

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Nathalia Gonçalves Santos Caldeira

***HAEMOPHILUS INFLUENZAE*: CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS
CLÍNICAS ISOLADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO NO
PERÍODO PÓS-VACINAL (2000 - 2012).**

Rio de Janeiro

2013

Nathalia Gonçalves Santos Caldeira

***HAEMOPHILUS INFLUENZAE*: CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS
CLÍNICAS ISOLADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO NO
PERÍODO PÓS- VACINAL (2000 – 2012).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Antonio Eugenio C. C. de Almeida

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Caldeira, Nathalia Gonçalves Santos

Haemophilus influenzae: caracterização de cepas clínicas isoladas no município do Rio de Janeiro no período pós-vacinal (2000-2012)./ Natália Gonçalves Santos Caldeira. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

105 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Antonio Eugenio Castro de Almeida

1. *Haemophilus influenzae*. 2. Vacinas Anti-*Haemophilus*. 3. Controle de Qualidade.. I Título

Haemophilus influenzae: Characterization of clinical strains isolated in the city of Rio de Janeiro in the post-vaccination period (2000-2012).

Nathalia Gonçalves Santos Caldeira

***HAEMOPHILUS INFLUENZAE*: CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS
CLÍNICAS ISOLADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO NO
PERÍODO PÓS- VACINAL (2000 – 2012).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Celia Maria Carvalho Araújo Pereira Romão (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Felipe Piedade Gonçalves Neves (Doutor)
Universidade Federal Fluminense

Maria Regina Branquinho (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (Orientador)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho à minha família, a qual está sempre me estimulando a enfrentar os desafios da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande pai e amigo, que me protege e guarda. Deus, obrigada pela saúde que tem me dado, pela força nas horas difíceis e pela benção de mais uma conquista.

Aos meus amados pais José e Solange, que me ensinaram os primeiros passos e que até hoje são os meus alicerces, sempre segurando a minha mão e me enchendo de amor, força, amizade... Saibam que vocês são as pessoas mais importantes na minha vida, e as que eu mais amo no mundo.

Ao meu irmão que está sempre me apoiando e aturou algumas vezes o meu mau humor devido ao cansaço.

Aos meus avós Maurílio, Dalva Gonçalves e Dalva Caldeira, pela compreensão nas vezes em que eu não pude visitá-los.

Aos meus tios e tias, primos e primas pelo mesmo motivo anterior.

Ao colega de trabalho e orientador Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida por confiar no meu trabalho, ser um grande amigo, pai, e ter me estimulado a fazer o Mestrado, me orientando sempre com bom humor e carinho.

Aos membros da banca examinadora do projeto e da dissertação final, Dra. Célia Romão, Dr. Felipe Piedade, Dra. Regina Branquinho, Dr. Ivano de Filippis e Dra. Tatiana Pinto, obrigada por aceitarem a fazer parte da minha banca e pelas horas de leitura do projeto e da dissertação.

Aos colegas de trabalho e professores, Ivano de Filippis e Maysa Clementino por estarem sempre dispostos a me ajudar na parte de Biologia Molecular, e pelos momentos de descontração.

À Dra. Lúcia Teixeira, e toda a equipe do laboratório de Microbiologia da UFRJ (Dra. Vania, Nathalia, Luciana, Andréia, Filomena, Jaqueline, Felipe, Guilherme, Adriana, Beatriz, Sandrine...) por me ensinarem a técnica do Pulsed Field com tanta atenção e carinho; e pelas conversas e risadas que tivemos. Especialmente à Tatiana que esteve ao meu lado me ensinando o passo a passo na bancada.

Às minhas amigas e amigos de trabalho, de longa data, de curta data, as que ficam e as que passam. Muito obrigada pelas risadas, pelos momentos de força, enfim... Por vocês existirem ao meu lado. Obrigada à Claudinha, Catinha, Jandira, Talita, Alice, Sara, Cinthia, Agatha, Ariana, Deiviane, Aninha, Letícia, Samara, Mayara, Carlos, Guilherme, Kaio,

Antônio e à Jaciara, que foi minha companheira de luta nesses dois anos de mestrado, com as suas “baianices” engraçadas que me faziam relaxar.

Aos colegas dos setores de Meios de Cultura e de Esterilização do Departamento de Microbiologia do INCQS, que estão sempre dispostos a nos salvar nos momentos de desespero na falta de meios de cultura e vidrarias.

