglu *et al.*, 2008), o pili, que é um apêndice flexível e filiforme localizado na superfície das bactérias, participa no processo de adesão e estimula a resposta inflamatória do hospedeiro. Ácido teicóico e lipoteicóico e o peptidoglicano, desencadeiam resposta inflamatória (Barocchi *et al.*, 2006; Gianfaldoni *et al.*, 2007; Tai, 2006).

2.1.4.2 *H. influenzae*

Estruturalmente, *H. influenzae* possui uma variedade de factores de virulência que o ajudam na colonização e persistência dentro do hospedeiro, incluindo lipooligosacarídeos (LOS), adesinas, proteínas associadas a opacidade (OapA), as proteases IgA₁, a cápsula e fimbrias. A cápsula é a estrutura que protege o *H. influenzae*

da fagocitose e do reconhecimento do sistema imunitário; as fimbrias (adesinas), funcionam como mediadoras de adesão às células da mucosa do trato respiratório; o LOS é um componente estrutural da membrana celular externa e contribui de forma importante para patogenicidade deste microrganismo.

2.1.4.3 *N. meningitidis*

Estirpes de *N. meningitidis* são frequentemente encapsulados. A cápsula é um dos factores de virulência de *N. meningitidis* responsável pela capacidade do agente de resistir à fagocitose e à morte intracelular por células fagocíticas. Proteínas da membrana externa como por exemplo as porinas do tipo A e B (Por A e B), perfuram e penetram nas membranas das células hospedeiras e dos fagolisossomas, e induzem a apoptose, facilitando portanto a infecção e a invasão do hospedeiro (Mueller *et al.*, 2006; Rosenstein *et al.*, 2001), proteínas associadas à opacidade (Opa e Opc) e lipooligossacarídeos (LOS), promovem a aderência das bactérias às células epiteliais e aos neutrófilos, fimbrias (pili), medeiam a inserção dos microrganismos nas células da mucosa da nasofaringe e IgA₁ protease, inactiva a IgA secretora, facilitando a colonização do microrganismo e a invasão subsequente das mucosas (Rosenstein *et al.*, 2001).

2.1.5 Fisiopatologia de meningite bacteriana

A história natural de meningite bacteriana inicia com a colonização da mucosa da nasofaringe pela bactéria. *S. pneumoniae* adere às células epiteliais através de colinas de ligação de proteínas (Cbps), neuraminidase (Nan A e Nan B), enquanto que *N. meningitidis* e *H. influenzae* fixam-se às células epiteliais da mucosa através de fimbrias e de proteínas associadas a opacidade (Opa e Opac). Estes patógenos tem a capacidade de segregar proteases IgA₁, que clivam a IgA secretora neutralizando a capacidade da imunoglobulina agregar e opsonizar bactérias, o que promove a ligação ao epitélio da nasofaringe (figura 9B) (Kerr *et al.*, 2005; Kirkeby *et al.*, 2000; Koedel *et al.*, 2002; Weiser *et al.*, 2003). Após a fixação às células epiteliais, as bactérias conseguem atravessar o epitélio passando entre as células, por endocitose ou transporte através de

células epiteliais e entram na circulação causando bacteremia (Mook-Kanamori *et al.*, 2011).

Para além disso, os monómeros de proteases bacterianas clivados inibem a ligação dos anticorpos IgG e IgM, de forma a reduzir ainda mais a eficiência do sistema imune humoral do hospedeiro (Koedel *et al.*, 2002; Mook-Kanamori *et al.*, 2011). O outro mecanismo de acesso dos patógenos à corrente sanguínea ocorre através do processo de translocação intracelular, intercelular e pericelular. O processo de translocação intracelular ocorre por dois mecanismos: primeiro, a fosforilcolina (ChoP) liga-se ao receptor do PAF das células epiteliais activadas (figura 9D) (Cundell *et al.*, 1995). A ChoP ao ligar-se ao receptor PAF é transportado para a membrana basal da célula epitelial hospedeira, e posteriormente para corrente sanguínea (Cundell *et al.*, 1995; Radin *et al.*, 2005). O segundo mecanismo envolve a ligação CbpA (também conhecida por PspC ou SpsA) ao receptor da imunoglobulina polimérica (pIgR). Após a ligação, o pneumococo é transportado à membrana basal e apical da célula epitelial e posteriormente para corrente sanguínea (Figura 9D) (Mook-Kanamori *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2000).

Outro processo de translocação inter e pericelular, o plasminogénio liga-se aos receptores enolase, gliceraldeído-3-fosfato (Gly3Ph) e a esterase da colina (CbpE) do pneumococo aumentando, deste modo, a adesão do pneumococo na superfície epitelial (Bergmann *et al.*, 2001, 2004; Mook-Kanamori *et al.*, 2011). Após a ligação ao plasminogénio, o pneumococo degrada as caderinas, componentes das ligações entre células epiteliais, permitindo o acesso dos pneumococos à membrana basal e a invasão subsequente da corrente sanguínea (figura 9E) (Mook-Kanamori *et al.*, 2011).

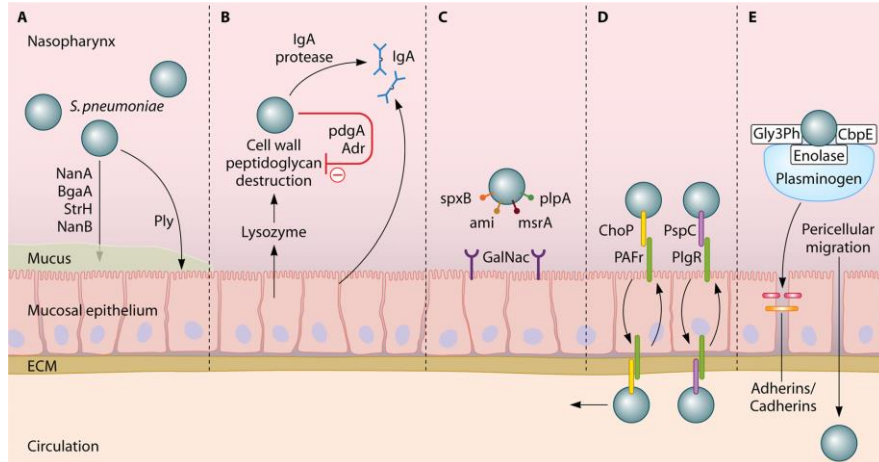


Figura 9. Mecanismo fisiopatológico da meningite bacteriana: (A) colonização de *S. pneumoniae* na nasofaringe. (B) Evasão de enzimas proteolíticas e a clivagem de IgA secretora. (C) Ligação do pneumococo as células epiteliais. (D) Translocação intracelular. (E) Translocação inter e pericelular através da ligação do plasminogênio aos receptores enolase, gliceraldeído-3-fosfato (Gly3Ph) e a esterase da colina (CbpE) do pneumococo. Fonte: Mook-Kanamori *et al.*, 2011

Uma vez na corrente sanguínea as bactérias são confrontadas com os mecanismos de defesa adicionais do hospedeiro, o sistema de complemento, que representa a primeira etapa de defesa da imunidade inata contra a bacteremia. As proteínas de superfície bacteriana como a Psp A e Psp C dos pneumococos e a cápsula polissacarídica das bactérias inibem a formação da C3 convertase, reduzindo a formação do factor C3b do complemento, e limitando a opsonização e fagocitose. A sobrevivência das bactérias no sangue deve-se principalmente às propriedades antifagocitárias da cápsula polissacarídica (Mook-Kanamori *et al.*, 2011).

Após a bacteremia, as bactérias atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) para entrarem no espaço subaracnoídeo. As proteínas de superfície bacteriana como a proteína PspC de *S. pneumoniae*, proteínas associadas à opacidade (Opa e Opc) de *N. meningitidis* e *H. influenzae*, facilitam a invasão da BHE. Estas proteínas interagem com a laminina e com o receptor da imunoglobulina polimérica (pIgR), permitindo a transcitose através do endotélio para o espaço subaracnoídeo (Figura 10) (Mook-Kanamori *et al.*, 2011; Radin

et al., 2005).

Nos pacientes com fístula liquórica, por exemplo após traumatismo craniano, a interrupção da integridade da dura-máter permite a entrada direta principalmente das bactérias partir de focos infecciosos adjacentes, como a otite média, sinusite e mastoidite (Musher *et al.*, 2000).

Após a passagem da BHE, as bactérias replicam-se no LCR devido a ausência de leucócitos, complemento e imunoglobulinas, ou seja de resposta imune. As bactérias no LCR são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) através da ligação aos receptores de reconhecimento padrão, que são especificamente dirigidos para um conjunto de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressas por agentes patogénicos (Akira, 2000). Os principais receptores de reconhecimento padrão envolvidos na detecção das bactérias incluem os receptores de tipo toll-2 (TLR-2) (Echchannaoui *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2009; Koedel *et al.*, 2003; Letiembre *et al.*, 2009; Mogensen *et al.*, 2008; Yoshimura *et al.*, 1999), TLR4 (Albiger *et al.*, 2007; Branger *et al.*, 2004; Mogensen *et al.*, 2008) e receptores Nod1 (Zola *et al.*, 2008). Após a activação das APCs e outras células do sistema nervoso central (SNC), incluindo, as células endoteliais, gliais, endimais, astrocitos e macrófagos (Mook-Kanamori *et al.*, 2011), a reacção inflamatória subsequente, ocorre em resposta à degradação da parede celular das bactérias e dos componentes da membrana celular (por exemplo, lipopolisacarídeos, peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos). Estas substâncias induzem a produção de diferentes mediadores inflamatórios incluindo o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-6 e IL-8. Estas citocinas inflamatórias aumentam a permeabilidade e vasodilatação do endotélio e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) liga-se a molécula de adesão intercelular (ICAM), permitindo o intenso influxo de leucócitos a partir do sangue para o local de infecção (Mook-Kanamori *et al.*, 2011) (figura 10).

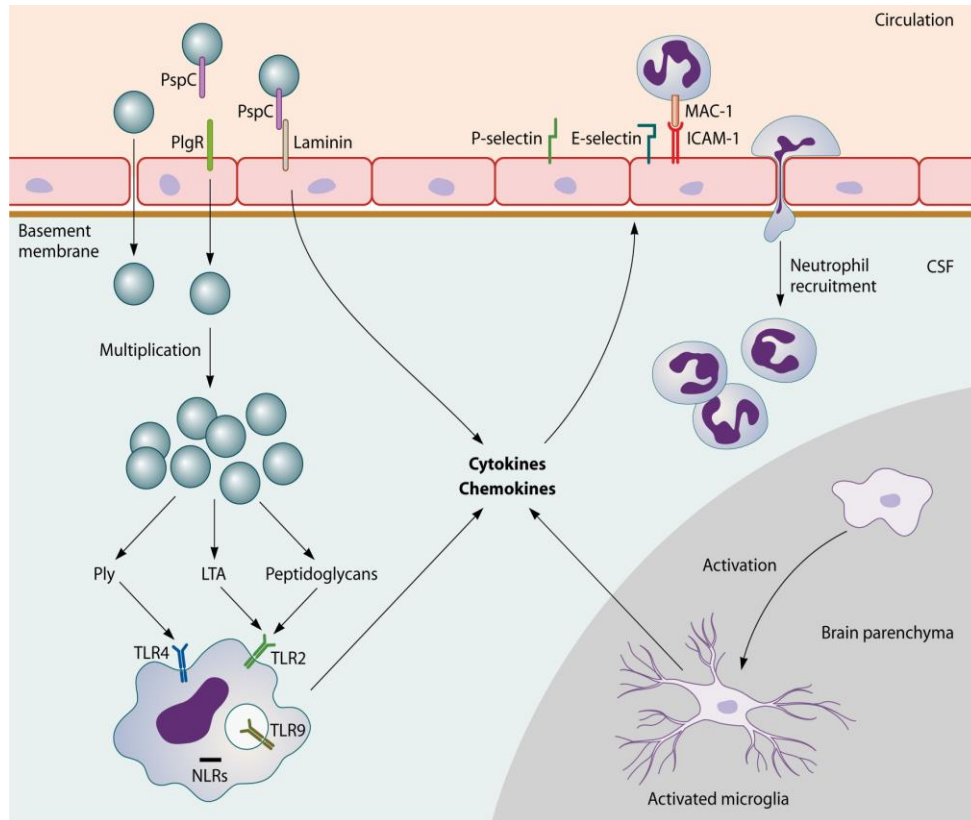


Figura 10. Mecanismo de adesão das bactérias (por exemplo *S. pneumoniae*) às células endoteliais; invasão e multiplicação LCR; reconhecimento dos produtos bacterianos por TLR2 e TLR4 em APCs circulantes e a libertação de citocinas e quimiocinas a partir de macrófagos e células microgliais.

Fonte: Mook-Kanamori *et al.*, 2011

2.1.6 Tratamento da MBA

O tratamento empírico recomendado para a meningite, consiste na administração intravenosa (IV) de penicilina G cristalina e gentamicina (200 e 5 mg/Kg respectivamente) para crianças menores de 2 meses, e para crianças maiores de 2 meses, é recomendada a administração intravenosa de penicilina G (dose diária de 500.000 IU/Kg) mais gentamicina. Em caso de resistência recomenda-se a administração de cefalosporinas da terceira geração, por exemplo, a ceftriaxona (80-100mg/kg/dia IV, durante 10 a 14 dias) e vancomicina (60mg/kg/dia ou 2g/dia IV, por 10 a 14 dias) como o tratamento de segunda linha (WHO, 2007).

Quando a etiologia é conhecida, o tratamento da primeira linha para meningite causada por *S. pneumoniae* é penicilina G mais a gentamicina e, em caso de resistência recomenda-se a administração de cefalosporinas da terceira geração (ex.: ceftriaxona ou cefotaxima) e vancomicina como o tratamento de segunda linha para meningite bacteriana em todas as faixas etárias devido ao amplo espectro de acção e uma meia-vida longa (8 horas no sangue, 14 horas em no LCR). A duração de tratamento é de 10 a 14 dias. O tratamento da meningite causada por *H. influenzae*, consiste na administração de penicilina, ampicilina ou amoxiciclina, mas em casos de resistência recomenda-se a administração de ceftriaxona ou cefotaxima como segunda linha de tratamento, a duração do tratamento é de 7 a 10 dias (WHO, 2007 ; CLSI, 2014).

O tratamento da meningite por meningococo é iniciada com ampicilina, e em casos de resistência recomenda-se cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona ou cefotaxima) como segunda linha. A meningite meningocócica é geralmente tratada durante 4 a 7 dias (WHO, 2007 ; CLSI, 2014).

2.1.7 Prevenção das MBA

As vacinas têm um papel importante no controlo e prevenção das meningites bacterianas (WHO, 2011). A imunização com as vacinas conjugadas de *Hib*, pneumococos e meningococos tem tido um impacto significativo na incidência de doenças invasivas em crianças, especialmente a meningite (Chavez-Bueno & McCracken, 2005).

2.1.7.1 Vacinas pneumocócicas

Na actualidade, dispõe-se de três tipos de vacinas pneumocócicas conjugadas licenciadas contra a meningite e outras doenças pneumocócicas. Estas vacinas são constituídas por 7, 10 e 13 serotipos de *S. pneumoniae*, respectivamente, conforme a seguinte composição: PCV heptavalente (PCV-7) composta pelos serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, licenciada no ano 2000 e constituída principalmente por serotipos mais prevalentes em crianças Norte Americanas, a PCV-decavalente (PCV-10) composta pelos serotipos da heptavalente mais os sorotipos 1, 5, 7F (10-valente = PCV-7 + 1, 5, 7F), licenciada nos finais de 2008 e a PCV-tridecavalente (PCV-13) composta pelos serotipos

da PCV-10 mais serotipos 3, 6A, 19A (13-valente = PCV- 10 + 3, 6A, 19A), licenciada em 2009 (Black *et al.*, 2010; Roca *et al.*, 2009). Nas vacinas pneumocócicas conjugadas, os antígenos capsulares são conjugados com proteínas (toxóides tetânicos, toxóide diftérico CRM197-tóxina mutante não tóxica) que desencadeiam uma resposta imunológica timo-dependente. Esta resposta é eficaz, mesmo em lactentes e em crianças com menos de 2 anos, grupo etário que apresenta elevado risco de formas graves de doença pneumocócica invasiva. Têm ainda a vantagem de induzirem memória imunológica, actuarem no estado de portador nasofaríngeo e, conseqüentemente, conferirem protecção indirecta a não vacinados. Em Moçambique, está disponível a vacina pneumocócica conjugada decavalente (PCV-10), Esta vacina está incluída no PAV desde 2013.

As vacinas conjugadas incluem um número limitado de serotipos uma vez que, para cada serotipo necessita de uma grande quantidade de conjugado para estimular uma resposta imune específica (Briles *et al.*, 1997). Existe ainda a vacina pneumocócica polissacarídica (PPV): A vacina pneumocócica polissacarídica icositriavalente (PPV-23), contém os serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F. Esta vacina está indicada para a prevenção de pneumonias e infecções sistémicas, em indivíduos de alto risco a partir de 2 anos de idade, idosos com idade superior a 65 anos, pacientes com anemia falciforme, esplenectomia, doença crónica pulmonar ou renal, imunossupressão congénita ou adquirida, transplante de órgãos, terapia prolongada com imunossupressores. Esta vacina é classificada como vacina timo-independente (T-II), uma vez que é capaz de activar as células B sem cooperação com as células T, porém a resposta imunológica gerada por este tipo de vacina é muito baixa e não estimula anticorpos de memória. Por essa razão, essa vacina é menos efectiva na prevenção da doença em crianças menores de 2 anos, uma vez que essas crianças ainda não tem as células B maduras (Hausdorff *et al.*, 2000).

2.1.7.2 Vacinas contra Hib

Estão disponíveis vacinas para a prevenção de infecções por *H. influenzae* do serotipo b (*Hib*), mas não para as infecções devidas a outros serotipos ou organismos não encapsulados (Adegbola *et al.*, 2005; Cowgill *et al.*, 2006). Nos países onde a vacina

conjugada contra *H. influenzae* tipo b é administrada rotineiramente para crianças, a meningite causada por este patógeno reduziu drasticamente (Cowgill *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2004), tendo levando à quase total erradicação do serotipo b (Adegbola *et al.*, 2005; Cowgill *et al.*, 2006). Em Moçambique a vacina contra *Hib*, faz parte o PAV desde 2009 e é administrada em três doses. A idade mínima para a primeira dose é de 6 semanas, com um intervalo mínimo de quatro semanas entre as doses subsequentes - por exemplo, 6, 10 e 14 semanas.

2.1.7.3 Vacinas meningocócicas

Existem dois tipos de vacinas disponíveis contra o meningococo: as vacinas polissacáridas e as vacinas conjugadas (Chavez-Bueno & McCracken, 2005). As vacinas conjugadas incluem a vacina monovalente (serotipo A), bivalente (serogrupos A e C), trivalente (A, C, Y), e, uma vacina tetravalente (A, C, W135 e Y). As vacinas conjugadas têm eficácia a partir dos 2 meses de idade, induzem memória imunológica prolongada (WHO, 2011).

A vacina conjugada meningocócica serotipo A foi licenciada em 2010 pela OMS, e introduzido em Burkina Faso, Mali e Níger. As vacinas conjugadas geralmente resultam em níveis mais elevados de protecção, longa duração de protecção em crianças menores de 2 anos de idade, e pode interromper o estado portador e evitar a transmissão de pessoa a pessoa, resultando em imunidade de grupo (LaForce *et al.*, 2007).

As vacinas polissacarídicas são recomendadas apenas para crianças a partir dos 2 anos de idade e adultos devido à baixa eficácia em crianças pequenas, não fornecem longa duração da protecção (WHO, 2011; LaForce *et al.*, 2007).

2.1.8 Diagnóstico laboratorial

Os exames mais utilizados na prática laboratorial para a identificação de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis* consiste na identificação da bactéria, ou de DNA ou do antígeno nas amostras do LCR, podendo essa identificação ser feita de três formas diferentes: cultura, sorologia e biologia molecular.

- a) Cultura em meios sólidos: caracteriza-se pelo isolamento e identificação da bactéria através da cultura de LCR em meios de cultura. Embora tenha baixa sensibilidade, a cultura é considerada o padrão ouro no diagnóstico de meningites bacterianas (Winn *et al.*, 2006) e continua sendo melhor técnica para rotina clínica quando comparada com outras técnicas de detecção, porque pode fornecer dados sobre a susceptibilidade aos antibióticos (Corless *et al.*, 2001).

Os pneumococos e *N. meningitidis* crescem melhor em meios enriquecidos (água com 5% de sangue de carneiro). A necessidade do uso de agar chocolate se deve à possibilidade de isolamento de *H. influenzae*, o qual exige a presença de dois suplementos conhecidos factores V (NAD-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e X (Hemina). O material semeado incubado sob condições especiais de temperatura e concentração de CO₂ (37°C e 5%, respectivamente).

- b) Sorologia: reacção antígeno-anticorpo, consiste em detectar antígenos de agentes bacterianos no LCR, utilizando partículas de látex revestidas de anticorpos específicos. A vantagem desta técnica é de ser rápida e de fácil execução, não exige equipamento especial, e pode ser usado para outros fluidos corporais além do LCR. Está menos sujeito a interferências pelo uso prévio de antibióticos quando comparado com a cultura e bacterioscopia. A sensibilidade do teste varia de 59% a 100% e a especificidade é de aproximadamente 99%. Este teste apresenta como desvantagens o custo elevado e o surgimento de resultados falsos positivos devido à reacção cruzada com elevadas concentrações de proteínas, antígenos vacinais, hemácias hemolisadas, sangue e outros factores, especialmente para fluidos que não são LCR (Perkins *et al.*, 1995).