Às todos os que de alguma forma fazem parte da minha vida e me ajudam a seguir em frente: minhas professoras e amigas do Pilates (Priscila, Wellen, Ana Lucia, Rosa, Sandra, Juliana, Luciana), aula de Pilates é uma festa com vocês. Amigas da faculdade (Luciana, Joice, Ivy, Isis, Marcela, Adriana, Yvaga e Cinthia) estou morrendo de saudades!

Enfim... A todos, obrigada!!!

O saber contra a ignorância, a saúde
contra a doença, a vida contra a morte...
Mil reflexos da batalha permanente em
que estamos todos envolvidos.

Oswaldo Cruz

RESUMO

Haemophilus influenzae pode ser encontrado, normalmente, na microbiota do trato respiratório, do trato gênito-urinário e da cavidade oral. Porém, essa espécie inclui um dos mais importantes patógenos bacterianos em infecções principalmente pediátricas. As cepas de Hi podem ser capsuladas, variando de a-f, ou não capsuladas (não tipáveis - NT). O tipo capsular b foi o mais frequente em infecções graves infantis até a utilização da vacina conjugada contra Hib, sendo ainda considerado patogênico. No Brasil, essa vacina foi introduzida no Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde em agosto de 1999, e como em outros países, promoveu uma acentuada diminuição em doenças causadas por esse agente. No entanto, estudos realizados na era pós-vacinal têm mostrado que a incidência de doenças invasivas causadas por *H. influenzae* não b e NT têm aumentado, inclusive no Brasil. O objetivo desse trabalho foi obter informações sobre as cepas de Hi circulantes no município do Rio de Janeiro. Utilizou-se 96 amostras de quadros infecciosos (46 invasivas e 50 não invasivas), isoladas no período pós-vacinal (2000-2012). Em relação à idade, dos 54 pacientes que tiveram esse dado, 32 tiveram doenças invasivas e 22 não invasivas. Em doenças invasivas, houve o predomínio de crianças < 5 anos. Enquanto que nas não invasivas os adultos > 70 anos predominaram. Entre as cepas obtidas, 15 foram capsuladas e 81 não capsuladas. A maioria das cepas capsuladas foi proveniente de sítios invasivos, cuja faixa etária predominante foi de < 5 anos. O tipo capsular mais isolado foi o b, seguido do a e f. As cepas Hib, predominaram no início do período de estudo, enquanto os outros sorotipos predominaram no final. No presente trabalho, não encontramos cepas mutantes deficientes de cápsula tanto Hib⁻, quanto Hia⁻. As cepas NT representaram a grande maioria dos isolados desse estudo, sendo 32 cepas isoladas de sítios invasivos e 49 de sítios não invasivos, e foram obtidas de pacientes de todas as faixas etárias. As cepas capsuladas foram predominantemente do biotipo I e II, enquanto as cepas não-tipáveis foram, a maioria II e III. Nesse estudo, somente as cepas NT apresentaram resistência a dois fármacos: ampicilina e sulfametoxazol – trimetoprim. Estas sendo em sua maioria não invasivas. Dessa forma, nenhum dos isolados capsulados apresentou resistência. Os padrões de PFGE para as 96 cepas foram bastante diversos, porém oito cepas NT pertenceram ao mesmo genótipo. As cepas capsuladas de um mesmo sorotipo foram parecidas, ficando a maioria dos isolados agrupada em um mesmo “cluster”. Concluímos, portanto, que é necessário o monitoramento das cepas de Hi circulantes no Rio de Janeiro, pela importância geográfica e econômica deste município. Tal conduta deve ser estendida para todo país visando à compreensão das possíveis alterações dos sorotipos prevalentes na atualidade, que certamente orientará em condutas epidemiológicas, na produção de novas vacinas, aprimoramento das existentes e no uso de antibióticos, o que resultará em impacto na saúde pública.

Palavras chaves: *Haemophilus influenzae*; pós-vacinação Hib; Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Haemophilus influenzae can be found usually in the microbiota of the respiratory tract, genitourinary tract and oral cavity. However, this species includes one of the most important bacterial pathogens mainly in pediatric infections. The strains can be capsulated Hi, (serotypes a-f), or not capsulated (nontypeable - NT). The type b capsular was the most frequent serious infection in children until the use of conjugate vaccine against Hib and is still considered pathogenic. In Brazil, this vaccine was introduced in the National Immunization Program of the Ministry of Health in August 1999, and as in other countries, promoted a significant decrease of disease caused by this agent. However, studies during the post-vaccine period have shown that the incidence of invasive disease caused by *H. influenzae* b and NT have increased, including in Brazil. The aim of this study was to obtain information on the Hi strains circulating in the municipality of Rio de Janeiro. We used 96 samples (46 invasive and 50 noninvasive), isolated during the post-vaccination period (2000-2012). Concerning the age of the 54 patients who had this data, 32 had invasive and 22 noninvasive disease. In invasive disease, there was a predominance of children <5 years. While in the noninvasive group, adults > 70 years predominated. Among the strains obtained, 15 were capsulated and 81 non-capsulated. Most capsulated strains originated from invasive sites whose predominant age group was <5 years. The most frequent capsular type was b, followed by a and f. Hib strains predominated at the beginning of the study period, while the other serotypes prevailed in the end. In this study, we did not find mutant strains deficient in both capsule Hib⁻ and Hia⁻. NT strains accounted for the vast majority of isolates in this study, 32 strains isolated from invasive sites and 49 sites noninvasive, and were obtained from patients of all age groups. The capsulated strains were predominantly biotype I and II, while nontypeable strains were most II and III. In this study, only the NT strains were resistant to two drugs: ampicillin and trimethoprim - sulfamethoxazole. These were mostly non-invasive. Thus, none of the capsulated isolates were resistant. The PFGE patterns for the 96 strains were quite different, however eight NT strains belonged to the same genotype. Capsulated strains of the same serotype were similar, getting most isolates grouped in the same *cluster*. We therefore conclude that it is necessary to monitor the Hi strains circulating in Rio de Janeiro, because of the geographic and economic importance of this municipality. Such conduct should be extended to the whole country in order to understand the possible changes of serotypes today, which will certainly guide for the design of new vaccines, improvement of existing ones and the use of antibiotics, resulting in a public health impact.

Keywords: *Haemophilus influenzae*; post vaccination Hib, Rio de Janeiro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfologia de <i>Haemophilus influenzae</i>	18
Figura 2. Estrutura da unidade repetitiva do polissacarídeo capsular de Hib- PRP.....	20
Figura 3. Esquema simplificado do locus <i>cap</i> de <i>Haemophilus influenzae</i>	21
Figura 4. Esquema simplificado do locus <i>cap</i> parcialmente duplicado mostrando a região I truncada com a deleção de 1.2-Kb entre IS1016 e <i>bexA</i>	22
Figura 5. Organização do locus <i>cap</i> em variantes Hib ⁻ e Hia ⁻	22
Figura 6. Organização do locus <i>cap</i> em variantes hiperencapsuladas.....	23
Figura 7. Fisiopatologia das infecções por <i>H. influenzae</i> tipo b.....	28
Figura 8. Variação anual do número de casos de meningite no município do Rio de Janeiro.....	43
Figura 9. Variação das meningites bacterianas, em todas as faixas etárias, conforme a etiologia do agente causador.....	44
Figura 10. Gráfico da distribuição da idade em pacientes com doenças invasivas causadas por <i>H. influenzae</i> (n=32).....	60
Figura 11. Gráfico da distribuição da idade em doenças não invasivas causadas por <i>H. influenzae</i> (n=22).....	60
Figura 12. Gráfico de distribuição dos materiais clínicos utilizados para isolamento de <i>H. influenzae</i> em doenças invasivas (n=46).....	61
Figura 13. Gel demonstrativa da PCR multiplex para confirmação de gênero, espécie e presença de cápsula de <i>H. influenzae</i>	62
Figura 14. Gráfico dos diferentes biotipos encontrados no estudo (n=96).....	63
Figura 15. Gráfico de distribuição dos biotipos em cepas invasivas de <i>H. influenzae</i> (n=46).....	63
Figura 16. Gráfico de distribuição de biotipos em cepas não invasivas de <i>H. influenzae</i> (n=50).....	64
Figura 17. Gel da PCR para confirmação de sorotipos, contendo as 15 cepas encapsuladas encontradas nesse estudo.....	65
Figura 18. Gráfico de variação dos sorotipos em doenças invasivas causadas por <i>H. influenzae</i> no período de 2000-2012.....	68
Figura 19. Dendograma das 96 amostras clínicas utilizadas no estudo.....	73