- c) Molecular: consiste na extração e amplificação do DNA da bactéria em amostras de LCR, utilizando técnicas de biologia molecular, ex: multiplex PCR (Corless *et al.*, 2001). A técnica da reacção da PCR vem sendo utilizada para confirmação da etiologia de casos de meningite com cultura negativa. Este método apresenta uma elevada sensibilidade, e é capaz de detectar DNA de bactérias não viáveis por antibióticos, permite também o diagnóstico a partir de amostras clínicas com pouco

volume ou contendo pequeno número de bactérias (5 a 1000 unidades formadoras de colónias por mililitro- UFC/mL) (Backman *et al.*, 1999; Cherian *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2007; Schuurman *et al.*, 2004; van Haeften *et al.*, 2003; Welinder-Olsson *et al.*, 2007). Além disso, os antibióticos não actuam como inibidores da reacção e fornece resultados em menos de uma hora após inicio da reacção (Borrow *et al.*, 1997; Cartwright *et al.*, 1992; Rangunathan *et al.*, 2000; Rintamaki *et al.*, 2002).

3. Justificação

Embora a meningite bacteriana seja uma das principais causas de mortalidade infantil no mundo especialmente nos países em desenvolvimento de África e o MISAU tenha introduzido em 2009 e 2013 as vacinas conjugadas para *Hib* e pneumococos, respectivamente, entretanto, a informação sobre a epidemiologia de meningites bacterianas agudas em Moçambique é pouco conhecida. A geração de evidências sobre epidemiologia das meningites bacterianas em Moçambique é crucial para monitorar o impacto da introdução das vacinas contra *Hib* e pneumococos e para orientar a tomada de decisões de saúde pública.

Neste contexto, a implementação de técnicas moleculares no diagnóstico das meningites bacterianas agudas e a caracterização molecular dos principais agentes etiológicos da MBA em Moçambique constitui uma oportunidade única, por um lado para superar a baixa sensibilidade dos métodos convencionais de diagnóstico (por exemplo a cultura) e melhorar o tempo de resposta laboratorial. Por outro lado ajudará a fortalecer o sistema de vigilância de base laboratorial de meningites para monitorização das meningites pediátricas causadas por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* e avaliar o impacto da introdução da vacina pneumocócica em Moçambique.

4. Objetivos

4.1 Geral:

- Descrever a epidemiologia e o perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos principais agentes etiológicos da meningite bacteriana aguda, isolados em amostras de LCR de casos suspeitos de meningite em crianças menores de 5 anos de idade em três unidades hospitalares de Moçambique.

4.2 Específicos:

- Determinar a frequência das estirpes mais comuns associadas à meningite bacteriana aguda na infância em três unidades hospitalares de Moçambique, usando o método de cultura e PCR em tempo real
- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes isoladas em amostras de LCR de crianças com meningite bacteriana;
- Avaliar a variabilidade geográfica e sazonal das estirpes que causam a meningite bacteriana em crianças;
- Determinar a frequência e distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* associados à meningite bacteriana aguda em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique
- Comparar a frequência e distribuição dos serotipos capsulares de *S. pneumoniae* por idade e região geográfica;
- Comparar os serotipos capsulares de *S. pneumoniae* isolados em Moçambique com os identificados em outros países vizinhos.

5. Metodologia

5.1 Área de estudo

Este estudo foi realizado em 3 hospitais de nível quaternário em Moçambique, nomeadamente, Hospital Central de Maputo (HCM) no sul do país, Hospital Central da Beira (HCB) no centro do país e Hospital Central de Nampula (HCN) no norte do país (figura 11). Estes hospitais desempenham o papel de unidade de saúde de referência para cada região do país e oferecem vários serviços especializados de saúde hospitalar e ambulatória para todas as faixas etárias, em várias especialidades. Estes hospitais são os postos sentinela do Ministério da Saúde (MISAU), para vigilância de meningite e outras doenças infecciosas, e foram selecionados com base na experiência dos casos de meningite notificados e da existência de laboratórios de microbiologia funcionais.

O HCN localiza-se na província de Nampula. A província de Nampula tem 23 distritos, e de acordo com o recenseamento geral da população de 2007 a população residente era de 3.985.613, área 79.010 Km², a densidade populacional 50,44 habitantes/Km² (INE, 2007). A enfermaria de pediatria desta unidade hospitalar possui 184 camas, com 78 profissionais pediátricos (13 médicos, 55 enfermeiros e 10 técnicos de medicina geral).

O HCB localiza-se na província de Sofala. A província de Sofala possui 13 distritos, com uma população estimada em 1.642.920 habitantes, com uma área de 67.753 km², a densidade populacional 24,25 habitantes por Km² (INE; 2007). A enfermaria de pediatria deste hospital possui 150 camas, com 58 profissionais pediátricos (3 Médicos e 55 enfermeiros).

O HCM localiza-se na província de Maputo. A província de Maputo possui 8 distritos, com uma população estimada em 1.205.709 habitantes, com uma área de 22.693 Km², densidade populacional é estimada em 53.13 habitantes por Km² (INE, 2007). A enfermaria de pediatria desta unidade hospitalar possui 322 camas, com 381 profissionais de pediatria (52 médicos, 3 psicólogos, 1 nutricionista, 144 enfermeiros, 28 administrativos e 153 agentes de serviço).

O clima em Moçambique é do tipo tropical húmido, com duas estações: a estação húmida e chuvosa de Novembro à Abril, e a estação seca e fria durante o restante do ano. A precipitação média nas montanhas é de cerca de 2000 mm, a humidade relativa é elevada, situando-se entre 70 a 80%, embora os valores diários oscilam entre 10 a 90%. As temperaturas médias variam de 20°C no Sul e 26°C no norte, sendo mais elevada durante a época chuvosa.

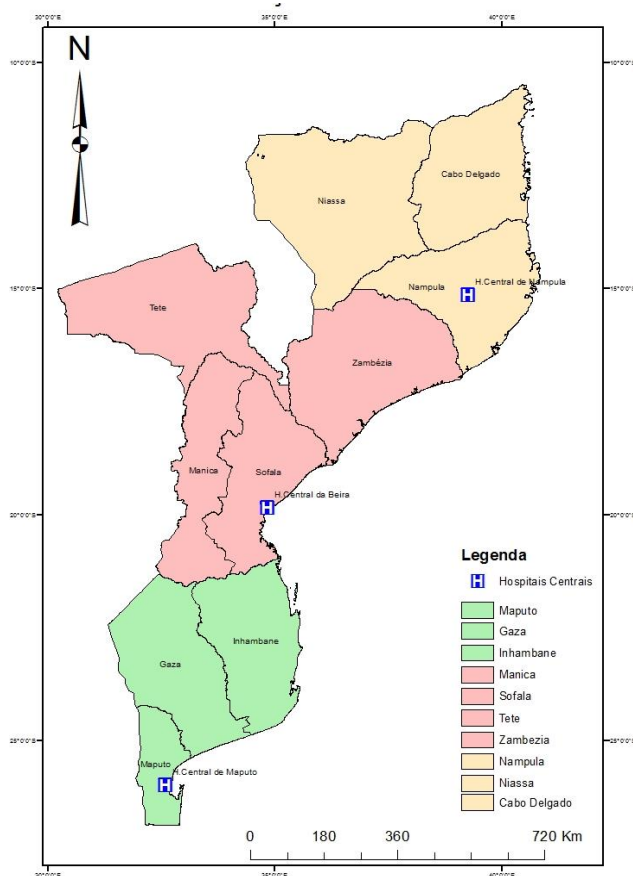


Figura 11. Localização de hospitais centrais em Moçambique

5.2 Desenho de estudo e definição de caso de MBA

Este estudo foi implementado como parte da rotina de vigilância sentinela de meningite bacteriana aguda em Moçambique, de Março de 2013 a Março de 2014. O critério de inclusão foi baseado na definição de caso de meningite bacteriana aguda da vigilância sentinela, definido pela OMS (OMS, 2001).

a) Definição de caso suspeito

Todas as crianças dos 0 a 5 anos de idade, que apresentassem sinais e sintomas de meningite, nomeadamente: início súbito de febre ($> 38^{\circ}\text{C}$ ou axilar $> 38,5^{\circ}\text{C}$ rectal) e um dos seguintes sinais: rigidez da nuca, abaulamento das fontanelas, perda de consciência, história de convulsão, sinais neurológicos focais, irritabilidade ou sonolência foram incluídas.

b) Definição de caso provável

Qualquer caso suspeito quando apresentasse pelo menos um dos seguintes critérios no exame de LCR: i) aparência turva, avaliada pelo médico, ii) contagem de leucócitos ≥ 100 células/ mm^3 ou leucócitos entre 10-100 células/ mm^3 com níveis de glicose < 40 mg/dL ou presença de proteínas (determinado pelo método semi-quantitativo, Pandy) e iii) Exame microscópico mostrando diplococos gram negativos (DGN), diplococos gram positivos (DGP), bacilos gram negativos (BGN), ou leucócitos com contagem > 10 células/ mm^3 .

c) Definição de caso confirmado

A meningite bacteriana era confirmada pelo isolamento ou identificação do patógeno causador (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae* ou outro patógeno) a partir de LCR de um caso suspeito ou provável por cultura ou PCR.

5.3 Registo dos casos de MBA e colheita de amostras de LCR

Durante a admissão, médicos treinados identificavam pacientes com suspeita de meningite. Dados demográficos, clínicos, história de vacinação, data de início da doença, sinais e sintomas e resultados de cada paciente eram registados num formulário de notificação de casos previamente criado e padronizado pelo INS (anexo 1). A punção lombar foi realizada em pacientes hospitalizados. Dois tubos estéreis diferentes previamente identificados foram usados para colheita de 0,5 a 1 mL de amostras de LCR em cada paciente e imediatamente eram enviados ao laboratório local para análise microbiológica e para medição dos níveis de proteínas e de glicose (Anexo 2).

5.4 Diagnóstico laboratorial (Microbiológico)

5.4.1 Exame macroscópico do LCR

A avaliação macroscópica do LCR consistiu na inspeção visual da alteração do aspecto do LCR. O aspecto do LCR foi classificado em límpido, turvo, xantocrômico e hemático.

5.4.2 Exame citoquímico do LCR

A avaliação do LCR consistiu na medição do nível de glucose, contagem de leucócitos e a medição dos níveis de proteínas. A medição de proteínas foi realizada usando o teste de Pandy (método semi-quantitativo). A contagem de leucócitos foi feita na câmara de Neubauer e depois foi observada no microscópio óptico com objectiva de 10x e 40x.

5.4.3 Exame microscópico do LCR

O exame microscópico foi feito usando o método de Gram. Primeiro o LCR foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos, em seguida colocou-se duas gotas do sedimento na lâmina e confeccionou-se o esfregaço. A lâmina foi deixada secar à temperatura ambiente e depois foi fixada no calor brando. Após a fixação, a lâmina foi corada pelo método de Gram e, por fim foi observada ao microscópio óptico com objectiva de 100x.

5.4.4 Cultura dos isolados de LCR

Todos os isolados de culturas positivas de amostras de LCR provenientes dos Hospitais Centrais de Maputo, Beira e Nampula, que chegavam ao Laboratório de Microbiologia, juntamente com as fichas de notificação de casos suspeitos de meningite, foram registados no livro de registo e depois codificados. Em seguida, os isolados foram sub-cultivados em ágar sangue e ágar chocolate (MAST, Merseyside, UK), seguindo-se todos os cuidados de assepsia e incubados em uma estufa (Memmeret) a 35°C com 5% de CO₂.

5.4.5 Identificação de *S. pneumoniae*

Após 24 ou 48 horas de crescimento, o *S. pneumoniae* foi identificado seguindo-se os procedimentos operacionais padrão: morfologia das colônias, teste de susceptibilidade a optoquina e teste de bile solubilidade.

a) Morfologia das colônias

A caracterização morfológica das colônias foi feita em meios sólidos (ágar sangue e chocolate) e observou-se colônias pequenas, redondas, translúcidas e mucoides, algumas com um sulco central causado pela rápida autólise parcial, e rodeadas da alfa-hemólise (α -hemólise) em ágar sangue, característica de pneumococos (figura 12).

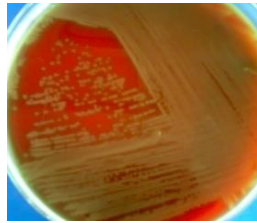


Figura 12: Morfologia das colônias de *Streptococcus pneumoniae*

Fonte: Arquivo LNRM

Simultaneamente eram feitas preparações e coradas pelo método de Gram. Após a identificação presuntiva do pneumococo, foram realizados testes de susceptibilidade à etil-hidrocupreína (optoquina) e bile solubilidade ou desoxicolato de sódio 10%.

b) Teste da catalase

Foi feito o teste da catalase (enzima que decompõe o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em H_2O e O_2) para diferenciar os estreptococos dos estafilococos. Todos os estreptococos são catalase negativa (WHO, 2011).

c) Teste de susceptibilidade à optoquina

A bactéria foi semeada em uma placa de ágar sangue, em duas direcções, e o disco de optoquina (OXOID – DD1 OPTOCHIN, Basingstoke, England) foi colocado no centro da placa com ajuda de uma pinça estéril e incubada a 35° C em atmosfera de 5% de CO_2

observando-se todas as condições de assépsia. A leitura foi realizada após 24 horas de crescimento através da medição do halo de inibição de crescimento, usando uma régua automática calibrada. A bactéria com um halo de inibição ≥ 14 mm de diâmetro em volta do disco foi confirmada como pneumococo (figura 13).

Tanto os isolados sensíveis ou resistentes a optoquina foram submetidas ao teste de bile solubilidade para confirmação definitiva.

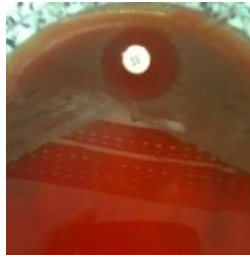


Figura 13. Teste de optoquina em cultura de *S. pneumoniae*

Fonte: Arquivo LNRM

d) Teste de bile solubilidade

O teste de bile solubilidade foi realizado utilizando uma solução de desoxicolato de sódio a 10% (BD – *BBL Desoxycholate Reagent Droppers, Becton Dickinson and Company, USA*). As bactérias foram suspensas em soro fisiológico a 0,9%, com uma turvação de 2,0 na escala de McFarland (1 a 4×10^8 UFC/mL). Alíquotas de 2 mL da suspensão foram distribuídas em dois tubos, sendo um tubo teste e outro controle. Ao tubo teste foi adicionado 0,5 mL da solução de desoxicolato de sódio a 10% e ao tubo controle foi adicionado 0,5 mL de solução de soro fisiológico. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente e observados a cada 15 minutos até 2 horas quanto ao desaparecimento ou não da turvação no tubo teste (figura 14). O desaparecimento da turvação indicava teste positivo. Uma vez confirmada a espécie, os isolados eram submetidos aos testes de susceptibilidade aos antibióticos, realizado através do teste de disco difusão em ágar.

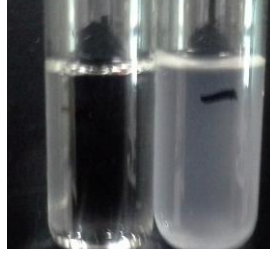


Figura 14. Teste de bile solubilidade

À direita: Tubo controle (teste negativo) (*S. pneumoniae* + soro fisiológico): tubo turvo.

À esquerda: Tubo teste (teste positivo) (*S. pneumoniae* + desoxicolato de sódio 10%): tubo límpido (transparente).

Fonte: Arquivo LNRM

5.4.6 Identificação de *H. influenzae*

Após o crescimento de 24 ou 48 horas, foi feita a leitura de placas de ágar chocolate (figura 15A) e foi observada a presença de colônias de *H. influenzae* grandes, lisas, convexas e opacas. Em seguida, foi feito o teste de oxidase, cujo resultado foi positivo. Posteriormente, foi feito o teste de satelitismo (crescimento satélite de *H. influenzae* ao redor da sementeira em estrias de *Staphylococcus aureus* no ágar sangue de carneiro). O factor X (hemina), é fornecido pelos eritrónios de carneiro lisados circundando as estrias de *S. aureus*, enquanto que o factor NAD ou V é fornecido pelos estafilococos (Figura 15B).



Figura 15A. Morfologia das colônias de *H. influenzae*

Fonte: WHO, 2011

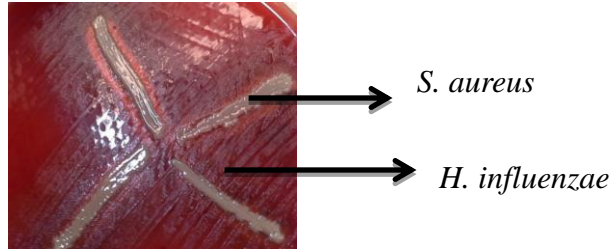


Figura 15B. Teste de satelitismo para identificação de *H. influenzae*

Fonte: Arquivo LNRM

5.4.7 Identificação de *N. meningitidis*

A partir do crescimento do meningococo no meio de cultura de ágar sangue (figura 16A), foi feito o teste de oxidase (enzima que, na presença de oxigénio atmosférico, oxida o reagente fenilenediamina oxidase para formar um composto de cor púrpuro escura, o endofenol) (figura 16B), cujo resultado foi positivo. Posteriormente, foi feito o teste de utilização de carboidratos (glicose, maltose, lactose e sucrose). Colónias de *N. meningitidis* de 24 horas de crescimento foram inoculadas no meio ágar cistina-tríptica (CTA) contendo carboidratos a 1% (glicose, maltose, sucrose e lactose) e o indicador de pH vermelho de fenol, 24 horas após a incubação a 37°C e 5% de CO₂, a identificação de *N. meningitidis* foi baseada na observação das possíveis reacções devidas à utilização dos açúcares por via oxidativa (figura 14C). Verificou-se que *N. meningitidis* utiliza a glucose e a maltose, com a produção de ácido, mudando o indicador do meio para amarelo devido a redução do pH.



Figura 16A. Morfologia das colónias de *N. meningitidis*

Fonte: Arquivo LNRM

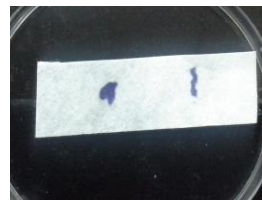


Figura 16B. Teste de oxidase para *N. meningitidis*

Fonte: Arquivo LNRM

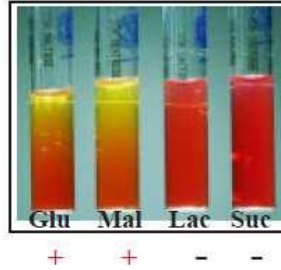


Figura 16C. Provas de identificação de *N. meningitidis* no meio ágar cistina-tríptica (CTA), contém açúcares (glicose, maltose, sucrose e lactose). Utilizou a glucose e maltose, indicado pela produção de ácido (mudança de cor para amarelo), e não utilização de lactose ou sucrose

Fonte: WHO, 2011

5.4.8 Identificação de *S. agalactiae*

A partir do crescimento de 18 a 24 horas de *S. agalactiae* no ágar sangue, foi feita a leitura de placas e observou-se a presença de colónias brancas acinzentadas com aspecto mucóide, circundadas por uma pequena zona de beta-hemólise. Foi feita a coloração de gram e observou-se cocos gram positivos, dispostos em cadeia. Em seguida foi feito o teste de CAMP (consiste na interação entre a β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* e a proteína "fator CAMP" do *S. agalactiae*, o efeito sinérgico aumenta a hemólise dos eritrónios de carneiro, no local da inoculação em forma de seta). Uma colónia pura de *S. aureus* foi estriada no meio da placa de ágar sangue e na posição perpendicular da colónia foi inoculada a colónia de *S. agalactiae* sem tocar-se na colónia de *S. aureus*. Após 24 horas de incubação foi observada a formação de um halo em forma de seta no local de inoculação (figura 17).



Figura 17. Teste de CAMP para *S. agalactiae* (CAMP positivo)

Fonte: Arquivo LNRM

5.4.9 Teste de susceptibilidade aos antibióticos

a) Teste de disco de difusão em ágar

O teste de disco de difusão em ágar foi realizado com base nas recomendações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2014), utilizando os seguintes discos de antibióticos: cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), oxacilina (1µg), sulfametoxazol/trimetoprima (1,25/23,75µg), tetraciclina (30µg), levofloxacina (5 (OXOID, *Antimicrobial Susceptibility Test Discs*, Basingstoke, UK). Para isolados de *H. influenzae* e meningococos testou-se a susceptibilidade para cloranfenicol (30µg), a ceftriaxona (30 µg) e ampicilina (10 µg) e *S. agalactiae* a susceptibilidade foi testada para ampicilina (10 µg), vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg), levofloxacina (5 µg), ceftriaxona (30 µg) e clindamicina (2 µg). A partir de um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas fez-se uma suspensão em soro fisiológico a 0,9% com turvação de 0,5 na escala de McFarland (BD - BBL – *McFarland turbidity company*, USA). Disseminou-se esta suspensão com o auxílio de uma zaragatoa estéril no Meio Ágar *Mueller – Hinton* sangue (com 5% de sangue da carneiro) (MAST – Merseyside, UK). Os discos foram colocados assepticamente com uma pinça a uma distância de 2.5 cm entre um e o outro, e incubado a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. A leitura foi realizada 24 horas depois, medindo o diâmetro dos halos de inibição de crescimento e interpretada segundo o CLSI, 2014 (figura 18).

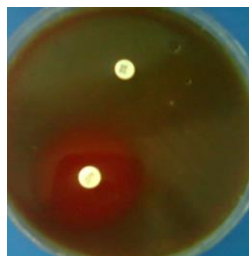


Figura 18. Placa de antibiograma de *S. pneumoniae* (método de disco difusão)

Fonte: Arquivo LNRM

Todos os resultados produzidos a cada passo ao nível do LNRM eram enviados aos postos sentinela para serem utilizados na orientação da terapia antimicrobiana indicada ao paciente e também eram registados nas fichas de notificação de casos suspeitos de

meningite e enviadas ao centro de dados a fim de serem introduzidas na respectiva base de dados.

b) E-teste

As estirpes que foram resistentes a oxacilina (halos de inibição ≤ 19 mm), em volta do disco de oxacilina foram submetidas ao método do E-test[®] para determinar a susceptibilidade a penicilina (medindo as concentrações inibitórias mínimas) no laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Ciências de Saúde do Porto Alegre (UFCSPA). A concentração mínima inibitória (CIM) foi também realizada para ceftriaxona, eritromicina, sulfametoxazol/trimetoprima, vancomicina, tetraciclina e cloranfenicol. A partir de um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas foi realizada uma suspensão bacteriana em soro fisiológico a 0,9% com turvação padronizada com a escala 0,5 de McFarland. Esta suspensão foi disseminada com o auxílio de uma zaragatoa estéril no Meio de ágar *Mueller – Hinton* sangue (5% de sangue de carneiro). Sob a superfície da placa foram depositadas as fitas contendo concentrações diferentes de penicilina (0.016 – 256.0mg/L) (Biomereux, SA) e incubadas a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas (figura 19). A leitura foi realizada através da observação do ponto de intersecção do crescimento bacteriano com a fita, o qual identifica a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. As cepas padrão utilizadas como controle de qualidade dos antibiogramas foram, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49247, *N. meningitidis* ATCC 13077 e *S. agalactiae* ATCC 27591. Subculturas foram armazenadas a -80°C em meio líquido (Skim milk - DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) +10% de glicerol (Labchem, SA).

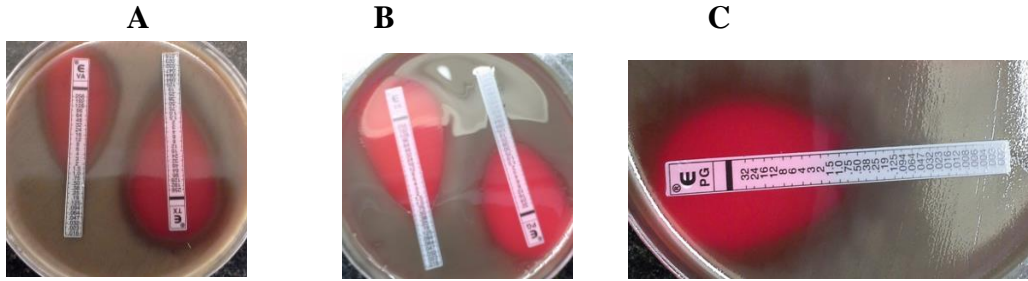


Figura 19. Placas de antibiograma para *S. pneumoniae* (método de E-Teste). **A:** E-Teste para vancomicina e ceftriaxona. **B e C:** E- Teste para penicilina resistente
Fonte: Arquivo LNRM

5.4.10 Testagem molecular

5.4.10.1 Extração de DNA de amostra de LCR e isolados

Duzentos microlitros de LCR ou de suspensão bacteriana foram usadas para extração de DNA bacteriano. O DNA foi extraído usando tanto o BIOPOUR Kit de extração Mini SPIN PLUS (BIOPUR, Biometrix diagnostic, Brazil), ou High pure PCR template kit (Roche Diagnostics Corporation, US). O DNA total foi eluído em 200 μ l do tampão de eluição apropriado e conservado a -20°C .

5.4.10.2 Identificação molecular dos principais patógenos de MBA por M-qPCR

A triagem molecular dos principais patógenos da MBA foi realizada no Laboratório Qualitá em Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil, e o protocolo foi baseado no sistema de detecção por Syber (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG, Invitrogen, California, UK), utilizando o equipamento LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). O M-qPCR foi realizado utilizando a combinação de um conjunto de iniciadores específicos desenhados para a detecção simultânea dos genes *ctrA*, *ply*, *bex A* e *cfb* para *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B), respectivamente (Corless *et al.*, 2001; Ke *et al.*, 2000; El Aila *et al.*, 2011). Os iniciadores foram usados a uma concentração de 10 pM cada, os quais foram adicionados em tubo contendo 2 μ l do DNA molde para perfazer um volume final de 20 μ l. As amostras foram amplificadas

usando o equipamento LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 2 minutos para a reacção de glicosilase a 50°C, seguida de 38 ciclos a 96°C por 10 segundos (desnaturação), 50°C por 10 segundos (anelamento) e 72°C por 8 segundos (elongação).

Após a amplificação, a análise de curva de dissociação (gráfico que mostra os dados de dissociação do fragmento da corrida de PCR e verificar a especificidade dos produtos amplificados) foi realizada para diferenciar os quatro agentes patogénicos bacterianos. Para *S. agalactiae* a temperatura de dissociação foi de 79,09°C, para o pneumococo foi 79,75°C, para meningococos foi 82,93°C e para *H. influenzae* foi 84,16 °C (figura 20). Os resultados foram analisados através da curva de dissociação gerada para cada amostra e comparado com os controlos positivos (figura 21).

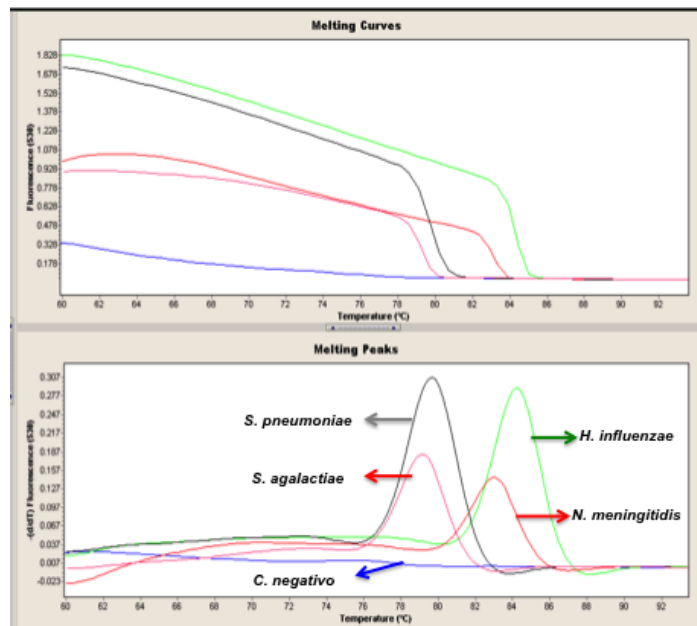


Figura 20: Curvas de dissociação dos controlos positivos de *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae*

Fonte: Arquivo LNRM

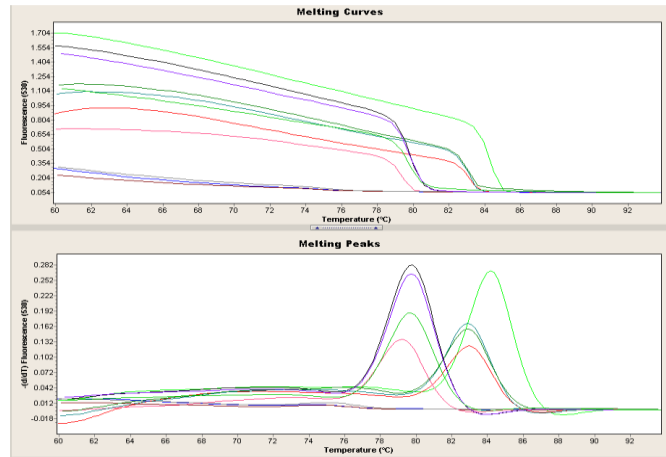


Figura 21: Curvas de dissociação de amostras positivas para *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae*

Fonte: Arquivo LNRM

5.4.10.3 Serotipagem dos pneumococos

A serotipagem de estirpes de *S. pneumoniae* foi realizada no laboratório de microbiologia e biologia molecular da Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brasil, e foi utilizada a técnica sequencial multiplex PCR (SM-PCR) inicialmente descrito por (Pai *et al.*, 2006) e adaptado para amostras clínicas e isolados de África, que inclui 39 diferentes serotipos de *S. pneumoniae*.

As reacções de multiplex PCR foram estabelecidas para incluir sequencialmente os serotipos mais frequentes em África (anexo 3). Os iniciadores foram agrupados em 8 reacções multiplex, e cada reacção foi desenhada para incluir 5 pares de iniciadores de 5 serotipos diferentes excepto a reacção 8 que inclui 4 serotipos. Iniciadores para o locus *cpsA*, presente em todos *S. pneumoniae* (*cpsA-f* e *cpsA-r*), foram incluídos como controlo interno específico em todas as reacções. A sequência dos iniciadores e os produtos da PCR estão listados no anexo 3.

A reacção foi realizada em um volume final de 25 µl e cada mix da reacção continha solução tampão na concentração 2x, 0.2mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), tampão de reacção 10x (100mM de Tris-HCl, pH 8.5 e 500mM de KCl), 1.7mM de MgCl₂, 1.5U/µl de taq DNA polimerase e iniciadores na concentração de 0,1 a 0,5 µM

(tabela 2 a 10) e 5µl de DNA molde. Os ensaios da PCR foram realizados num termociclador (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems). Os ciclos seguiram as seguintes condições: desnaturação inicial do DNA molde a 95°C por 15 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 54°C por 90 segundos (anelamento dos iniciadores) e 72°C por 1 minuto (extensão das novas fitas pela acção da taq polimerase) e 72°C por 10 minutos (extensão final) (Tabela 12). Os produtos da PCR foram analisados por electroforese.

Tabela 2. Ajuste das temperaturas, tempos, número de repetições por ciclo e função de cada etapa para reacção de PCR no termociclador

Tempo e temperatura	Número de repetições	Função
95 ⁰ C por 15 minutos	1x (ciclo)	Desnaturação inicial do DNA molde
94 ⁰ C por 30 segundos		Desnaturação das fitas de DNA
54 ⁰ C por 90 segundos	35x (ciclo)	Hibridização dos iniciadores
72 ⁰ C por 60 segundos		Extensão das novas fitas (acção da taq polimerase)
72 ⁰ C por 10 minutos	1x (ciclo)	Extensão final
4 ⁰ C até a retirada do material do aparelho		Parar a reacção e mantê-la estável

5.4.10.4 Electroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1.5% em tampão TAE, utilizando uma voltagem de 120 V por 45 minutos. Os géis foram corados com a solução de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sob a luz ultravioleta (UV) e as imagens foram registadas por fotografia digital (figura 22 A-C)

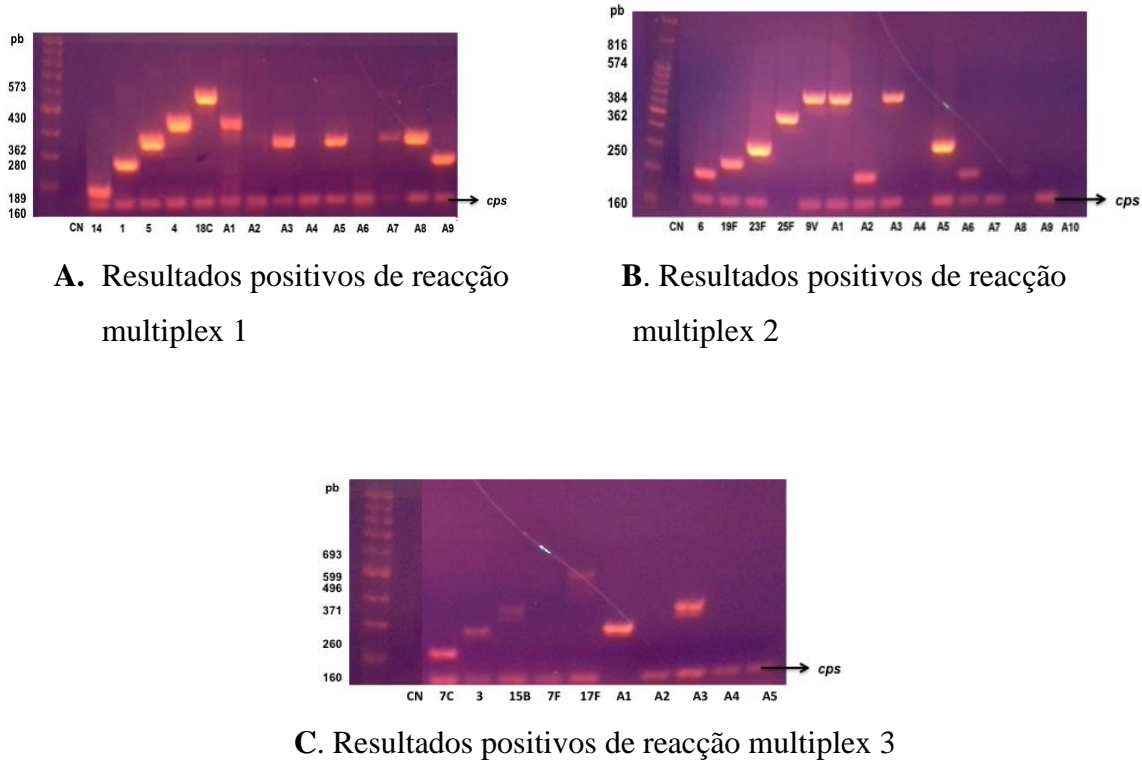


Figura 22 A-C. PCR multiplex sequencial. Dedução dos serotipos capsulares de *S. pneumoniae*

Todos isolados identificados como serotipo 6 por multiplex PCR, foram posteriormente diferenciados em 6B e 6A.

5.5 Análise estatística

Os dados foram introduzidos numa base de dados desenvolvida no software estatístico Epi Info versão 3.5.4 (CDC, EUA), e foram analisados utilizando o software estatístico SPSS versão 20 (IBM, EUA). As variáveis categóricas foram comparadas usando teste chi quadrado de *Pearson*.

Para determinar os factores de risco associados à infecção por meningite bacteriana aguda, foi utilizado modelo de regressão logística univariada de modo a seleccionar os factores com significância estatística inferior a 0.25, depois foi utilizado o modelo backward stepwise para a análise de regressão logística multivariada. O odds ratio (OR) e seu intervalo de confiança de 95% [IC 95%] foram determinados. Factores de risco com o valor *p* inferior a 0,05 na análise de regressão logística multivariada foram consideradas como tendo uma associação estatisticamente significativa com meningite bacteriana.

5.6 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Bioética de Moçambique. O consentimento verbal para participar no estudo foi obtido a partir do representante legal de cada criança, uma vez que este estudo foi realizado como parte da vigilância sentinela de rotina para meningite bacteriana aguda, implementado pelo Ministério da Saúde em Moçambique. Nesta vigilância, apenas o consentimento verbal é rotineiramente solicitado e, tendo sido aprovado pelo Comitê Nacional de Bioética. Cada participante que forneceu consentimento verbal foi registada em um logbook na unidade de sanitária.

6. Resultados

Características clínicas e demográficas

Durante o período de Março de 2013 a Março de 2014, foram recebidas e testadas no LNRM 369 amostras (LCR e isolados) de crianças menores de 5 anos de idade com suspeita clínica de meningite bacteriana aguda, que correspondem a 37.2% dos 992 casos suspeitos de meningite. Das 369 amostras, 193 (52.3%) eram do sexo masculino. A mediana de idade foi de 9 meses (IQR: 0-59 meses de idade), sendo a idade mínima de 0 mês e a máxima 59 meses. Das 369 amostras de LCR, 93 (25.2%) foram do HCM, 17 (4.6%) HCB e 259 (70.2%) HCN.

Detecção de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis* e *S. agalactiae* por cultura e PCR em tempo real baseado no uso de SYBR Green (fluoróforos ligantes de DNA)

A tabela 13 compara o desempenho da técnica de PCR em tempo real em relação a cultura, no diagnóstico de MBA em amostras de LCR. Das 369 amostras de LCR recebidas no LNRM, 52.3% (193/369) foram positivas por PCR multiplex qualitativo (M-qPCR), enquanto que a cultura apenas 7.3% (27/369) amostras de LCR foram positivas. Estes resultados, mostram um aumento de sete vezes a taxa de detecção de MBA por M-qPCR.

Tabela 3. Desempenho da técnica de M-qPCR em comparação com a cultura

Teste realizado	RT-PCR+	RT-PCR-	Total
Cultura +	27	0	27
Cultura -	166	176	342
Total	193	176	369

O *S. pneumoniae* foi o agente etiológico mais comum da MBA isolado em 4.5% (17/369) casos positivos de cultura de LCR, seguido por *H. influenzae* 1.4% (5/369), *N. meningitidis* 0,8% (3/369) e *S. agalactiae* 0.5%(2/369).

Similarmente, no M-qPCR, *S. pneumoniae* também foi o patógeno mais frequente detectada em amostras de LCR 32.8% (121/369), seguida de 12.2% (45/369) de *H. influenzae*; 4.3% (16/369) *S. agalactiae* e 3.0% (11/369) *N. meningitidis* (Gráfico 1).

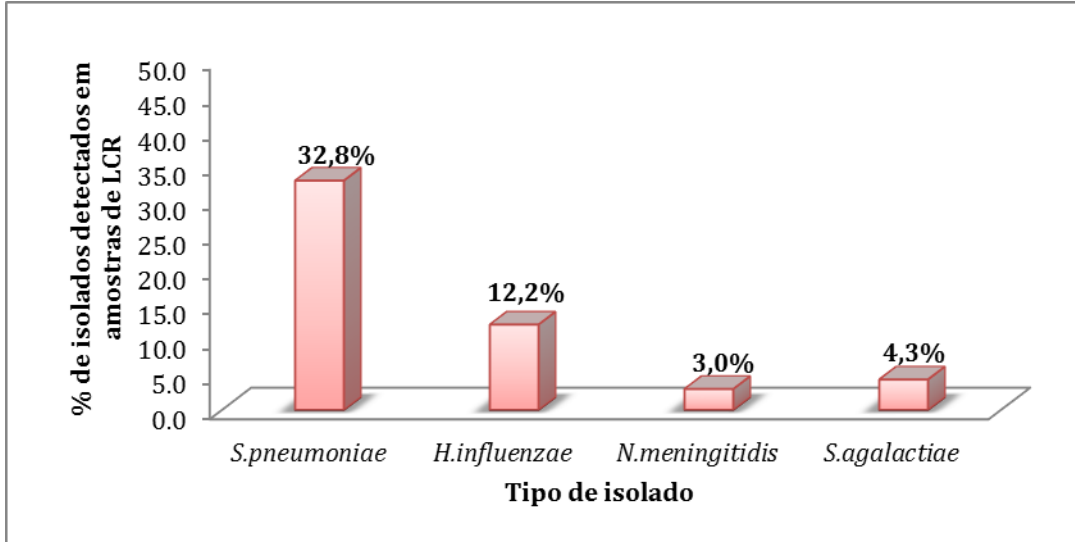


Gráfico 1. Proporção de casos confirmados de MBA em amostras de LCR de casos suspeitos de meningite em Moçambique de 2013 – 2014, usando M-qPCR.

A tabela 14 mostra que a principal causa de MBA foi distinta em diferentes grupos etários. Enquanto em crianças menores de 1 mês, o *S. agalactiae* foi o patógeno mais comum que causa a meningite bacteriana 90% (10/11), em crianças com idade entre 1 mês e 5 anos, o *S. pneumoniae* foi patógeno mais comum da MBA, com uma frequência de 66.5% (121/182), seguido por *H. influenzae* com frequência de 24.2% (44/182) e *N. meningitidis* com frequência de 6.0% (11/182).

Tabela 4. Frequências dos patógenos causadores da MBA estratificada pela idade de pacientes, baseado no M-qPCR

Grupo etário (mês)	No. de casos confirmados de MBA	Bactérias que causam MBA			
		<i>S. pneumoniae</i> n (%)	<i>H. influenzae</i> n (%)	<i>N. meningitidis</i> n (%)	<i>S. agalactiae</i> n (%)
<1	11	0 (0)	1(9.1)	0 (0)	10 (90.9)
1 a 11	124	78 (62.9)	35 (28.2)	6 (4.8)	5 (4.0)
12 a 23	25	19 (76.0)	2 (8.0)	4 (16.0)	0 (0)

24 a 59	33	24 (72.7)	7 (21.2)	1 (3.0)	1 (3.0)
Total	193	121 (62.7)	45 (23.3)	11 (5.7)	16 (8.3)

Variação geográfica e sazonal de frequência dos principais patógenos de MBA

Ao comparar a frequência dos patógenos que causam a MBA entre os três postos sentinel, verificamos que esta foi mais elevada no HCN, localizado no norte de Moçambique com uma frequência de 52.9% (137/259), seguido de HCB no centro de Moçambique com uma frequência de 52.9% (9/17) e HCM no sul de Moçambique com uma frequência de 50.5% (47/93).