Figura 20. Perfis de fragmentação em amostras de <i>H. influenzae</i> , após a digestão com a enzima <i>Sma</i> I e PFGE.....	74
Figura 21. Dendograma das cepas de <i>H. influenzae</i> que foram positivas para a produção de β -lactamase.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de aderência de <i>H. influenzae</i>	23
Tabela 2. Meningites causadas por <i>H. influenzae</i> em diferentes regiões do Brasil no ano de 2010.....	43
Tabela 3. Origem das cepas de <i>H. Influenzae</i> utilizadas no presente estudo.....	48
Tabela 4. Biotificação de <i>Haemophilus influenzae</i>	50
Tabela 5. Critérios de interpretação dos testes de susceptibilidade aos antibióticos para <i>H. influenzae</i>	53
Tabela 6. Protocolo da PCR multiplex para confirmação de gênero, espécie e presença de cápsula em <i>H. Influenzae</i>	55
Tabela 7. Protocolo da PCR para confirmação do tipo capsular de <i>H. Influenzae</i>	56
Tabela 8. Protocolo de corrida do gel de eletroforese.....	58
Tabela 9. Distribuição do sexo entre as doenças invasivas e não invasivas causadas por <i>H. influenzae</i>	59
Tabela 10. Distribuição dos biotipos por material clínico em doenças invasivas causadas por <i>H. influezae</i>	64
Tabela 11. Distribuição dos biotipos por material clínico em doenças não invasivas causadas por <i>H. influenzae</i>	65
Tabela 12. Distribuição dos sorotipos por material clínico em doenças invasivas causadas por <i>H. influenzae</i>	66
Tabela 13. Distribuição dos sorotipos por idade em doenças invasivas causadas por <i>H. influenzae</i>	67
Tabela 14. Correlação entre os sorotipos e biotipos de <i>H. influenzae</i> encontrados neste estudo.....	68
Tabela 15. Resistência das cepas de <i>H. influenzae</i> aos antibióticos ampicilina e sulfametoxazol – trimetoprim.....	69
Tabela 16. Diferença entre o número de cepas, invasivas e não invasivas, resistentes aos antibióticos pela concentração inibitória mínima.....	70
Tabela 17. Resistência encontrada nos Hospitais.....	71

LISTA DE SIGLAS

AMP – Ampicilina
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATP – Adenosina Trifosfato
BHI – *Brain Heart Infusion*
BLA+ – Resistente à ampicilina β -latamase positiva
BLNAR – Resistente à ampicilina β -latamase negativa
ChoP – Fosforilcolina
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CSNSC – Casa de Saúde Nossa Senhora do Carmo
DHFR – Enzima Dihidrofolato Redutase
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DT – Toxóide Diftérico
DTP – Difteria, Tétano e Pertussis
ERIC – *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FO – Fragmento de Osso
HECC – Hospital Estadual Carlos Chagas
HEGV – Hospital Estadual Getúlio Vargas
HFCE – Hospital Federal Cardoso Fontes
Hi – *Haemophilus influenzae*
Hia – *Haemophilus influenzae* tipo a
Hib – *Haemophilus influenzae* tipo b
HiNT – *Haemophilus influenzae* não tipável
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HMLJ – Hospital Municipal Lourenço Jorge
HMMC – Hospital Municipal Miguel Couto
HTM – *Haemophilus Test Medium*
IEISS – Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião
IFF – Instituto Nacional Fernandes Figueira
IgA – Imunoglobulina A
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IPPMG – UFRJ – Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira-Universidade Federal do Rio de Janeiro

LB – Lavado Broncoalveolar

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LOS – Lipo-oligossacarídeo

LP – Líquido Pleural

LPS – Lipopolissacarídeo

MALVA – *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis*

MLEE – *Multilocus Enzyme Electrophoresis*

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

MS – Ministério da Saúde

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

OMP – *Outer Membrane Protein* / Proteína de Membrana Externa

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAC – Pneumonia Adquirida em Comunidade

PBP – *Penicillin Binding Proteins* / Proteínas Ligantes de Penicilina

PCR – *Polymerase Chain Reaction* / Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis*

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PRP – Poliribosil Ribitol Fosfato