A Figura 2 mostra a variação mensal de amostras de LCR colhidas e testadas nos três postos sentinel e demonstrou um aumento de casos suspeitos e confirmados de MBA principalmente na estação fria e seca, com pico no mês de Setembro (Gráfico 2).

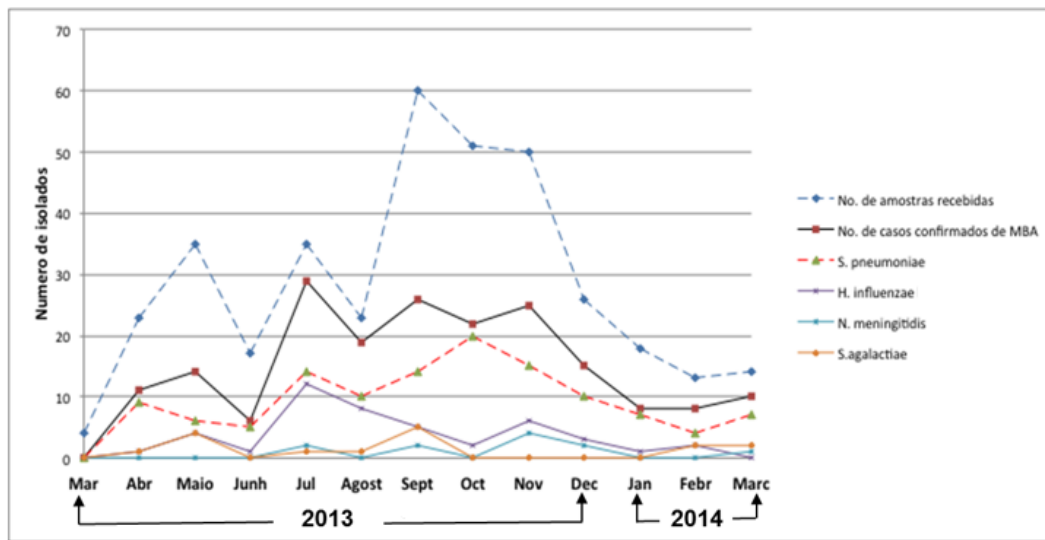


Gráfico 2. Variação mensal de frequência de amostras colhidas e testadas e a frequência relativa de espécies bacterianas em crianças <5 anos de idade usando M-qPCR.

Variáveis associadas à infecções por MBA

Análise de regressão logística foi efectuada para determinar as variáveis associadas à MBA com base nos resultados da técnica de M-qPCR (ver tabela 15).

A análise de regressão logística multivariada, demonstrou que a ABM foi significativamente associada com idade inferior a 12 meses (OR ajustado (aOR) = 3,9;

IC95% = 1,7-9,0; $p = 0,002$), aparência turva do LCR (aOR = 1,8; IC95% = 1,1-3,1; $p = 0,031$), positividade para as proteínas no LCR (aOR = 1,9; IC95% = 1,0-3,5; $p = 0,03$), contagem de leucócitos de 10 a 100 células/mm³ (aOR = 8,7; IC 95% = 3,6-21,1; $p = 0,000$) e > 100 células/mm³ (aOR = 26,7; IC 95% = 8,9-79,1; $p = 0,000$) e níveis de glicose inferior que 40 mg/dL (aOR = 18,6; 95% CI = 3,5-79,1; $p = 0,001$) (tabela 14).

Não foi encontrada associação entre a MBA e regiões geográficas, embora tenha havido tendência de maior frequência de MBA no norte de Moçambique.

Tabela 5. Análise univariada e multivariada de variáveis demográficas e laboratoriais associados com a infecção por MBA em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique, baseados no M-qPCR

Factor de risco	MBA (n=193)	LCR negativo (n=176)	OR não ajustado [95% IC]	p-value	OR ajustado [95% CI]	p-value
Grupo etário, meses						
<1	11 (5.7)	0 (0)	0.0	0.999		
1-11	124 (64.2)	73 (41.5)	3.4 [2.1-5.4]	<0.0001	3.9 [1.7-9.0]	0.002
12 a 23	25 (13.0)	18 (10.2)	2.7 [1.3-5.5]	0.006	3.3 [0.2-11.9]	0.066
24-59	33 (17.1)	85 (48.3)	1			
Sexo						
Masculino	96 (49.70)	97 (55.1)	1			
Feminino	97 (50.3)	79 (44.3)	1.2 [0.8-1.9]	0.302		
Aparência de LCR						
Límpido	36 (18.7)	66 (37.5)	1			
Turvo	154 (79.8)	102 (58.0)	2.9 [1.8-4.5]	<0.0001	1.8 [1.1-3.1]	0.031
Hemático	1 (0.5)	0 (0)				
Casos em falta	1 (1.0)	8 (4.5)				
Proteínas						
Negativo	26 (13.5)	61 (34.7)	1			
Positivo	75 (38.9)	27 (15.3)	3.5 [2.1-5.8]	<0.0001	1.9 [2.1-3.5]	0.035
Casos em falta	92 (47.7)	88 (50.0)				
Contagem de leucócitos, cells/mm³						
<10	30 (15.5)	85 (48.3)	1			
10-100	67 (34.7)	33 (18.8)	6.8 [3.0-10.4]	<0.0001	8.7 [3.6-21.1]	0.000
>100	92 (47.7)	17(9.7)	17.6 [3.0-10.4]	<0.0001	26.7 8.9-79.1]	0.000
Casos ausentes	4 (2.1)	41 (23.3)				
Níveis de Glicose no LCR, mg/dL						

> 40	2 (1.0)	9 (5.1)	1		
< 40	49 (25.4)	4 (2.3)	14.1 [4.9-39.9]	18.6 [3.5-97.7]	0.001
				<0.0001	
Casos ausentes	142 (73.6)	163 (92.6)			
Resultados de coloração de Gram					
Positivo	137 (71.0)	176 (100)	1.4 [1.28-1.54]	0.0	0.000
				<0.0001	
Negativo	56 (29.0)	0 (0)	1		
Hospitais					
HCB	9 (4.7)	8 (4.6)	1		
HCM	47 (24.3)	46 (26.1)	1.1 [0.4-3.81]	0.855	
HCN	137 (71.0)	122 (69.3)	1.0 [0.7-1.77]	0.696	

OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança; LCR, líquido cefalorraquidiano

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos

A tabela 16 resume o perfil de susceptibilidade aos antibióticos para as quatro espécies bacterianas isoladas neste estudo. Todos os 17 isolados de *S. pneumoniae* foram sensíveis à ceftriaxona e levofloxacina, e todos os isolados foram resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima (SXT). Diferentes níveis no perfil de resistência também foram observados para penicilina (88,2%), vancomicina (11,8%), eritromicina (23,5%) e cloranfenicol (35,3%).

Todos os cinco isolados de *H. influenzae* foram sensíveis à ampicilina e apenas um foi resistente à cloranfenicol e ceftriaxona (20%).

Entre os 3 isolados de meningococos, apenas um foi resistente à ampicilina e cloranfenicol (33.3%). Todos os 2 isolados de estreptococos do grupo B foram sensíveis à eritromicina, levofloxacina e ceftriaxona e todos foram resistentes à vancomicina e à ampicilina.

Tabela 6. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos patógenos de MBA isolados a partir de amostras de LCR

Antibiótico	<i>S. pneumoniae</i> (n= 17)		<i>H. influenzae</i> (n= 5)		<i>N. meningitidis</i> (n= 3)		<i>S. agalactiae</i> (n= 2)	
	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Penicilina	88.2	11.8	-	-	-	-	-	-
Vancomicina	11.8	88.2	-	-	-	-	100	0
Tetraciclina	64.7	35.3	-	-	-	-	-	-

Sulfametoxazol/ Trimetoprima	100	0	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	23.5	76.5	-	-	-	-	0	100
Levofloxacina	0	100	-	-	-	-	0	100
Ceftriaxona	0	100	100	0	0	100	0	100
Cloranfenicol	35.3	64.7	20	80	33.3	66.7	-	-
Ampicilina	-	-	0	100	33.3	66.7	100	0
Clindamicina	-	-	-	-	-	-	0	100

R-resistente; S-sensível; Antibióticos não foram testados para todos os patógenos com traço (-).

Concordância entre a M-qPCR e a cultura bacteriana

No presente estudo, o diagnóstico por cultura foi ocasionalmente realizada imediatamente, e frequentemente era realizada após 2 horas, o que poderá ter diminuído potencialmente a sensibilidade da cultura. Além disso, o uso de antibióticos antes da punção lombar também contribuiu na redução da sensibilidade da cultura. Para determinar a sensibilidade e especificidade, valores preditivos negativo e positivo, os resultados de M-qPCR (padrão ouro) foram comparados com os resultados obtidos pela cultura. Ambos métodos foram realizados em 369 amostras de crianças com suspeita de meningite. A sensibilidade da cultura foi mais baixa para o diagnóstico de meningite bacteriana (14%) (tabela 3) e por patógeno foi de 27.3% para *N. meningitidis*, 14% *S. pneumoniae*, 12.5% *S. agalactiae* e 11.1% *H. influenzae*. A especificidade da cultura foi de 100% para todos os patógenos investigados e, como esperado, a PCR identificou casos que não tinham sido identificados por cultura para cada etiologia. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 100% e 47.7% respectivamente. A concordância entre os dois testes foi fraca ($kappa = 0.134$), e a diferença entre os dois testes foi estatisticamente significativa ($p = 0,000$), utilizando o teste McNemar.

Distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae*

Das 121 amostras positivas para *S. pneumoniae* (17 isolados e 114 amostras de LCR), foi selecionado o DNA de 50 pneumococos com threshold cycle ou Ct (ciclo limiar) mais baixo (dados não ilustrados). Destes, 33 foram serotipados e 17 não foram tipificáveis. A distribuição dos serotipos e a respectiva frequência foi a seguinte: 1 (18.2%), 5 (15.2%), 14 (12.1%), 9V (12.1%), 23F (9.1%), 6A (9.1%), 4 (9.1%), 6B (6.1%), 12 (3.0%), 15BC

(3.0%) e 3 (3.0%). A proporção de isolados pertencentes a serotipos incluídos nas vacinas PCV-7, PCV-10 e PCV-13 foi de 48.5%, 81.8% e 93.9, respectivamente (Gráfico 3).

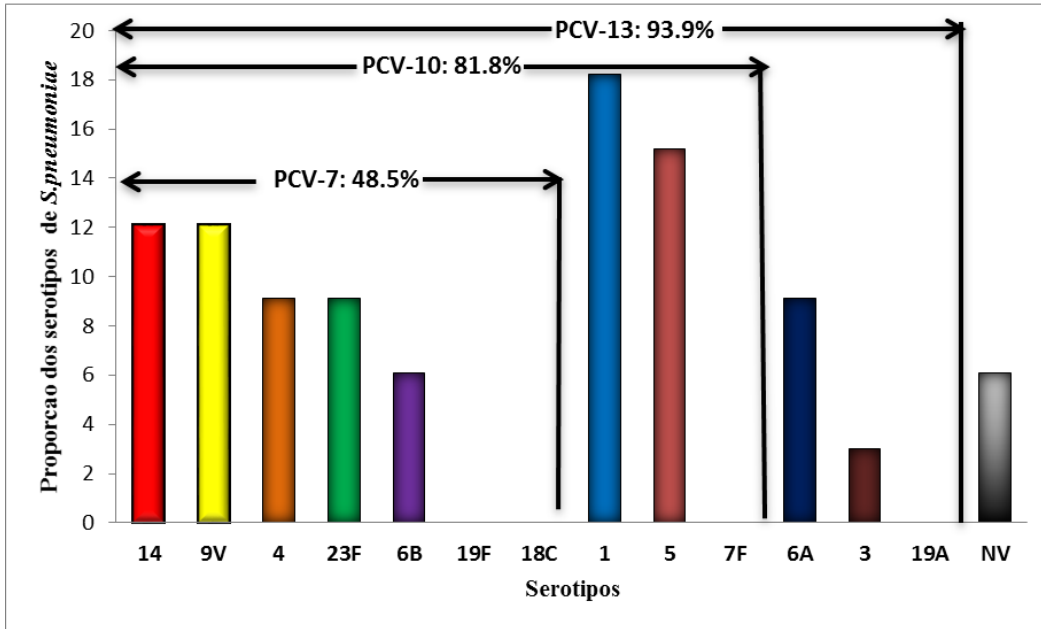


Gráfico 3. Distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* e proporção de isolados pertencentes a serotipos incluídos nas vacinas. NV indica serotipos não vacinais

A tabela 17 mostra a frequência dos principais serotipos em diferentes grupos etários. Em crianças menores de 2 anos de idade predominam os serotipos 1, 4, 5, 9V, 14, 6A, 23F, 3, 12 e 15B/C enquanto que em crianças maiores de 2 anos de idade foram encontrados os serotipos 1, 6A, 9V, 14 e 23F. Os serotipos 12 e 15B/C não são vacinais, isto é, não estão incluídos em nenhuma das três vacinas licenciadas (PCV 7, 10 e 13), enquanto que os serotipos 3 e 6A só estão incluídos na vacina PCV-13.

Tabela 7. Distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* de acordo com os grupos etários de crianças menores de 5 anos de idade

Serotipo	< 1	1 – 11	12 – 23	24 – 59	Total
	mês	meses	meses	meses	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	0 (0)	5 (20.8)	0 (0)	1 (20.0)	6 (18.2)
5	0 (0)	4 (16.7)	1 (25.0)	0 (0)	5 (15.2)
14	0 (0)	3 (12.5)	0 (0)	1 (20.0)	4 (12.1)

9V	0 (0)	3 (12.5)	0 (0)	1 (20.0)	4 (12.1)
6A	0 (0)	2 (8.3)	0 (0)	1 (20.0)	3 (9.1)
4	0 (0)	3 (12.5)	0 (0)	0 (0)	3 (9.1)
23F	0 (0)	1 (4.2)	1 (25.0)	1 (20.0)	3 (9.1)
6B	0 (0)	2 (8.3)	0 (0)	0 (0)	2 (6.1)
12	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	0 (0)	1 (3.0)
15B/C	0 (0)	0 (0)	1 (25.0)	0 (0)	1 (3.0)
3	0 (0)	0 (0)	1 (25.0)	0 (0)	1 (3.0)
Total	0 (0)	24 (100)	4 (100)	5 (100)	33 (100)

De acordo com a distribuição geográfica, observou-se que os serotipos 1, 5, 9V, 6A e 12 foram mais predominantes na região norte do país (Nampula), enquanto que na região sul (Maputo) predominam os serotipos 23F, 4, 6B, 3 e 15B/C (gráfico 4). Além disso, os serotipos 3 e 15B/C não PCV 10 foram encontrados somente na região sul do país. Todos isolados da região centro do país (Sofala) não foram tipificáveis.

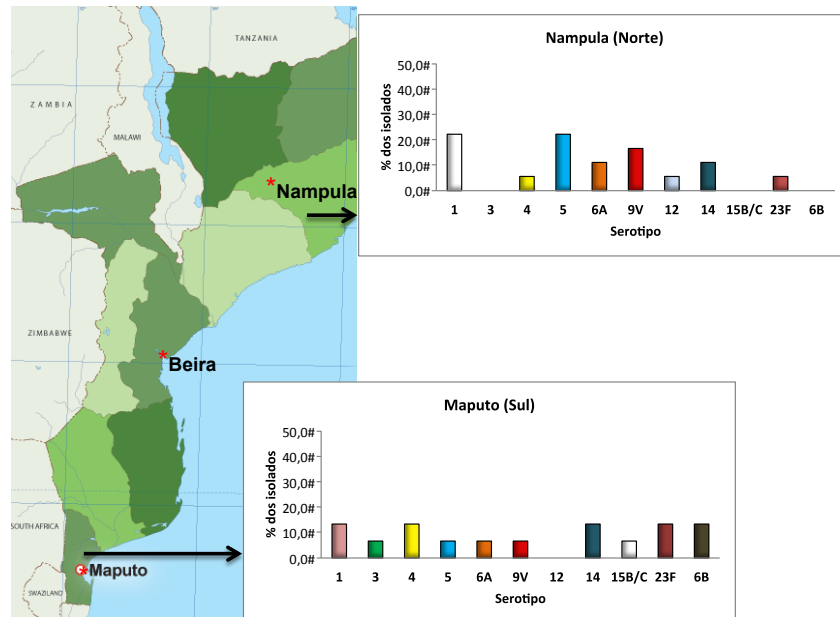


Gráfico 4. Distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* mais frequentes por região geográfica.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos serotipos de *S. pneumoniae*

A tabela 18 mostra o perfil de susceptibilidade aos antibióticos de acordo com o serotipo. Todos os serotipos 1, 3, 4, 6, 14 e 23F foram resistentes a penicilina excepto os

serotipos 9V e 15B/C. Ao contrário, nenhum serotipo foi resistente a ceftriaxona. Quanto a resistência aos macrolídeos, o serotipo 23F mostrou uma taxa de resistência de 100% a eritromicina.

Tabela 8. Perfil de susceptibilidade dos serotipos de *S. pneumoniae* isolados em amostras de LCR

Serotipo	PG		Eritro.		SXT		Vanc.		Ceftri.		Tetra.		Cloran.	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
1	0%	100%	100%	0%	0%	100%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	0%	100%
3	0%	100%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%
4	0%	100%	50%	50%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	50%	50%
6B	0%	100%	100%	0%	0%	100%	0%	100%	100%	0%	0%	100%	0%	100%
9V	100%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%
14	100%	100%	75%	25%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	25%	75%	100%	0%
15BC	100%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%
23F	0%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	100%

S: sensível; **R:** resistente; **PG:** penicilina G; **Eritro.:** eritromicina; **SXT:** sulfametoxazol/trimetoprima; **Vanc.:** vancomicina; **Ceftri.:** ceftriaxona; **Cloran.:** cloranfenicol

7. Discussão

Este estudo representa a primeira descrição da etiologia da MBA e da distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* em crianças menores de 5 anos de idade em três diferentes regiões de Moçambique. Por isso, este é o primeiro estudo cujos resultados são mais representativos da distribuição a nível nacional, uma vez que estudos anteriores foram todos realizados em unidades sanitárias de sul de Moçambique (Sigauque *et al.*, 2008; Zimba *et al.*, 2009). Apesar de ter sido seleccionado apenas uma unidade sanitária em cada região do país, estes são os três principais hospitais do país que desempenham o papel de unidade sanitária de referência em cada região. A importância deste estudo é incrementada pelo facto de que, pela primeira vez, foi usado um método molecular baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico de MBA, com vista a melhorar a taxa de detecção de patógenos bacterianos em amostras de LCR. Uma vez que todas as amostras foram testadas em paralelo pela cultura e pelo M-qPCR, foi possível comparar o desempenho das duas técnicas. Os resultados deste estudo revelaram um aumento em até sete vezes na taxa de detecção da MBA pelo método de M-qPCR, em relação à cultura (frequências de 52.3% pelo método de M-qPCR versus 7% usando a cultura, respectivamente).

Assim, o método M-qPCR mostrou que a prevalência da meningite bacteriana na idade pediátrica em Moçambique ainda é muito alta. Esta frequência é muito maior do que a frequência reportada em estudos anteriores realizados na mesma faixa etária em Moçambique, que reportaram as frequências de 15% e 13,9%, respectivamente (Sigauque *et al.*, 2008; Zimba *et al.*, 2009). Porém, quando usou-se cultura, a prevalência de MBA foi similar aos estudos anteriormente realizados por (Roca *et al.*, 2009; Sigauque *et al.*, 2008). Metodologicamente, o nosso estudo difere de estudos anteriores, pois pela primeira vez foi utilizado o PCR em tempo real altamente sensível, o que explica estas diferenças na frequência de MBA. De facto, achados similares foram repetidamente reportados em outros países (Jbara *et al.*, 2007; Sacchi *et al.*, 2011). Hoje em dia é amplamente reconhecida que a cultura microbiológica é limitada pela sua baixa sensibilidade (Corless *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2013). M-qPCR tem a vantagem adicional de proporcionar resultados mais rapidamente e os resultados são disponíveis em poucas

horas, enquanto que o método de cultura requer, pelo menos, um dia para reportar o resultado (Parent du Chatelet *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2013).

Adicionalmente, M-qPCR é menos afectada pelo consumo de antibióticos antes da punção lombar (Wu *et al.*, 2013) e amplificação de DNA de bactérias não viáveis melhora a identificação em amostras negativas de cultura (Brouwer *et al.*, 2010a; Brouwer *et al.*, 2010b; Bryant *et al.*, 2004; Corless *et al.*, 2001; Sacchi *et al.*, 2011; Tuyama *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que a M-qPCR, se incorporada na rotina de vigilância em saúde pública pode melhorar a taxa de detecção de patógenos de meningite bacteriana em Moçambique e, conseqüentemente, melhorar as estimativas de incidência das doenças e proporcionando uma melhor avaliação do impacto da vacinação no país.

O uso de métodos moleculares baseados na detecção e amplificação do gene *ply* causa algumas restrições quanto ao seu uso como ferramenta no diagnóstico especialmente em amostras de trato respiratório (como por exemplo expectoração) uma vez *Streptococcus* de grupo Mitis habitam no trato respiratório superior e que expressam o gene *ply* (Neeleman *et al.*, 2004). No entanto, os estreptococos do grupo viridans, no qual estão incluídos os do grupo Mitis, raramente causam meningite. Recentemente, o gene *lytA* foi considerado um melhor gene e mais específico para a detecção de *S. pneumoniae* por PCR em amostras clínicas (Collard *et al.*, 2013). O nosso PCR em tempo real foi desenvolvido há poucos anos atrás e nessa altura o gene *ply* era considerado aceitável para a detecção de *S. pneumoniae* por PCR. Acreditamos, contudo, que a maioria dos estreptococos encontrados no LCR realmente representam os *S. pneumoniae*. Em nossas amostras, pelo menos, a presença de outro estreptococo encontrada no LCR, *S. agalactiae*, poderia ser descartada pelo uso de um conjunto de iniciadores específicos para *S. agalactiae*. Adicionalmente, estamos realizando a serotipagem de todas amostras positivas para *S. pneumoniae* usando a reação direta PCR multiplex sequencial e, em todo LCR positivo para *S. pneumoniae* até agora foi confirmado pertencer a um sorotipo específico.

Os resultados deste estudo mostram que, *S. pneumoniae* foi a principal causa de meningite bacteriana na infância em Moçambique, sendo responsável por mais da metade (62,7%) de todos os casos de MBA confirmados laboratorialmente, usando a M-qPCR. Nossos resultados são similares aos descritos anteriormente em crianças com menos de 5 anos de idade em outros países de África Sub-sahariana (Peltola, 2001; Sigauque *et al.*, 2008; Traore *et al.*, 2009; Yaro *et al.*, 2006a; Yaro *et al.*, 2006b).

O peso da meningite pneumocócica em crianças menores de 5 anos de idade em muitos países tem demonstrado uma diminuição dramática após a introdução da vacina pneumocócica conjugada (Hsu *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2009). Portanto, em Moçambique, a vacina pneumocócica conjugada decavalente (PCV-10) foi introduzida muito recentemente e, é por isso que *S. pneumoniae* continua a ser a causa mais comum da meningite bacteriana na infância em Moçambique.

Nós identificamos *H. influenzae* em 12.2% de todas as amostras de LCR usando a M-qPCR, o que contrasta com a prevalência mais baixa reportada em dois estudos anteriores realizados em Moçambique (Sigauque *et al.*, 2008; Zimba *et al.*, 2009). Entretanto, quando se usou a cultura a prevalência de *H. influenzae* foi similar aos estudos anteriores realizados por (Sigauque *et al.*, 2008; Zimba *et al.*, 2009). Mais uma vez, a maior frequência encontrada neste estudo quando utilizada a técnica molecular M-qPCR, é explicada pela sua elevada sensibilidade, o que melhora dramaticamente a taxa de detecção dos patógenos. A M-qPCR não foi utilizada nos estudos acima citados. O impacto da vacina contra *Hib* na redução da doença invasiva por *Hib* após sua introdução tem sido reportado na África do Sul (Visser & Hoosen, 2012) e muitos outros países em todo o mundo (Arda *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2013; Hajjeh *et al.*, 2013; Khowaja *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013), incluindo Moçambique (Sigauque *et al.*, 2013). No entanto, pode-se hipotetizar que a emergência de novos serotipos não *Hib* seja responsável pelo aumento de casos de *H. influenzae*, por isso, mais estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

N. meningitidis foi o terceiro agente mais comum neste estudo, embora com prevalência relativamente baixa. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados na Manhica, um distrito situado no sul de Moçambique (Sigauque *et al.*, 2008)

e em outros países africanos (Peltola, 2001). De facto, em outros países como nos Estados Unidos, a frequência relativa de meningite meningocócica tem demonstrado um aumento após a introdução da vacina *Hib* (Poland, 2010) e também no cinturão de meningite africano, causando surtos, que afectam principalmente Burkina Faso, Benin, Chade e Ghana (WHO, 2013). No entanto, o meningococo teve uma participação relativamente baixa nos casos confirmados de MBA reportados neste estudo.

A contribuição de outros patógenos que causam a meningite bacteriana, com excepção dos pneumococos, *H. influenzae* e meningococo tem sido reportada em muitos países em desenvolvimento (Owusu *et al.*, 2012). Neste estudo observamos que *S. agalactiae* (estreptococos do grupo B) foi identificado na maioria dos casos confirmados de MBA em recém nascidos usando cultura (0,5%) e M-qPCR (4,3%). Achados similares foram reportados em vários estudos realizados em outros países africanos (Airede *et al.*, 2008; Berardi *et al.*, 2010; Berardi *et al.*, 2013; Milledge *et al.*, 2005; Swann *et al.*, 2014).

Em vários países no mundo inteiro, especialmente na África Sub-sahariana e na Ásia, *S. agalactiae* constitui a principal causa de meningite bacteriana nos neonatos (Fluegge *et al.*, 2006; Schuchat, 1998). A meningite neonatal causada por *S. agalactiae* também está associada com elevada morbi-mortalidade em muitos países do mundo (Black *et al.*, 2010; Seale *et al.*, 2013; Swann *et al.*, 2014), apesar da disponibilidade de medidas preventivas e terapêuticas acessíveis (de la Rosa Fraile *et al.*, 2001; McKenna & Iams, 1998; Schrag *et al.*, 2000a; Schrag *et al.*, 2000b; Seale *et al.*, 2013).

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, verificou-se que os isolados de *S. pneumoniae* foram altamente resistentes à penicilina (88,2% dos isolados) e sulfametoxazol/trimetroprima (100% dos isolados). Portanto, estes resultados diferem dos resultados de estudos anteriores realizados em Moçambique que reportaram que 90% dos isolados de pneumococos foi sensível à penicilina (Roca *et al.*, 2009), mas estão de acordo com os achados de outros estudos realizados em alguns países de África, como Etiópia e Kuwait (Mokaddas *et al.*, 2007) e Nigéria (Anagaw *et al.*, 2013; Mokaddas *et al.*, 2007; Waisbourd-Zinman *et al.*, 2010) e em vários outros países do mundo (Jones *et*

al., 2013a; Jones *et al.*, 2013b; Tali-Maamar *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2010). Essas diferenças podem ser explicadas pela diferença no desenho de estudo, período de realização de estudo e também pela diferença na metodologia laboratorial entre os estudos.

Globalmente, vários estudos têm demonstrado uma tendência crescente na resistência de serotipos de *S. pneumoniae* a penicilina e a outras classes de antibióticos (Jones *et al.*, 2003; Tali-Maamar *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2010), principalmente em países onde não foram introduzidas as PCVs nos programas de imunização infantil, e mesmo em regiões onde as vacinas conjugadas estão disponíveis e altamente eficazes em crianças menores de 5 anos de idade (Jones *et al.*, 2013b). Notavelmente, taxas elevadas de resistências tem sido associadas ao consumo inapropriado de antibióticos (Linares *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2013); e ao fenómeno de substituição (do inglês: *replacement*) de serotipos vacinais por outros serotipos não vacinais e altamente resistentes a drogas (Gertz *et al.*, 2010; Mera *et al.*, 2008).

Em Moçambique, a taxa de resistência à penicilina foi elevada. Esta resistência muito provavelmente é atribuída aos serotipos 1, 3, 4, 6B, 14 e 23F pois todos foram resistentes à penicilina. Estes achados são similares aos resultados encontrados recentemente na África do Sul (von Gottberg *et al.*, 2013) e Argélia (Tali-Maamar *et al.*, 2012) e China (Ma *et al.*, 2013), a taxa de resistência à penicilina para os serotipos incluídos na PCV-10 foi de 81%, 100% e 100%, respectivamente.

Isolados de pneumococos, *H. influenzae*, meningococos e *S. agalactiae* foram 100% sensíveis à ceftriaxona. Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados em vários países da África Subsaariana (Adjei & Agbemadzo, 1996; Commey *et al.*, 1994; Owusu *et al.*, 2012).

A prescrição de antibióticos para a terapia de meningite bacteriana depende dos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos (Owusu *et al.*, 2012). As diretrizes nacionais para o tratamento de MBA recomendam a administração da penicilina G

associada a gentamicina ou cloranfenicol como a primeira escolha (Roca *et al.*, 2009) e como alternativa a ceftriaxona (CLSI, 2014). Neste contexto, os resultados deste estudo sugerem que a ceftriaxona pode ser considerada como a melhor escolha para o tratamento da MBA em crianças.

Também investigamos os preditores de MBA no nosso grupo de estudo e observamos que a coloração de Gram teve uma proporção de 71% de positividade. A coloração de Gram nas amostras de LCR é considerada um dos métodos mais importantes para a identificação presuntiva de meningite bacteriana. Além disso, este método é rápido e barato (Brouwer *et al.*, 2010b). No entanto, as habilidades dos técnicos/operador afectam na precisão do método. Em nosso estudo, a competência do pessoal de laboratório em cada local de estudo (avaliado antes do início do estudo usando painéis de proficiência fornecidos pelo laboratório de referência) provavelmente contribuiu para o excelente desempenho da coloração de Gram. Portanto, este pode não ser o cenário em outros hospitais ou centros de saúde em Moçambique.

Observamos também que a idade da criança, contagem de leucócitos, níveis de glicose e proteínas no LCR também foram fortemente associadas à MBA, o que é similar aos achados de outros autores (Adegbola *et al.*, 2005; Jbara *et al.*, 2007; Mani *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 1999; Traore *et al.*, 2009; van de Beek *et al.*, 2006) e crianças menores de 12 meses de idade têm um risco de 3,9 vezes maior de infectar-se por MBA quando comparadas com crianças maiores de 2 anos de idade ($p < 0,002$).

Dados sobre a variação sazonal da MBA demonstraram que a MBA registou um incremento entre os meses de Julho e Novembro, atingindo o pico em Julho. Isto não é surpreendente uma vez que a estação seca proporciona condições para a destruição das defesas das mucosas, tornando crianças susceptíveis a meningite (Denno *et al.*, 2002; Gessner *et al.*, 2010; Greenwood, 1999; Leimkugel *et al.*, 2005). Além disso, o aumento da frequência de doença respiratória viral durante a estação seca aumenta significativamente este problema (von Mollendorf *et al.*, 2014; Wolter *et al.*, 2014).

A distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* varia por região geográfica e idade (Ma *et al.*, 2013; Gessner *et al.*, 2012). Neste estudo, os serotipos mais prevalentes foram diferentes aos reportados em outros países africanos em qualquer ordem ou proporção dos serotipos predominantes. Um estudo recentemente publicado na África do Sul mostrou que os serotipos mais prevalentes em ordem decrescente da proporção foram 14, 6B, 19F, 23F, 6A, 19A, 1 e 5 (von Gottberg *et al.*, 2013). Em relação a Burkina Faso e Togo reportaram os serotipos 14, 1 e 18 (Gessner *et al.*, 2012) e Nigéria reportou os serotipos 1, 12, 6, 14, 5, 23F, 45, 2, 18 e 17 (Collard *et al.*, 2013). No entanto, nós encontramos os serotipos 1, 5, 14, 9V, 23F, 6A e 4 como os mais prevalentes, com destaque para a alta prevalência dos serotipos 1 e 5, que são comumente encontrados no sul de Moçambique (Valles *et al.*, 2006).

De acordo com os dados produzidos neste estudo, 81.8% dos serotipos circulantes no país são cobertos pela vacina PCV-10, dados semelhantes aos nossos foram descritos no sul de Moçambique (Valles *et al.*, 2006) e recentemente na África do Sul (von Gottberg *et al.*, 2013), e em outros países localizados no cinturão de meningite africano, como Burkina Faso e Togo (Mueller *et al.*, 2012; Traore *et al.*, 2009) e Nigéria (Collard *et al.*, 2013) onde a proporção de isolados pertencentes a serotipos incluídos na vacina PCV-10 varia entre 53% e 68.2%. Estes dados sugerem que a troca da vacina PCV-10 para PCV-13 pode aumentar a cobertura de serotipos de *S. pneumoniae* para 93.9% (um aumento adicional de 12.1%) porque, ao contrário da PCV10, contém os serotipos 3, 6A e 19A, que desempenham um papel importante na meningite pneumocócica e outras doenças pneumocócicas invasivas em diferentes países da África (Donkor *et al.*, 2012).

Os resultados deste estudo mostram também que o serotipo 1 foi o mais predominante em crianças menores de 5 anos de idade e constitui a primeira causa de meningite pneumocócica em Moçambique. Numa revisão sistemática, realizada em diferentes regiões geográficas, para estimar a distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* que causam doenças pneumocócicas invasivas, especialmente meningites em crianças menores de 5 anos de idade, o serotipo 1, com uma frequência de 12%, foi o segundo mais frequente em África (Black *et al.*, 2010).

Em Moçambique, a frequência do serotipo 1 foi de 20.8% em crianças menores de 1 ano de idade que é maior do que a reportada em outros estudos africanos onde a proporção do serotipo 1 varia entre 2 e 5% (von Gottberg *et al.*, 2013). No entanto, estes achados são similares aos estudos anteriormente descritos no sul de Moçambique (Valles *et al.*, 2006), além de que essa faixa etária é mais susceptível à doença. A elevada prevalência do serotipo 1 pode reflectir a um surto de um clone virulento no país, e já foram descritas epidemias de grandes proporções causadas pelo serotipo 1, especialmente em Gana, onde este serotipo foi responsável por 76% dos casos de meningite pneumocócica (Leimkugel *et al.*, 2005). Assim, futuras investigações sobre a distribuição dos serotipos circulantes no país em vários anos após a introdução das PCVs são necessárias para identificar a emergência de novos serotipos. Essa informação é importante, pois permitirá avaliar futuramente o impacto da vacina na distribuição dos serotipos de pneumococos e seleccionar a melhor formulação da vacina.

Além disso, foi observamos a presença do serotipo 3 em crianças menores de 2 anos, embora com baixa frequência. Resultados similares foram observados recentemente na África do sul (von Gottberg *et al.*, 2013) e Senegal, Gana e Nigéria (Donkor *et al.*, 2012). O serotipo 3 é uma importante causa de doença pneumocócica invasiva, especialmente em meningites em crianças menores de 2 anos (Hausdorff *et al.*, 2005), e tem sido associado a elevadas taxas de fatalidade (Henriques *et al.*, 2000; Mothibeli *et al.*, 2010), o que justificaria a sua inclusão em uma vacina para a proteção de crianças menores de 2 anos.

Notavelmente, 6% dos isolados que expressam os serotipos 12 e 15 B/C encontrados no presente estudo, em crianças maiores de 2 anos, não foram encontrados no estudo anterior (Valles *et al.*, 2006). Estes resultados são similares aos resultados reportados na África do Sul (von Gottberg *et al.*, 2013) e outras regiões de África (Black *et al.*, 2010). O serotipo 12 foi encontrado na região norte do país enquanto que o serotipo 15 B/C foi encontrado no sul do país. Estes serotipos estão incluídos na vacina polissacarídica não conjugada e não estão incluídos em nenhuma das PCVs, mas raramente causam doenças

pneumocócias invasivas, em especial a meningite, por isso a vacina polissacarídica não conjugada provavelmente seria de pouca utilidade em Moçambique na época da PCVs.

O presente estudo teve algumas limitações tais como: 1) o número de pacientes recrutados em cada local estudo foi diferente, o que representa um viés de amostragem. Isso pode ser atribuída à diferenças nas características demográficas das populações de cada região, diferença na capacidade de cada hospital e as diferenças na eficiência para se registar pacientes 2) a tipagem molecular de *H. influenzae* para investigar a distribuição dos serotipos de esta bactéria não foi realizado e, por esta razão, não fomos capazes de discriminar o tipo b e cepas não tipo b de *H. influenzae*; 3) a detecção molecular de pneumococos, foi realizada utilizando gene *ply* que não é 100% específico para pneumococos; 4) o teste beta-lactamase sobre os isolados de *H. influenzae* não foi realizada; 5) os resultados dos pacientes sobreviventes ou que morreram no momento da alta não foram registados correctamente nos formulários de notificação de casos de meningite. Por isso, não foi possível determinar a taxa de mortalidade por agente etiológico e por região geográfica; 6) isolados de *S. pneumoniae* que foram enviados a partir do Hospital Central da Beira, no centro do país não foram tipificáveis, portanto, os dados da distribuição dos serotipos de *S. pneumoniae* que causam a meningite em crianças moçambicanas podem não refletir a população pediátrica a nível nacional. No entanto, os resultados podem refletir uma tendência global nas mudanças de serotipos de *S. pneumoniae* em Moçambique.

8. Conclusão

Segundo os resultados encontrados neste estudo podemos concluir que a MBA é altamente prevalente em crianças com meningite, que *S. pneumoniae* foi a causa mais comum de meningite bacteriana aguda em crianças <5 anos de idade e que a faixa etária associada com maior prevalência da MBA é de 0-12 meses.

A técnica Multiplex qPCR teve um papel importante na detecção de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *S. agalactiae*, tendo aumentado a detecção em relação à cultura. Por isso a implementação de ensaios de M-qPCR para o diagnóstico de meningite bacteriana é de extrema importância para superar a baixa sensibilidade da cultura o que de outra forma resulta em alta taxa de diagnósticos incorrectos de MBA em Moçambique.

Com base nos dados do nosso estudo, também concluímos que os serotipos 1, 3, 4, 6B, 14 e 23F apresentaram maior resistência a penicilina e cotrimoxazole e elevada susceptibilidade à ceftriaxona e que nesta faixa etária a ampicilina e ceftriaxona podem ser os antibióticos de preferência para o tratamento de meningite bacteriana.

Nossos resultados confirmam também que a monitorização contínua da MBA é necessária para avaliar as alterações na resistência a antibióticos e o impacto da introdução da vacina PCV 10 e reforçam a importância de implementar um sistema de vigilância nacional de meningite para fornecer evidências para a tomada de decisões e definição de políticas de saúde.

Finalmente, considerando a elevada prevalência dos serotipos incluídos na PCV10 e a emergência dos serotipos 3 e 6A, recomendamos a introdução da PCV13 para melhor cobertura das estirpes de pneumococos envolvidas na etiologia das meningites em crianças.

9. Bibliografia

1. Adegbola, R. A., O. Secka, G. Lahai, N. Lloyd-Evans, A. Njie, S. Usen, C. Oluwalana, S. Obaro, M. Weber, T. Corrah, K. Mulholland, K. McAdam, B. Greenwood and P. J. Milligan 2005. Elimination of Haemophilus influenzae type b (Hib) disease from The Gambia after the introduction of routine immunisation with a Hib conjugate vaccine: a prospective study. *Lancet* 366: 144-150. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66788-8
2. Adjei, O. and T. Agbemadzo 1996. Susceptibility of Streptococcus pneumoniae strains isolated from cerebrospinal fluid in Ghana. *J Antimicrob Chemother* 38: 746-747.
3. Airede, K. I., O. Adeyemi and T. Ibrahim 2008. Neonatal bacterial meningitis and dexamethasone adjunctive usage in Nigeria. *Niger J Clin Pract* 11: 235-245.
4. Akira, S. 2000b. Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochem Soc Trans* 28: 551-556.
5. Albiger, B., S. Dahlberg, A. Sandgren, F. Wartha, K. Beiter, H. Katsuragi, S. Akira, S. Normark and B. Henriques-Normark 2007. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 9: 633-644. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00814.x
6. Anagaw, B., M. Gezachew, F. Biadgelgene, T. Geleshe, B. Taddese, B. Getie, M. Endris, A. Mulu and C. Unakal 2013. Antimicrobial susceptibility patterns of Streptococcus pneumoniae over 6 years at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed* 3: 536-541. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60109-4
7. Appelbaum, P. C. 1996. Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria. *Pneumococci. Drugs* 51 Suppl 1: 1-5.
8. Arbique, J. C., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Quesne, G. Carvalho Mda, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, D. Jackson, R. J. Davidson and R. R. Facklam 2004. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of Streptococcus pneumoniae and description of Streptococcus pseudopneumoniae sp. nov. *J Clin Microbiol* 42: 4686-4696. doi: 10.1128/JCM.42.10.4686-4696.2004
9. Arda, B., O. R. Sipahi, S. Atalay and S. Ulusoy 2008. Pooled analysis of 2,408 cases of acute adult purulent meningitis from Turkey. *Med Princ Pract* 17: 76-79. doi: 10.1159/000109595
10. Ayieko, P. and M. English 2007. Case management of childhood pneumonia in developing countries. *Pediatr Infect Dis J* 26: 432-440. doi: 10.1097/01.inf.0000260107.79355.7d.

11. Backman, A., P. Lantz, P. Radstrom and P. Olcen 1999. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Mol Cell Probes* 13: 49-60.
12. Bale, J. F., Jr. and J. R. Murph 1997. Infections of the central nervous system in the newborn. *Clin Perinatol* 24: 787-806.
13. Barbour, M. L. 1996. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg Infect Dis* 2: 176-182. doi: 10.3201/eid0203.960303
14. Baril, L., J. Dietemann, M. Essevaz-Roulet, L. Beniguel, P. Coan, D. E. Briles, B. Guy and G. Cozon 2006. Pneumococcal surface protein A (PspA) is effective at eliciting T cell-mediated responses during invasive pneumococcal disease in adults. *Clin Exp Immunol* 145: 277-286. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03148.x
15. Barocchi, M. A., J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, S. Dahlberg, J. Fernebro, M. Moschioni, V. Masignani, K. Hultenby, A. R. Taddei, K. Beiter, F. Wartha, A. von Euler, A. Covacci, D. W. Holden, S. Normark, R. Rappuoli and B. Henriques-Normark 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2857-2862. doi: 10.1073/pnas.0511017103
16. Bell, W. E. and W. F. McCormick 1981. Neurologic infections in children. *Major Probl Clin Pediatr* 12: 1-709.
17. Berardi, A., L. Lugli, D. Baronciani, C. Rossi, M. Ciccia, R. Creti, L. Gambini, S. Mariani, I. Papa, E. Tridapalli, F. Vagnarelli and F. Ferrari 2010. Group B *Streptococcus* early-onset disease in Emilia-romagna: review after introduction of a screening-based approach. *Pediatr Infect Dis J* 29: 115-121. doi: 10.1097/INF.0b013e3181b83cd9
18. Berardi, A., C. Rossi, R. Creti, M. China, G. Gherardi, C. Venturelli, F. Rumpianesi and F. Ferrari 2013. Group B streptococcal colonization in 160 mother-baby pairs: a prospective cohort study. *J Pediatr* 163: 1099-1104 e1091. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.05.064
19. Berg, S., B. Trollfors, B. A. Claesson, K. Alestig, L. Gothefors, S. Hugosson, L. Lindquist, P. Olcen, V. Romanus and K. Strangert 1996. Incidence and prognosis of meningitis due to *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in Sweden. *Scand J Infect Dis* 28: 247-252.
20. Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal and S. Hammerschmidt 2001. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40: 1273-1287.

21. Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal and S. Hammerschmidt 2004. Characterization of plasmin(ogen) binding to *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J Med Res* 119 Suppl: 29-32.
22. Berry, A. M., R. A. Lock, S. M. Thomas, D. P. Rajan, D. Hansman and J. C. Paton 1994. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* 62: 1101-1108.
23. Black, R. E., S. Cousens, H. L. Johnson, J. E. Lawn, I. Rudan, D. G. Bassani, P. Jha, H. Campbell, C. F. Walker, R. Cibulskis, T. Eisele, L. Liu and C. Mathers 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 375: 1969-1987. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60549-1.
24. Black, S., E. K. France, D. Isaacman, L. Bracken, E. Lewis, J. Hansen, B. Fireman, R. Austrian, J. Graepel, S. Gray and N. P. Klein 2007. Surveillance for invasive pneumococcal disease during 2000-2005 in a population of children who received 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 26: 771-777. doi: 10.1097/INF.0b013e318124a494
25. Borrow, R., H. Claus, M. Guiver, L. Smart, D. M. Jones, E. B. Kaczmarski, M. Frosch and A. J. Fox 1997. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. *Epidemiol Infect* 118: 111-117.
26. Nathan BR. 1999. Cerebrospinal fluid and Intracranial pressure. In: Goetz CG, Pappert, E J, editor. *Goetz: Textbook of Clinical Neurology*. 1 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; p. 262-7.
27. Branger, J., J. C. Leemans, S. Florquin, S. Weijer, P. Speelman and T. Van Der Poll 2004. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. *Int Immunol* 16: 509-516.
28. Bratcher, P. E., K. H. Kim, J. H. Kang, J. Y. Hong and M. H. Nahm 2010. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology* 156: 555-560. doi: 10.1099/mic.0.034116-0.
29. Briles, D. E., S. K. Hollingshead, E. Swiatlo, A. Brooks-Walter, A. Szalai, A. Virolainen, L. S. McDaniel, K. A. Benton, P. White, K. Prellner, A. Hermansson, P. C. Aerts, H. Van Dijk and M. J. Crain 1997. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 3: 401-408.

30. Brouwer, M. C., P. McIntyre, J. de Gans, K. Prasad and D. van de Beek 2010a. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004405. doi: 10.1002/14651858.CD004405.pub3.
31. Brouwer, M. C., A. R. Tunkel and D. van de Beek 2010b. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 23: 467-492. doi: 10.1128/CMR.00070-09.
32. Brueggemann, A. B., D. T. Griffiths, E. Meats, T. Peto, D. W. Crook and B. G. Spratt 2003. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 187: 1424-1432. doi: 10.1086/374624.
33. Bryant, P. A., H. Y. Li, A. Zaia, J. Griffith, G. Hogg, N. Curtis and J. R. Carapetis 2004. Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *J Clin Microbiol* 42: 2919-2925. doi: 10.1128/JCM.42.7.2919-2925.2004.
34. Calix, J. J. and M. H. Nahm 2010. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis* 202: 29-38. doi: 10.1086/653123.
35. Calix, J. J., R. J. Porambo, A. M. Brady, T. R. Larson, J. Yother, C. Abeygunwardana and M. H. Nahm 2012. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J Biol Chem* 287: 27885-27894. doi: 10.1074/jbc.M112.380451.
36. Cartwright, K., S. Reilly, D. White and J. Stuart 1992. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *BMJ* 305: 143-147.
37. Chavez-Bueno, S. and G. H. McCracken, Jr. 2005. Bacterial meningitis in children. *Pediatr Clin North Am* 52: 795-810, vii. doi: 10.1016/j.pcl.2005.02.011.
38. Cherian, T., M. K. Lalitha, A. Manoharan, K. Thomas, R. H. Yolken and M. C. Steinhoff 1998. PCR-Enzyme immunoassay for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis. *J Clin Microbiol* 36: 3605-3608.
39. Ciana, G., N. Parmar, C. Antonio, S. Pivetta, G. Tamburlini, and M. Cuttini 1995. Effectiveness of adjunctive treatment with steroids in reducing short-term mortality in a high-risk population of children with bacterial meningitis. *J. Trop. Pediatr* 46: 164-168.
40. Clark, A. D., U. K. Griffiths, S. S. Abbas, K. D. Rao, L. Privor-Dumm, R. Hajjeh, H. Johnson, C. Sanderson and M. Santosham 2013. Impact and cost-effectiveness of

- Haemophilus influenzae type b conjugate vaccination in India. *J Pediatr* 163: S60-72. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.03.032.
41. CLSI, 2014 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 34th informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute M100–S24. 2014.
 42. Cockeran, R., R. Anderson and C. Feldman 2002a. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis* 15: 235-239.
 43. Cockeran, R., C. Durandt, C. Feldman, T. J. Mitchell and R. Anderson 2002b. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J Infect Dis* 186: 562-565. doi: 10.1086/341563.
 44. Collard, J. M., A. K. Alio Sanda and J. F. Jusot 2013. Determination of pneumococcal serotypes in meningitis cases in Niger, 2003-2011. *PLoS One* 8: e60432. doi: 10.1371/journal.pone.0060432.
 45. Commey, J. O., O. P. Rodrigues, F. A. Akita and M. Newman 1994. Bacterial meningitis in children in southern Ghana. *East Afr Med J* 71: 113-117.
 46. Corless, C. E., M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox and E. B. Kaczmarek 2001. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39: 1553-1558. doi: 10.1128/JCM.39.4.1553-1558.2001.
 47. Cowgill, K. D., M. Ndiritu, J. Nyiro, M. P. Slack, S. Chipchasi, A. Ismail, T. Kamau, I. Mwangi, M. English, C. R. Newton, D. R. Feikin and J. A. Scott 2006. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* type b Conjugate vaccine introduction into routine childhood immunization in Kenya. *JAMA* 296: 671-678. doi: 10.1001/jama.296.6.671.
 48. Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila and E. I. Tuomanen 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377: 435-438. doi: 10.1038/377435a0.
 49. Dagan, R., P. Yagupsky, A. Goldbart, A. Wasas and K. Klugman 1994. Increasing prevalence of penicillin-resistant pneumococcal infections in children in southern Israel: implications for future immunization policies. *Pediatr Infect Dis J* 13: 782-786.
 50. Dash, N., D. Panigrahi, S. Al Khusaiby, S. Al Awaidy and S. Bawikar 2008. Acute bacterial meningitis among children < 5 years of age in Oman: a retrospective study during 2000-2005. *J Infect Dev Ctries* 2: 112-115.

51. Davis, S., D. Feikin and H. L. Johnson 2013. The effect of Haemophilus influenzae type B and pneumococcal conjugate vaccines on childhood meningitis mortality: a systematic review. BMC Public Health 13 Suppl 3: S21. doi: 10.1186/1471-2458-13-S3-S21.
52. de la Rosa Fraile, M., L. Cabero, A. Andreu and G. G. Rao 2001. Prevention of group B streptococcal neonatal disease: a plea for a European consensus. Clin Microbiol Infect 7: 25-27.
53. Denno, D. M., E. Frimpong, M. Gregory and R. W. Steele 2002. Nasopharyngeal carriage and susceptibility patterns of Streptococcus pneumoniae in Kumasi, Ghana. West Afr J Med 21: 233-236.
54. Donkor, E. S., R. A. Stabler, J. Hinds, R. A. Adegbola, M. Antonio and B. W. Wren 2012. Comparative phylogenomics of Streptococcus pneumoniae isolated from invasive disease and nasopharyngeal carriage from West Africans. BMC Genomics 13: 569. doi: 10.1186/1471-2164-13-569.
55. Echchannaoui, H., K. Frei, C. Schnell, S. L. Leib, W. Zimmerli and R. Landmann 2002. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. J Infect Dis 186: 798-806. doi: 10.1086/342845.
56. Edmond, K., A. Clark, V. S. Korczak, C. Sanderson, U. K. Griffiths and I. Rudan 2010. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 10: 317-328. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70048-7.
57. Feldman, C., R. Anderson, R. Cockeran, T. Mitchell, P. Cole and R. Wilson 2002. The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. Respir Med 96: 580-585.
58. Fluegge, K., A. Siedler, B. Heinrich, J. Schulte-Moenting, M. J. Moennig, D. B. Bartels, O. Dammann, R. von Kries and R. Berner 2006. Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. Pediatrics 117: e1139-1145. doi: 10.1542/peds.2005-2481.
59. Gertz, J., J. P. Gerke and B. A. Cohen 2010. Epistasis in a quantitative trait captured by a molecular model of transcription factor interactions. Theor Popul Biol 77: 1-5. doi: 10.1016/j.tpb.2009.10.002.
60. Gessner, B. D., J. E. Mueller and S. Yaro 2010. African meningitis belt pneumococcal disease epidemiology indicates a need for an effective serotype 1 containing vaccine, including for older children and adults. BMC Infect Dis 10: 22. doi: 10.1186/1471-2334-10-22.

61. Gessner, B. D., O. Sanou, A. Drabo, T. A. Tamekloe, S. Yaro, H. Tall, J. C. Moisi, J. E. Mueller and B. M. Njanpop-LaFourcade 2012. Pneumococcal serotype distribution among meningitis cases from Togo and Burkina Faso during 2007-2009. *Vaccine* 30 Suppl 6: G41-45. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.052.
62. Gianfaldoni, C., S. Censini, M. Hilleringmann, M. Moschioni, C. Facciotti, W. Pansegrau, V. Masignani, A. Covacci, R. Rappuoli, M. A. Barocchi and P. Ruggiero 2007. Streptococcus pneumoniae pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infect Immun* 75: 1059-1062. doi: 10.1128/IAI.01400-06.
63. Girgis, N. I., J. E. Sippel, M. E. Kilpatrick, W. R. Sanborn, I. A. Mikhail, E. Cross, M. W. Erian, Y. Sultan and Z. Farid 1993. Meningitis and encephalitis at the Abbassia Fever Hospital, Cairo, Egypt, from 1966 to 1989. *Am J Trop Med Hyg* 48: 97-107.
64. Greenberg, D., D. P. Speert, E. Mahenthiralingam, D. A. Henry, M. E. Campbell and D. W. Scheifele 2002. Emergence of penicillin-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae invasive clones in Canada. *J Clin Microbiol* 40: 68-74.
65. Greenwood, B. 1999. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 777-785. doi: 10.1098/rstb.1999.0430.
66. Hajjeh, R., K. Mulholland, A. Schuchat and M. Santosham 2013. Progress towards demonstrating the impact of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines globally. *J Pediatr* 163: S1-3. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.03.022.
67. Han, F., H. Yu, C. Tian, S. Li, M. R. Jacobs, C. Benedict-Alderfer and Q. Y. Zheng 2009. Role for Toll-like receptor 2 in the immune response to Streptococcus pneumoniae infection in mouse otitis media. *Infect Immun* 77: 3100-3108. doi: 10.1128/IAI.00204-09.
68. Harrison, L. H. 2006. Vaccine prevention of meningococcal disease: making slow progress. *Clin Infect Dis* 43: 1395-1397. doi: 10.1086/508780.
69. Hausdorff, W. P., J. Bryant, P. R. Paradiso and G. R. Siber 2000. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 30: 100-121. doi: 10.1086/313608.
70. Hausdorff, W. P., D. R. Feikin and K. P. Klugman 2005. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 5: 83-93. doi: 10.1016/S1473-3099(05)01280-6.
71. Hausdorff, W. P., G. Siber and P. R. Paradiso 2001. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 357: 950-952. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04222-7.

72. Henriques, B., M. Kalin, A. Ortqvist, B. Olsson Liljequist, M. Almela, T. J. Marrie, M. A. Mufson, A. Torres, M. A. Woodhead, S. B. Svenson and G. Kallenius 2000. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J Infect Dis* 182: 833-839. doi: 10.1086/315761.
73. Hsu, H. E., K. A. Shutt, M. R. Moore, B. W. Beall, N. M. Bennett, A. S. Craig, M. M. Farley, J. H. Jorgensen, C. A. Lexau, S. Petit, A. Reingold, W. Schaffner, A. Thomas, C. G. Whitney and L. H. Harrison 2009. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med* 360: 244-256. doi: 10.1056/NEJMoa0800836.
74. INE 2007. Localizacao dos Hospitais Centrais em Mocambique. INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (<http://www.ine.gov.mz>) (acessado em 2014).
75. Isaacman, D. J., E. D. McIntosh and R. R. Reinert 2010. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 14: e197-209. doi: 10.1016/j.ijid.2009.05.010.
76. Jacoby, G. A. 1994. Prevalence and resistance mechanisms of common bacterial respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* 18: 951-957.
77. Jbara, I., M. Baysallar, A. Kilic, S. Yetiser, B. Unay, C. Acikel, M. Yapar and L. Doganci 2007. [Comparison of culture and polymerase chain reaction methods for the detection of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in cerebrospinal fluids and middle ear effusions]. *Mikrobiyol Bul* 41: 495-502.
78. Jones, M. E., R. S. Blosser-Middleton, C. Thornsberry, J. A. Karlowsky and D. F. Sahm 2003. The activity of levofloxacin and other antimicrobials against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected worldwide during 1999-2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 579-586.
79. Jones, R. N., M. Castanheira, B. Hu, Y. Ni, S. S. Lin, R. E. Mendes and Y. Wang 2013a. Update of contemporary antimicrobial resistance rates across China: reference testing results for 12 medical centers (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 77: 258-266. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.003.
80. Jones, R. N., M. Flonta, N. Gurler, M. Cepparulo, R. E. Mendes and M. Castanheira 2014. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 78: 429-436. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.008
81. Jones, R. N., M. Guzman-Blanco, A. C. Gales, B. Gallegos, A. L. Castro, M. D. Martino, S. Vega, J. Zurita, M. Cepparulo and M. Castanheira 2013b. Susceptibility

- rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis* 17: 672-681. doi: 10.1016/j.bjid.2013.07.002.
82. Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton and P. W. Andrew 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 6: 288-301. doi: 10.1038/nrmicro1871.
83. Kam, K. L., M. Pfaffendorf and P. A. van Zwieten 1996. Pharmacodynamic behaviour of isolated resistance vessels obtained from hypertensive-diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol* 10: 329-336.
84. Kaplan, S. L. 1999. Clinical presentations, diagnosis, and prognostic factors of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 13: 579-594, vi-vii.
85. Kennedy, W. A., S. J. Chang, K. Purdy, T. Le, P. E. Kilgore, J. S. Kim, D. D. Anh, P. L. Huong, B. Q. Dong, D. M. Tan, J. D. Clemens and J. I. Ward 2007. Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture. *Epidemiol Infect* 135: 1217-1226. doi: 10.1017/S0950268806007734.
86. Kerr, A. R., G. K. Paterson, A. Riboldi-Tunnicliffe and T. J. Mitchell 2005. Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3. *Infect Immun* 73: 4245-4252. doi: 10.1128/IAI.73.7.4245-4252.2005.
87. Khowaja, A. R., S. Mohiuddin, A. L. Cohen, W. Mirza, N. Nadeem, T. Zuberi, B. Salam, F. Mubarak, B. Rizvi, Y. Husen, K. Pardhan, K. M. Khan, S. J. Raza, H. K. Zuberi, S. Mustafa, S. H. Sheikh, A. Nizamani, H. Lohana, K. Mulholland, E. Zell, R. Hajjeh, A. Bosan and A. K. Zaidi 2013. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine on radiologically-confirmed pneumonia in young children in Pakistan. *J Pediatr* 163: S79-S85 e71. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.03.034.
88. Kim, K. S. 2010. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis* 10: 32-42. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70306-8.
89. Kirkeby, L., T. T. Rasmussen, J. Reinholdt and M. Kilian 2000. Immunoglobulins in nasal secretions of healthy humans: structural integrity of secretory immunoglobulin A1 (IgA1) and occurrence of neutralizing antibodies to IgA1 proteases of nasal bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 31-39.
90. Kisakye, A., I. Makumbi, D. Nansera, R. Lewis, F. Braka, E. Wobudeya, D. Chaplain, E. Nalumansi, W. Mbabazi and B. D. Gessner 2009. Surveillance for *Streptococcus pneumoniae* meningitis in children aged <5 years: implications for immunization in Uganda. *Clin Infect Dis* 48 Suppl 2: S153-161. doi: 10.1086/596495.

91. Koedel, U., B. Angele, T. Rupprecht, H. Wagner, A. Roggenkamp, H. W. Pfister and C. J. Kirschning 2003. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* 170: 438-444.
92. Koedel, U., W. M. Scheld and H. W. Pfister 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2: 721-736.
93. LaForce, F. M., K. Konde, S. Viviani and M. P. Preziosi 2007. The Meningitis Vaccine Project. *Vaccine* 25 Suppl 1: A97-100. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.04.049.
94. Leimkugel, J., A. Adams Forgor, S. Gagneux, V. Pfluger, C. Flierl, E. Awine, M. Naegeli, J. P. Dangy, T. Smith, A. Hodgson and G. Pluschke 2005. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. *J Infect Dis* 192: 192-199. doi: 10.1086/431151.
95. Letiembre, M., Y. Liu, S. Walter, W. Hao, T. Pfander, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer and K. Fassbender 2009. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol Aging* 30: 759-768. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.018.
96. Linares, J., C. Ardanuy, R. Pallares and A. Fenoll 2010. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 16: 402-410. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03182.x.
97. Liu, L., H. L. Johnson, S. Cousens, J. Perin, S. Scott, J. E. Lawn, I. Rudan, H. Campbell, R. Cibulskis, M. Li, C. Mathers and R. E. Black 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379: 2151-2161. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60560-1.
98. Luksic, I., R. Mulic, R. Falconer, M. Orban, S. Sidhu and I. Rudan 2013. Estimating global and regional morbidity from acute bacterial meningitis in children: assessment of the evidence. *Croat Med J* 54: 510-518.
99. Lyon, D. J., O. Scheel, K. S. Fung, A. F. Cheng and J. Henrichsen 1996. Rapid emergence of penicillin-resistant pneumococci in Hong Kong. *Scand J Infect Dis* 28: 375-376.
100. Ma, X., R. Zhao, Z. Ma, K. Yao, S. Yu, Y. Zheng and Y. Yang 2013. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing invasive diseases from Shenzhen Children's Hospital. *PLoS One* 8: e67507. doi: 10.1371/journal.pone.0067507.
101. Mac, Leod Cm and M. R. Kraus 1950. Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed in vitro. *J Exp Med* 92: 1-9.

102. Malley, R., M. Lipsitch, A. Stack, R. Saladino, G. Fleisher, S. Pelton, C. Thompson, D. Briles and P. Anderson 2001. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infect Immun* 69: 4870-4873. doi: 10.1128/IAI.69.8.4870-4873.2001.
103. Mani, R., S. Pradhan, S. Nagarathna, R. Wasiulla and A. Chandramuki 2007. Bacteriological profile of community acquired acute bacterial meningitis: a ten-year retrospective study in a tertiary neurocare centre in South India. *Indian J Med Microbiol* 25: 108-114.
104. Martin, M., J. M. Casellas, S. A. Madhi, T. J. Urquhart, S. D. Delpont, F. Ferrero, S. Chamany, G. H. Dayan, C. E. Rose, O. S. Levine, K. P. Klugman and D. R. Feikin 2004. Impact of haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in South Africa and Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 23: 842-847.
105. Mastro, T. D., A. Ghafoor, N. K. Nomani, Z. Ishaq, F. Anwar, D. M. Granoff, J. S. Spika, C. Thornsberry and R. R. Facklam 1991. Antimicrobial resistance of pneumococci in children with acute lower respiratory tract infection in Pakistan. *Lancet* 337: 156-159.
106. McKenna, D. S. and J. D. Iams 1998. Group B streptococcal infections. *Semin Perinatol* 22: 267-276.
107. Mera, R., L. A. Miller, T. R. Fritsche and R. N. Jones 2008. Serotype replacement and multiple resistance in *Streptococcus pneumoniae* after the introduction of the conjugate pneumococcal vaccine. *Microb Drug Resist* 14: 101-107. doi: 10.1089/mdr.2008.0782.
108. Milledge, J., J. C. Calis, S. M. Graham, A. Phiri, L. K. Wilson, D. Soko, M. Mbwini, A. L. Walsh, S. R. Rogerson, M. E. Molyneux and E. M. Molyneux 2005. Aetiology of neonatal sepsis in Blantyre, Malawi: 1996-2001. *Ann Trop Paediatr* 25: 101-110. doi: 10.1179/146532805X45692.
109. Modi, S. and A. K. Anand 2013. Phenotypic Characterization and Antibigram of CSF Isolates in Acute Bacterial Meningitis. *J Clin Diagn Res* 7: 2704-2708. doi: 10.7860/JCDR/2013/6081.3737.
110. Mogensen, T. H., R. S. Berg, S. R. Paludan and L. Ostergaard 2008. Mechanisms of dexamethasone-mediated inhibition of Toll-like receptor signaling induced by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 76: 189-197. doi: 10.1128/IAI.00856-07

111. Mokaddas, E. M., V. O. Rotimi and M. J. Albert 2007. Increasing prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Kuwait: implications for therapy. *Microb Drug Resist* 13: 227-233. doi: 10.1089/mdr.2007.774
112. Mook-Kanamori, B. B., M. Geldhoff, T. van der Poll and D. van de Beek 2011. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev* 24: 557-591. doi: 10.1128/CMR.00008-11.
113. Mook-Kanamori, B., M. Geldhoff, D. Troost, T. van der Poll and D. van de Beek 2012. Characterization of a pneumococcal meningitis mouse model. *BMC Infect Dis* 12: 71. doi: 10.1186/1471-2334-12-71.
114. Mothibeli, K. M., M. du Plessis, A. von Gottberg, L. de Gouveia, P. Adrian, S. A. Madhi and K. P. Klugman 2010. An unusual pneumococcal sequence type is the predominant cause of serotype 3 invasive disease in South Africa. *J Clin Microbiol* 48: 184-191. doi: 10.1128/JCM.01011-09.
115. Mueller, J. E., S. Yaro, M. S. Ouedraogo, N. Levina, B. M. Njanpop-Lafourcade, H. Tall, R. S. Idohou, O. Sanou, S. S. Kroman, A. Drabo, B. Nacro, A. Millogo, M. van der Linden and B. D. Gessner 2012. Pneumococci in the African meningitis belt: meningitis incidence and carriage prevalence in children and adults. *PLoS One* 7: e52464. doi: 10.1371/journal.pone.0052464.
116. Mueller, J. E., S. Yaro, Y. Traore, L. Sangare, Z. Tarnagda, B. M. Njanpop-Lafourcade, R. Borrow and B. D. Gessner 2006. *Neisseria meningitidis* serogroups A and W-135: carriage and immunity in Burkina Faso, 2003. *J Infect Dis* 193: 812-820. doi: 10.1086/500511.
117. Mulholland, K., S. Hilton, R. Adegbola, S. Usen, A. Oparaugo, C. Omosigho, M. Weber, A. Palmer, G. Schneider, K. Jobe, G. Lahai, S. Jaffar, O. Secka, K. Lin, C. Ethevenaux and B. Greenwood 1997. Randomised trial of *Haemophilus influenzae* type-b tetanus protein conjugate vaccine [corrected] for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants. *Lancet* 349: 1191-1197.
118. Murray, P., Rosenthal, K. e Pfaller, M. 2006. *Microbiología médica*. 5a Edição. Madrid, Elsevier Imprint.
119. Musher, D. M., H. M. Phan, D. A. Watson and R. E. Baughn 2000a. Antibody to capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* at the time of hospital admission for Pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 182: 158-167. doi: 10.1086/315697.
120. Musher, D. M., D. A. Watson and R. E. Baughn 2000b. Genetic control of the immunologic response to pneumococcal capsular polysaccharides. *Vaccine* 19: 623-627.

121. O'Brien, K. L., L. H. Moulton, R. Reid, R. Weatherholtz, J. Oski, L. Brown, G. Kumar, A. Parkinson, D. Hu, J. Hackell, I. Chang, R. Kohberger, G. Siber and M. Santosham 2003. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 362: 355-361. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14022-6.
122. O'Brien, K. L., L. J. Wolfson, J. P. Watt, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O. S. Levine and T. Cherian 2009. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374: 893-902. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6.
123. O'Dempsey, T. J., T. F. McArdle, N. Lloyd-Evans, I. Baldeh, B. E. Lawrence, O. Secka and B. Greenwood 1996. Pneumococcal disease among children in a rural area of west Africa. *Pediatr Infect Dis J* 15: 431-437.
124. WHO (2002). World Health Organization. Meningococcal Position Paper. *Weekly Epidemiological Record* No. 44, 2002, 77, 329-340. Available at: http://www.who.int/immunization/wer7740meningococcal_Oct02_position_paper.pdf
125. Owusu, M., S. B. Nguah, Y. A. Boaitey, E. Badu-Boateng, A. R. Abubakr, R. A. Lartey and Y. Adu-Sarkodie 2012. Aetiological agents of cerebrospinal meningitis: a retrospective study from a teaching hospital in Ghana. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 11: 28. doi: 10.1186/1476-0711-11-28
126. Pai, R., R. E. Gertz and B. Beall 2006. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 44: 124-131. doi: 10.1128/JCM.44.1.124-131.2006.
127. Parent du Chatelet, I., Y. Traore, B. D. Gessner, A. Antignac, B. Nacro, B. M. Njanpop-Lafourcade, M. S. Ouedraogo, S. R. Tiendrebeogo, E. Varon and M. K. Taha 2005. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *Clin Infect Dis* 40: 17-25. doi: 10.1086/426436.
128. Park, I. H., D. G. Pritchard, R. Cartee, A. Brandao, M. C. Brandileone and M. H. Nahm 2007. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 45: 1225-1233. doi: 10.1128/JCM.02199-06.
129. Peltola, H. 2001. Burden of meningitis and other severe bacterial infections of children in africa: implications for prevention. *Clin Infect Dis* 32: 64-75. doi: 10.1086/317534.
130. Peltola, H. 2000. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the

- use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 13: 302-317.
131. Perkins, M. D., S. Mirrett and L. B. Reller 1995. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J Clin Microbiol* 33: 1486-1491.
132. Poland, G. A. 2010. Prevention of meningococcal disease: current use of polysaccharide and conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 50 Suppl 2: S45-53. doi: 10.1086/648964.
133. Porat, N., R. Trefler and R. Dagan 2001. Persistence of two invasive *Streptococcus pneumoniae* clones of serotypes 1 and 5 in comparison to that of multiple clones of serotypes 6B and 23F among children in southern Israel. *J Clin Microbiol* 39: 1827-1832. doi: 10.1128/JCM.39.5.1827-1832.2001.
134. Radin, J. N., C. J. Orihuela, G. Murti, C. Guglielmo, P. J. Murray and E. I. Tuomanen 2005. beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 73: 7827-7835. doi: 10.1128/IAI.73.12.7827-7835.2005.
135. Ragnathan, L., M. Ramsay, R. Borrow, M. Guiver, S. Gray and E. B. Kaczmarski 2000. Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: report of a 1997 survey. *Meningococcal meningitis: 1997 survey report. J Infect* 40: 74-79.
136. Rintamaki, S., A. Saukkoriipi, P. Salo, A. Takala and M. Leinonen 2002. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA by using polymerase chain reaction and microwell hybridization with Europium-labelled probes. *J Microbiol Methods* 50: 313-318.
137. Roca, A., Q. Bassat, L. Morais, S. Machevo, B. Sigauque, C. O'Callaghan, T. Nhamposha, E. Letang, I. Mandomando, D. Nhalungo, L. Quinto and P. Alonso 2009. Surveillance of acute bacterial meningitis among children admitted to a district hospital in rural Mozambique. *Clin Infect Dis* 48 Suppl 2: S172-180. doi: 10.1086/596497.
138. Rosenstein, N. E. 2001. Global surveillance for meningococcal disease. *Methods Mol Med* 67: 333-339. doi: 10.1385/1-59259-149-3:333.
139. Rosenstein, N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic and J. M. Hughes 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 344: 1378-1388. doi: 10.1056/NEJM200105033441807.
140. Ross MH, Reith, E J, Rowrell, L J. . São Paulo: Panamericana; 1993. *Histologia texto e Atlas.* 2 ed.

141. Rubins, J. B., D. Charboneau, C. Fasching, A. M. Berry, J. C. Paton, J. E. Alexander, P. W. Andrew, T. J. Mitchell and E. N. Janoff 1996. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1339-1346. doi: 10.1164/ajrccm.153.4.8616564.
142. Sacchi, C. T., L. O. Fukasawa, M. G. Goncalves, M. M. Salgado, K. A. Shutt, T. R. Carvalhanas, A. F. Ribeiro, B. Kemp, M. C. Gorla, R. K. Albernaz, E. G. Marques, A. Cruciano, E. A. Waldman, M. C. Brandileone and L. H. Harrison 2011. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 6: e20675. doi: 10.1371/journal.pone.0020675.
143. Saez-Llorens, X. and M. O'Ryan 2001. Cefepime in the empiric treatment of meningitis in children. *Pediatr Infect Dis J* 20: 356-361.
144. Saha, S. K., H. M. Al Emran, B. Hossain, G. L. Darmstadt, S. Saha, M. Islam, A. I. Chowdhury, D. Foster, A. Naheed, S. El Arifeen, A. H. Baqui, S. A. Qazi, S. P. Luby, R. F. Breiman, M. Santosham, R. E. Black and D. W. Crook 2012. *Streptococcus pneumoniae* serotype-2 childhood meningitis in Bangladesh: a newly recognized pneumococcal infection threat. *PLoS One* 7: e32134. doi: 10.1371/journal.pone.0032134.
145. Schrag, S. J., C. G. Whitney and A. Schuchat 2000a. Neonatal group B streptococcal disease: how infection control teams can contribute to prevention efforts. *Infect Control Hosp Epidemiol* 21: 473-483. doi: 10.1086/501791.
146. Schrag, S. J., S. Zywicki, M. M. Farley, A. L. Reingold, L. H. Harrison, L. B. Lefkowitz, J. L. Hadler, R. Danila, P. R. Cieslak and A. Schuchat 2000b. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 342: 15-20. doi: 10.1056/NEJM200001063420103.
147. Schuchat, A. 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 11: 497-513.
148. Schuchat, A. 1995. Group B streptococcal disease in newborns: a global perspective on prevention. *Biomed Pharmacother* 49: 19-25. doi: 10.1016/0753-3322(96)82573-X.
149. Schuurman, T., R. F. de Boer, A. M. Kooistra-Smid and A. A. van Zwet 2004. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 42: 734-740.
150. Scott, J. A., A. J. Hall, R. Dagan, J. M. Dixon, S. J. Eykyn, A. Fenoll, M. Hortal, L. P. Jette, J. H. Jorgensen, F. Lamothe, C. Latorre, J. T. Macfarlane, D. M. Shlaes, L.

- E. Smart and A. Taunay 1996. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clin Infect Dis* 22: 973-981.
151. Scott, S., D. Altanseseg, D. Sodbayer, P. Nymadawa, D. Bulgan, J. Mendsaikhan, J. P. Watt, M. P. Slack, M. G. Carvalho, R. Hajjeh and K. M. Edmond 2013. Impact of *Haemophilus influenzae* Type b conjugate vaccine in Mongolia: prospective population-based surveillance, 2002-2010. *J Pediatr* 163: S8-S11. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.03.024.
152. Seale, A. C., H. Blencowe, A. Zaidi, H. Ganatra, S. Syed, C. Engmann, C. R. Newton, S. Vergnano, B. J. Stoll, S. N. Cousens and J. E. Lawn 2013. Neonatal severe bacterial infection impairment estimates in South Asia, sub-Saharan Africa, and Latin America for 2010. *Pediatr Res* 74 Suppl 1: 73-85. doi: 10.1038/pr.2013.207.
153. Shaper, M., S. K. Hollingshead, W. H. Benjamin, Jr. and D. E. Briles 2004. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun* 72: 5031-5040. doi: 10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004.
154. Sigauque, B., A. Roca, S. Sanz, I. Oliveiras, M. Martinez, I. Mandomando, X. Valles, M. Espasa, F. Abacassamo, J. Sacarlal, E. Macete, A. Nhacolo, J. Aponte, M. M. Levine and P. L. Alonso 2008. Acute bacterial meningitis among children, in Manhica, a rural area in Southern Mozambique. *Acta Trop* 105: 21-27. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.01.006.
155. Sigauque, B., D. Vubil, A. Sozinho, L. Quinto, L. Morais, C. Sacoor, M. G. Carvalho, J. R. Verani, P. L. Alonso and A. Roca 2013. *Haemophilus influenzae* type b disease among children in rural Mozambique: impact of vaccine introduction. *J Pediatr* 163: S19-24. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.03.026.
156. Song, J. H., N. Y. Lee, S. Ichiyama, R. Yoshida, Y. Hirakata, W. Fu, A. Chongthaleong, N. Aswapokee, C. H. Chiu, M. K. Lalitha, K. Thomas, J. Perera, T. T. Yee, F. Jamal, U. C. Warsa, B. X. Vinh, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum and C. H. Pai 1999. Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Clin Infect Dis* 28: 1206-1211. doi: 10.1086/514783.
157. Stephens, D. S., B. Greenwood and P. Brandtzaeg 2007. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 369: 2196-2210. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61016-2.
158. Swann, O., D. B. Everett, J. S. Furyk, E. M. Harrison, M. T. Msukwa, R. S. Heyderman and E. M. Molyneux 2014. Bacterial meningitis in Malawian infants <2

months of age: etiology and susceptibility to world health organization first-line antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 33: 560-565. doi: 10.1097/INF.0000000000000210.

159. Tai, S. S. 2006. Streptococcus pneumoniae protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit Rev Microbiol* 32: 139-153. doi: 10.1080/10408410600822942.
160. Tali-Maamar, H., R. Laliem, C. Bentchouala, D. Touati, K. Sababou, S. Azrou, M. Azzam, W. Amhis, L. Oussadou, R. Belouni, F. Smati and K. Rahal 2012. Serotyping and antibiotic susceptibility of Streptococcus pneumoniae strains isolated in Algeria from 2001 to 2010. *Med Mal Infect* 42: 59-65. doi: 10.1016/j.medmal.2011.12.001.
161. Tang, L. M., S. T. Chen, W. C. Hsu and R. K. Lyu 1999. Acute bacterial meningitis in adults: a hospital-based epidemiological study. *QJM* 92: 719-725.
162. Theodoridou, M. N., V. A. Vasilopoulou, E. E. Atsali, A. M. Pangalis, G. J. Mostrou, V. P. Syriopoulou and C. S. Hadjichristodoulou 2007. Meningitis registry of hospitalized cases in children: epidemiological patterns of acute bacterial meningitis throughout a 32-year period. *BMC Infect Dis* 7: 101. doi: 10.1186/1471-2334-7-101.
163. Thomson, R. B., Jr. and H. Bertram 2001. Laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Infect Dis Clin North Am* 15: 1047-1071.
164. Traore, Y., T. A. Tameklo, B. M. Njanpop-Lafourcade, M. Lourd, S. Yaro, D. Niamba, A. Drabo, J. E. Mueller, J. L. Koeck and B. D. Gessner 2009. Incidence, seasonality, age distribution, and mortality of pneumococcal meningitis in Burkina Faso and Togo. *Clin Infect Dis* 48 Suppl 2: S181-189. doi: 10.1086/596498.
165. Tsai, H. Y., T. L. Lauderdale, J. T. Wang, Y. S. Chen, J. W. Liu, J. H. Huang, B. H. Hu, C. J. Yang, D. C. Lu and S. C. Chang 2013. Updated antibiotic resistance and clinical spectrum of infections caused by Streptococcus pneumoniae in Taiwan: Emphasis on risk factors for penicillin nonsusceptibilities. *J Microbiol Immunol Infect* 46: 345-351. doi: 10.1016/j.jmii.2012.07.012.
166. Tsai, H. Y., C. H. Liao, C. Y. Liu, Y. T. Huang, L. J. Teng and P. R. Hsueh 2012. Streptococcus suis infection in Taiwan, 2000-2011. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74: 75-77. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.013.
167. Tunkel AR. Approach to the patient with central nervous system infection. In: Mandell GL, Bennett, J E, Dolin, R, editor. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 1079-1082.


168. Tuyama, M., R. F. Boente, M. C. Rebelo, R. P. Igreja and D. E. Barroso 2008. The utility of the polymerase chain reaction assay for aetiologic definition of unspecified bacterial meningitis cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 138-142.
169. Ulanova, M. and R. S. Tsang 2014. Haemophilus influenzae serotype a as a cause of serious invasive infections. *Lancet Infect Dis* 14: 70-82. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70170-1.
170. Valles, X., B. Flannery, A. Roca, I. Mandomando, B. Sigauque, S. Sanz, A. Schuchat, M. Levine, M. Soriano-Gabarro and P. Alonso 2006. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive and nasopharyngeal isolates of Streptococcus pneumoniae among children in rural Mozambique. *Trop Med Int Health* 11: 358-366. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01565.x.
171. van de Beek, D., M. C. Brouwer, G. E. Thwaites and A. R. Tunkel 2012. Advances in treatment of bacterial meningitis. *Lancet* 380: 1693-1702. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61186-6.
172. van de Beek, D., J. de Gans, A. R. Tunkel and E. F. Wijdicks 2006. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 354: 44-53. doi: 10.1056/NEJMra052116.
173. van Haefen, R., S. Palladino, I. Kay, T. Keil, C. Heath and G. W. Waterer 2003. A quantitative LightCycler PCR to detect Streptococcus pneumoniae in blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 407-414.
174. van Hoek, A. J., N. Andrews, P. A. Waight, R. George and E. Miller 2012. Effect of serotype on focus and mortality of invasive pneumococcal disease: coverage of different vaccines and insight into non-vaccine serotypes. *PLoS One* 7: e39150. doi: 10.1371/journal.pone.0039150.
175. Vanderkooi, O.G., D.L.Church, J.MacDonald, F.Zucol, and J.D.Kellner 2011. Community-based outbreaks in vulnerable populations of invasive infections caused by Streptococcus pneumoniae serotypes 5 and 8 in Calgary, Canada. *PLoS. One* 6.
176. Visser, A. and A. Hoosen 2012. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines - a South African perspective. *Vaccine* 30 Suppl 3: C52-57. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.022.
177. von Gottberg, A., C. Cohen, L. de Gouveia, S. Meiring, V. Quan, A. Whitelaw, P. Crowther-Gibson, S. A. Madhi, C. G. Whitney and K. P. Klugman 2013. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the pre-conjugate vaccine era: South Africa, 2003-2008. *Vaccine* 31: 4200-4208. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.04.077.

178. von Mollendorf, C., C. Cohen, L. de Gouveia, N. Naidoo, S. Meiring, V. Quan, S. Lindani, D. P. Moore, G. Reubenson, M. Moshe, B. Eley, U. M. Hallbauer, H. Finlayson, S. A. Madhi, L. Conklin, E. R. Zell, K. P. Klugman, C. G. Whitney and A. von Gottberg 2014. Risk Factors for Invasive Pneumococcal Disease among Children less Than 5 Years of Age in a High HIV-Prevalence Setting, South Africa, 2010 to 2012. *Pediatr Infect Dis J*. doi: 10.1097/INF.0000000000000484
179. Waisbourd-Zinman, O., E. Bilavsky, N. Tirosh, Z. Samra and J. Amir 2010. Penicillin and ceftriaxone susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from cerebrospinal fluid of children with meningitis hospitalized in a tertiary hospital in Israel. *Isr Med Assoc J* 12: 225-228.
180. Wasfy, M. O., G. Pimentel, M. Abdel-Maksoud, K. L. Russell, C. P. Barrozo, J. D. Klena, K. Earhart and R. Hajjeh 2005. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis in Egypt, 1998-2003. *J Antimicrob Chemother* 55: 958-964. doi: 10.1093/jac/dki101.
181. Weiser, J. N., D. Bae, C. Fasching, R. W. Scamurra, A. J. Ratner and E. N. Janoff 2003. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4215-4220. doi: 10.1073/pnas.0637469100.
182. Welinder-Olsson, C., L. Dotevall, H. Hogevik, R. Jungnelius, B. Trollfors, M. Wahl and P. Larsson 2007. Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 13: 879-886. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01756.x.
183. WHO 2001. Hib-Paediatric Bacterial Meningitis (Hib-PBM) Surveillance Network (WHO Regional Office for Africa/2001.7).
184. WHO. (2007). Standardized treatment of bacterial meningitis in Africa in epidemic and non epidemic situations (WHO/CDS/EPR/2007.3). (disponível em www.who.int/csr/resources/publications/).
185. WHO. (2011). Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*, http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_CDS_CSR_EDC_11.9.pdf.
186. WHO. (2013). Meningococcal disease in countries of the African meningitis belt, 2012 - emerging needs and future perspectives. WHO position paper-Weekly Epidemiological Record 88. 129-136.
187. WHO (2013). Meningococcal disease in countries of the African meningitis belt, 2012 - emerging needs and future perspectives. WHO position paper-Weekly Epidemiological Record 88: 129-136 Meningococcal disease in countries of the

- African meningitis belt, 2012 - emerging needs and future perspectives. WHO position paper-Weekly Epidemiological Record 88: 129-136.
188. WHO.(2014) Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. http://www.who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf. Acessado em 14 de Dezembro de 2015.
189. Winn Jr. W, Allen, S, Janda, W, Koneman, E, Procop, G, Schereckenberger, P, Woods, G. Koneman's 2006. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
190. Wolter, N., S. Tempia, C. Cohen, S. A. Madhi, M. Venter, J. Moyes, S. Walaza, B. Malope-Kgokong, M. Groome, M. du Plessis, V. Magomani, M. Pretorius, O. Hellferscee, H. Dawood, K. Kahn, E. Variava, K. P. Klugman and A. von Gottberg 2014. High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral coinfection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia. J Infect Dis 210: 1649-1657. doi: 10.1093/infdis/jiu326.
191. Wu, H. M., S. M. Cordeiro, B. H. Harcourt, M. Carvalho, J. Azevedo, T. Q. Oliveira, M. C. Leite, K. Salgado, M. G. Reis, B. D. Plikaytis, T. A. Clark, L. W. Mayer, A. I. Ko, S. W. Martin and J. N. Reis 2013. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae meningitis* diagnosis. BMC Infect Dis 13: 26. doi: 10.1186/1471-2334-13-26.
192. Xue, L., K. Yao, G. Xie, Y. Zheng, C. Wang, Y. Shang, H. Wang, L. Wan, L. Liu, C. Li, W. Ji, X. Xu, Y. Wang, P. Xu, Z. Liu, S. Yu and Y. Yang 2010. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates that cause invasive disease among Chinese children. Clin Infect Dis 50: 741-744. doi: 10.1086/650534.
193. Yaro, S., M. Lourd, B. Nacro, B. M. Njanpop-Lafourcade, A. Hien, M. S. Ouedraogo, Y. Traore, L. M. Schouls, I. Parent du Chatelet and B. D. Gessner 2006a. The epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in Burkina Faso. Pediatr Infect Dis J 25: 415-419. doi: 10.1097/01.inf.0000217371.38080.8a
194. Yaro, S., M. Lourd, Y. Traore, B. M. Njanpop-Lafourcade, A. Sawadogo, L. Sangare, A. Hien, M. S. Ouedraogo, O. Sanou, I. Parent du Chatelet, J. L. Koeck and B. D. Gessner 2006b. Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. Clin Infect Dis 43: 693-700. doi: 10.1086/506940
195. Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski and D. Golenbock 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J Immunol 163: 1-5.

196. Zhang, J. R., K. E. Mostov, M. E. Lamm, M. Nanno, S. Shimida, M. Ohwaki and E. Tuomanen 2000. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102: 827-837.
197. Ziai, M. and R. J. Haggerty 1958. Neonatal meningitis. *N Engl J Med* 259: 314-320. doi: 10.1056/NEJM195808142590702.
198. Zimba, T. F., D. T. Nota, J. C. Langa, L. G. Monteiro and Y. M. Coovadia 2009. The aetiology of acute community acquired bacterial meningitis in children and adults in Maputo, Mozambique. *J Infect Dev Ctries* 3: 723-726.
199. Zola, T. A., E. S. Lysenko and J. N. Weiser 2008. Mucosal clearance of capsule-expressing bacteria requires both TLR and nucleotide-binding oligomerization domain 1 signaling. *J Immunol* 181: 7909-7916.

Anexo 1. Formulário de notificação de casos de meningite



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

NI Caso #: _____

NI (número de identificação) = Primeiras 3 letras do posto sentinel + dia (2 dígitos) + mês (2 dígitos) + nr. de ordem de admissão

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE CASOS SUSPEITOS DE MENINGITE

País: Moçambique

Para usar nas actividades de vigilância em casos de suspeita de meningite
 • "Por favor, informe qualquer caso de suspeita de meningite ao ponto focal".

Contacto: Aquino Albino Nhantumbo – +258 82 97 20 750 ou +258 21 31 10 38 - Email: aquinoalbinonhantumbo@yahoo.com.br/microbiologia.ins.mz@gmail.com
 Ou: Gabriela Pinto – +258 822545444 - Email: gabbydocarmo@gmail.com

Enviar o formulário preenchido e amostras clínicas, para o Instituto Nacional de Saúde. Edifício do Ministério da Saúde.

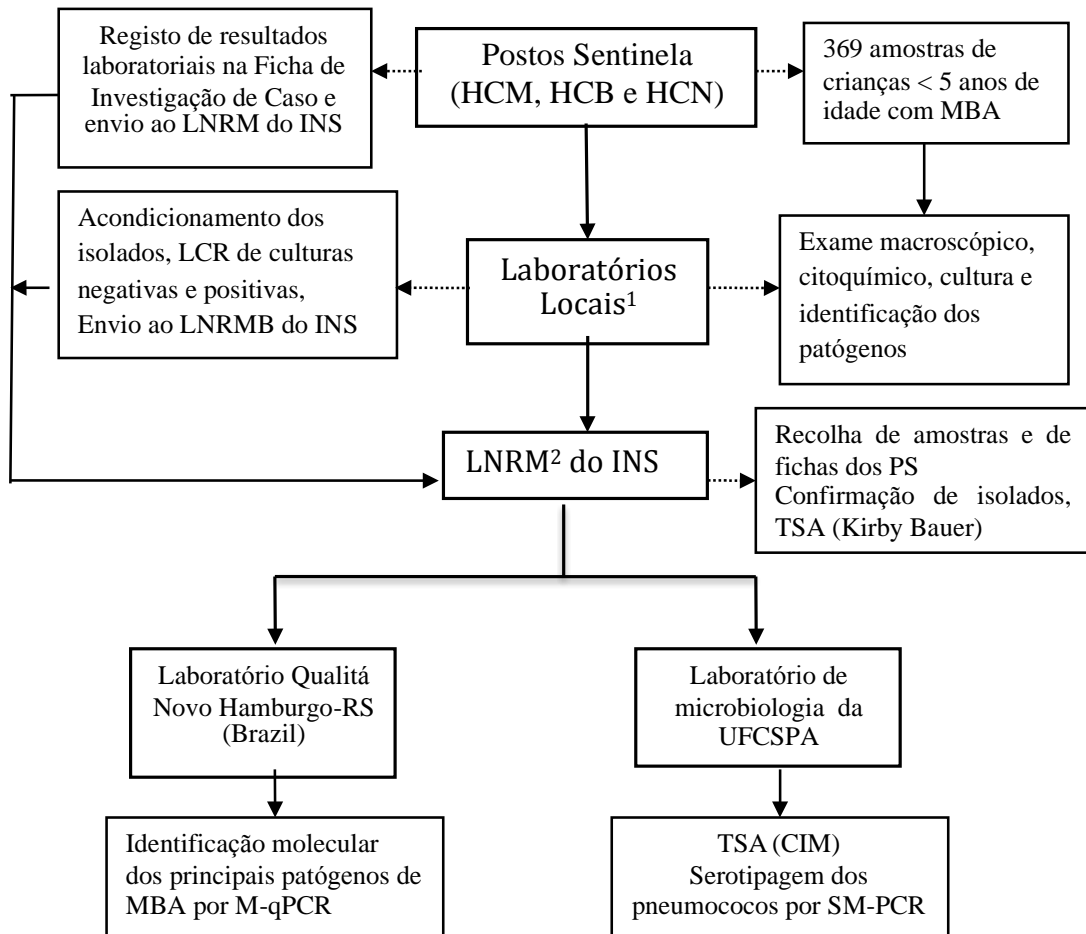
Notificação de caso preenchida por:	Data da notificação: ____/____/____ <small>(DD, MM, AA)</small>	
Apelido: _____ Outros nomes: _____ Cargo: _____	Província: _____ Distrito: _____ Município: _____	
Telefone: () _____ E-mail: _____		
SESSÃO I - Informação do paciente:		
Apelido _____	Outros nomes: _____	
Idade: ____ dia <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/>	sexo <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M Data de nascimento: ____/____/____ (DD/MM/AA)	
Natural _____	Filiação: Pai _____ e Mãe _____	
Província: _____	Distrito _____ Vila/Cidade _____	
Bairro _____		
SESSÃO II - Informação clínica:		
Data do início da doença: ____/____/____ (DD/MM/AA)	Diagnóstico de admissão: _____ Outros diagnósticos: _____	
Alguns antibióticos na admissão? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Se sim qual: _____		
Sinais e sintomas de meningite	Enfermidades actuais	
Temperatura: ____°C <input type="checkbox"/> Axilar <input type="checkbox"/> Retal	O/A paciente tem actualmente uma das seguintes doenças?	
<input type="checkbox"/> História de febre	<input type="checkbox"/> Desidratação	
<input type="checkbox"/> Convulsões	<input type="checkbox"/> Aumento de frequência respiratória	
<input type="checkbox"/> Alteração do nível de consciência	<input type="checkbox"/> Tosse	
<input type="checkbox"/> Regidez na nuca	<input type="checkbox"/> Dificuldade de respirar	
<input type="checkbox"/> Dificuldade de alimentar	<input type="checkbox"/> Retração costal	
<input type="checkbox"/> Abaulamento de fontanelas	<input type="checkbox"/> Outros: _____	
LCR colhido? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	Data de colheita: ____/____/____ (DD/MM/AA) Hora de colheita: ____:____	
SESSÃO III - História de vacinação:		
Vacina de Hib recebida?	Vacina PCV 10 recebida?	Outras vacinas?
1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 9. SI <input type="checkbox"/>	1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 9. SI <input type="checkbox"/>	1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 9. SI <input type="checkbox"/>
Se sim número de doses _____	Se sim número de doses _____	Se sim, qual? _____
Datas de vacinação <DD/MM/AA>	Datas de vacinação <DD/MM/AA>	Datas de vacinação <DD/MM/AA>
(Dose 1) ____/____/____	(Dose 1) ____/____/____	(Dose 1) ____/____/____
(Dose 2) ____/____/____	(Dose 2) ____/____/____	(Dose 1) ____/____/____
(Dose 3) ____/____/____	(Dose 3) ____/____/____	(Dose 1) ____/____/____
FONTE DE INFORMAÇÃO		
1. Cartão de vacinação <input type="checkbox"/> 2. Registo Médico <input type="checkbox"/> 3. Historial Médico <input type="checkbox"/> 9. SI <input type="checkbox"/> Outras fontes: _____		
SESSÃO IV - Resultados do paciente:		
Resultado no momento de alta:		
1. Vivo <input type="checkbox"/> 2. Óbito <input type="checkbox"/> 3. Transferido <input type="checkbox"/> 9. SI <input type="checkbox"/>		
Sequelae: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 9. SI <input type="checkbox"/> Se sim descreva: _____		
Diagnóstico final: 1. Pneumonia <input type="checkbox"/> 2. Meningite: 2.1. Bacteriana <input type="checkbox"/> 2.2. Viral <input type="checkbox"/> 3. Septicemia <input type="checkbox"/> 4. Outros <input type="checkbox"/> 9. SI <input type="checkbox"/>		
Se outro, qual? _____		

Académica, Lda.

Frequência e epidemiologia molecular das estirpes causadoras de meningites bacterianas agudas em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique

SESSÃO V - Resultados laboratoriais do posto sentinela:	
Laboratório clínico do posto sentinela _____/_____/_____ Data de recepção da amostra no laboratório ____/____/____ Hora da recepção da amostra no Lab. ____/____/____ LCR foi processado: 1. Sim / 2. Não	
Aparência do LCR: 1. Limpido <input type="checkbox"/> Contagem de leucócitos no LCR: <10 / 10 - 100 / > 100 2. Turvo <input type="checkbox"/> Resultado de glucose do LCR: <40 / 40 - 10 / = ou > 100 3. Xantocrômico <input type="checkbox"/> Resultado de proteínas do LCR: < ou = 100 / > 100 4. Sanguinolento <input type="checkbox"/> Resultado de glicemia _____ 5. Outro <input type="checkbox"/> Resultado de Gram: 1. Gram positivo <input type="checkbox"/> 2. Gram negativo <input type="checkbox"/> 3. NSE <input type="checkbox"/> 9. Si <input type="checkbox"/>	
Resultado de cultura: 1. Hib <input type="checkbox"/> 2. <i>S. pneumoniae</i> <input type="checkbox"/> 3. <i>N. meningitidis</i> não tipificado <input type="checkbox"/> 4. Outros _____ 5. Sem crescimento <input type="checkbox"/> 6. Cultura não feita <input type="checkbox"/>	Resultado de teste de latex: 1. Positivo Hib <input type="checkbox"/> 2. Positivo <i>S. pneumoniae</i> <input type="checkbox"/> 3. Positivo <i>N. meningitidis</i> : <input type="checkbox"/> 4. Positivo <i>N. meningitidis</i> : A, C, Y, W135 5. Negativo <input type="checkbox"/> 6. Outro <input type="checkbox"/> Se outro, especifique _____
Outros testes feitos: 1. Binax <input type="checkbox"/> 2. Identificação bioquímica <input type="checkbox"/> 3. Optoquina <input type="checkbox"/> 4. Factor X e V <input type="checkbox"/> 5. Outros testes _____ Se outros qual foi o resultado: _____	
LCR enviado ao LNRM: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data de envio: ____/____/____ Foi colhido outro fluido (além de LCR): 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Se sim que fluido: _____ Resultado da Cultura do fluido _____ Foi isolado do LCR enviado ao LNRM: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data de envio: ____/____/____ Comentários do Laboratório _____	
<i>H. influenzae</i>, serotipo identificado: 1. a <input type="checkbox"/> 2. b <input type="checkbox"/> 3. c <input type="checkbox"/> 4. d <input type="checkbox"/> 5. e <input type="checkbox"/> 6. f <input type="checkbox"/> Não tipificado <input type="checkbox"/> Resultado da resistência antimicrobiana para <i>H. influenzae</i> : 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Oxacilina (1mg) _____ Cloranfenicol (30 mg) _____ Cefotaxime (30 mg) _____ Outros _____ Penicilina (10 Unit) _____ Cotrimoxazol (25 mg) _____ Ciprofloxacina (5 mg) _____ Ampicilina (10 Unit) _____ Eritromicina (15 mg) _____ Vancomicina (30 mg) _____	
<i>S. pneumoniae</i>, serotipo identificado: _____ Não tipificado <input type="checkbox"/> Resultado da resistência antimicrobiana para <i>S. pneumoniae</i> : 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Oxacilina (1mg) _____ Cloranfenicol (30 mg) _____ Cefotaxime (30 mg) _____ Outros _____ Penicilina (10 Unit) _____ Cotrimoxazol (25 mg) _____ Ciprofloxacina (5 mg) _____ Ampicilina (10 Unit) _____ Eritromicina (15 mg) _____ Vancomicina (30 mg) _____	
<i>N. meningitidis</i>, serotipo identificado: 1. A <input type="checkbox"/> 2. C <input type="checkbox"/> 3. Y <input type="checkbox"/> 4. W 135 <input type="checkbox"/> Não tipificado <input type="checkbox"/> Resultado da resistência antimicrobiana para <i>N. meningitidis</i> : 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Oxacilina (1mg) _____ Cloranfenicol (30 mg) _____ Cefotaxime (30 mg) _____ Outros _____ Penicilina (10 Unit) _____ Cotrimoxazol (25 mg) _____ Ciprofloxacina (5 mg) _____ Ampicilina (10 Unit) _____ Eritromicina (15 mg) _____ Vancomicina (30 mg) _____	
SESSÃO VI - Laboratório nacional de referência de microbiologia/Laboratório de isolamento viral:	
LCR/ isolado recebido: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data de recepção ____/____/____ LCR/ isolado conservado: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> T °C de conservação: 1. - 20 °C <input type="checkbox"/> 2. - 70 °C <input type="checkbox"/>	
Meningite Bacteriana Resultado de teste de PCR: 1. <i>H. influenzae</i> <input type="checkbox"/> 2. <i>S. pneumoniae</i> <input type="checkbox"/> 3. <i>N. meningitidis</i> <input type="checkbox"/> 4. Negativo <input type="checkbox"/>	Meningite Viral Resultado: 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> Agente Isolado/Detectado _____
Visto do Responsável Clínico da Vigilância de Hib _____ Visto do Departamento de Epidemiologia _____	

Anexo 2. Fluxograma geral de testagem de amostras



Anexo 3. Reacções, serotipos, sequência e concentração de iniciadores e produto de PCR

Reacção	Serotipos	No. de acesso no GenBank	Sequência de iniciadores (5'3')	Concentração dos iniciadores (µM)	Gene	Produto PCR (Pb*)
	14F	CR931662	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT	0,3	wzy	189
	14R		GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT	0,3		
	1F	CR931632	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	0,3	wzy	280
	1R		CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	0,3		
	5F	CR931637	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	0,3	wzy	362
	5R		GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	0,3		
	4F	CR931635	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	0,3	wzy	430
	4R		GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	0,3		
	18C-F	CR931673	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	0,3	wzy	573
	18C-R		TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	0,3		
	6A, 6B, 6C, 6D-F	CR931639	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	0,3	wci P	250
	6A 6B, 6C, 6D-R		TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	0,3		
	19F-F	CR931678	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	0,5	wzy	304
	19F-R		GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	0,5		
2	23F-F	CR931685	CCACAATTAGCGCTATATTCATTCAATCG	0,5	wzy	384
	23F-R		GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG	0,5		
	25F, 25A, 38-F	CR931710	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	0,5	wzy	574
	25F, 25A, 38-R		ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	0,5		
	9V, 9A-F	CR931648	GGGTTCAAAGTCAGACAGTGAATCTTAA	0,5	wzy	816
	9V, 9A-R		CCATGAATGAAATCAACATTGTCAGTAGC	0,5		
	7C, 7B, 40-R	CR931642	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	0,3	wcv L	260
	7C, 7B, 40-F		GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	0,3		
	3-F	CR931634	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	0,3	gal U	371
	3-R		CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	0,3		
3	15B,15C-F	CR931665	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	0,3	wzy	496
	15B,15C-R		CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	0,3		
	7F,7A-F	CR931643	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG	0,3	wzy	599
	7F,7A-R		ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC	0,3		
	17F-F	CR931670	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	0,4	wci P	693
	17F-R		GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	0,4		
	8-F	CR931644	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT	0,2	wzy	201
	8-R		CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT	0,2		
4	12F, 12A, 44, 46-F	CR931660	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	0,5	wzx	376
	12F, 12A, 44, 46-R		CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	0,5		
	9N, 9L-F	CR931647	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC	0,5	wzx	516
	9N, 9L-R		ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T	0,5		
	22F, 22A-F	CR931682	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	0,5	wcv V	643
	22F, 22A-R		CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	0,5		
	23A-F	CR931683	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	0,5	wzy	722
	23A-R		CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC	0,5		
	24F/24A/24B-F	CR931688	GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G	0,2	wzy	99
	24F/24A/24B-R		GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG	0,2		
5	2-F	CR931633	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC	0,3	wzy	290
	2-R		ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT	0,3		
	11A/11D-F	CR931653	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	0,3	wzy	463
	11A/11D-R		GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	0,3		

Frequência e epidemiologia molecular das estirpes causadoras de meningites bacterianas agudas em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique

	19A-F 19A-R	CR931675	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC	0,3 0,3	wzy	566
	16F-F 16F-R	CR931668	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA	0,4 0,4	wzy	717
6	21-F 21-R	CR931680	CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG	0,2 0,2	wzx	192
	33F/33A/37-F 33F/33A/37-R	CR931702	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	0,3 0,3	wzy	338
	15A/15F-F 15A/15F-R	CR931663	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	0,3 0,3	wzy	434
	35F/47F-F 35F/47F-R	CR931702	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	0,3 0,3	wzy	517
	13-F 13-R	CR931661	TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG CTCATGCATTTTATTAACCGCTTTTGTTC	0,4 0,4	wzx	655
7	39-F 39-R	CR931711	TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA	0,2 0,2	wzy	98
	23B-F 23B-R	CR931684	CCACAATTAGCGCTATATTCATTCAATCG GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG	0,2 0,2	wzx	199
	35A/35C/42-F 35A/35C/42-R	CR931704	ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T	0,3 0,3	wzx	280
	20-F 20-R	CR931679	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	0,3 0,3	wci L	514
	35B-F 35B-R	CR931705	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	0,5 0,5	wcr H	677
8	10F/10C/33C-F 10F/10C/33C-R	CR931652	GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA	0,3 0,3	wzx	248
	34-F 34-R	CR931703	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	0,3 0,3	wzy	408
	10A-F 10A-R	CR931649	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	0,5 0,5	wcr G	628
	31-F 31-R	CR931695	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	0,5 0,5	wzy	701
CI	<i>cpsA</i> -F <i>cpsA</i> -R	CR931662	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	0,1 0,1	wzg	160

*Pb: pares de bases