PS – Polissacarídeo

SAL – Soroaglutinação em Lâmina

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

ST – Secreção Traqueal

SUS – Sistema Único de Saúde

SUT – Sulfametaxazol-Trimetoprim

TRS – Trato Respiratório Superior

TT / T – Toxóide Tetânico

VFDB – Virulence Factors Database

VNTR – *Variable Number Tandem Repeats Typing*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 GÊNERO <i>HAEMOPHILUS</i>	17
1.2 <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	18
1.2.1 Morfologia e fisiologia.....	18
1.2.2 Principais fatores de virulência.....	19
1.2.2.1 Cápsula.....	19
1.2.2.2 Fatores de aderência ou adesinas.....	23
1.2.2.3 Endotoxina Lipo-oligosacarídeo.....	24
1.2.2.4 Imunoglobulina A1 protease.....	24
1.2.2.5 Proteínas de Membrana Externa.....	25
1.2.2.6 Obtenção de ferro.....	25
1.2.2.7 Hemocina.....	26
1.2.3 Patogênese e transmissão.....	26
1.2.4 Significância clínica e epidemiologia.....	29
1.2.5 Diagnóstico laboratorial e métodos de tipificação.....	31
1.2.5.1 Exames microscópios: bacterioscopia direta e pós-cultura.....	31
1.2.5.2 Cultura	31
1.2.5.3 Requerimento de fatores de crescimento, produção de hemólise e testes bioquímicos.....	32
1.2.5.4 Sorotipificação.....	32
1.2.5.5 Biotipificação.....	33
1.2.5.6 Métodos de tipificação molecular.....	33
1.2.6 Tratamento e Profilaxia.....	35
1.2.6.1 Antibióticos e resistência bacteriana.....	35
1.2.6.2 Quimioprofilaxia.....	37
1.2.6.3 Vacina contra Hib.....	38
1.2.7 Situação atual.....	40
2 JUSTIFICATIVA	45
3 OBJETIVOS	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4 METODOLOGIA.....	47
4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS.....	47
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	48
4.2.1 Cultura Bacteriana.....	48
4.2.2 Avaliação da necessidade de sangue.....	49
4.2.3 Avaliação da formação de hemólise.....	49
4.2.4 Testes bioquímicos.....	49
4.2.4.1 <i>Fermentação de carboidratos</i>	49
4.2.4.2 <i>Biotipificação</i>	50
4.2.5 Sorotipificação.....	51
4.2.6 Testes de sensibilidade aos antibióticos.....	51
4.2.6.1 <i>Método de Difusão em ágar (“Kirby-Bauer”)</i>	51
4.2.6.2 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima- CIM</i>	52
4.2.6.3 <i>Análise dos Testes de Sensibilidade</i>	52
4.2.6.4 <i>Pesquisa de β-lactamase</i>	53
4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	54
4.3.1 Extração e purificação do DNA genômico.....	54
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	54
4.3.2.1 <i>Confirmação do gênero, espécie e da presença de cápsula</i>	54
4.3.2.2 <i>Confirmação do tipo capsular de Hi</i>	55
4.3.2.3 <i>Análise dos produtos gerados pela PCR</i>	56
4.3.3 Macrorestrição do DNA e Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (PFGE).....	56
4.3.3.1 <i>Amostras bacterianas</i>	57
4.3.3.2 <i>Preparação do DNA cromossômico</i>	57
4.3.3.3 <i>Restrição e Eletroforese dos fragmentos de DNA</i>	58
4.3.3.4 <i>Visualização e análise dos perfis de fragmentação do DNA</i>	58
5 RESULTADOS.....	59
5.1 DADOS DOS PACIENTES.....	59
5.2 MATERIAIS CLÍNICOS.....	61
5.3 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS.....	61
5.4 BIOTIPIFICAÇÃO.....	62
5.5 SOROTIPIFICAÇÃO POR SOROAGLUTINAÇÃO E PCR.....	65
5.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	68

5.7 MACRORESTRIÇÃO DO DNA E ELETROFORESE EM CAMPO ELÉTRICO PULSADO (PFGE).....	71
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	88
ANEXO A – Características diferenciais de espécies de <i>Haemophilus</i>	99
ANEXO B – Protocolo de confecção das placas com diferentes concentrações de ampicilina para determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	100
ANEXO C – Iniciadores empregados na determinação de gênero, espécie e tipo capsular de <i>H. influenzae</i>	102
ANEXO D – Publicação referente à dissertação.....	103

INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas desempenham um papel bastante relevante ao longo da história da humanidade. Desde os tempos remotos, diversos agentes bacterianos têm sido responsáveis por doenças endêmicas ou epidêmicas que tiveram efeitos devastadores sobre a população humana. Uma espécie de bactéria que faz, ou pode fazer parte da microbiota normal, e que têm potencial para causar doenças diversas, inclusive graves, é *Haemophilus influenzae* (Hi) (BARRETO, 2008).

Essa espécie foi descoberta pelo bacteriologista Richard Friedrich Johann Pfeiffer em 1892, após a última pandemia de influenza do século XIX. Ele observou em amostras coletadas do aparelho respiratório de doentes com gripe espanhola, uma bactéria, a qual desconfiava ser o agente etiológico desta enfermidade. Na ocasião Pfeiffer a nomeou de *Bacillus influenzae*, o qual mais tarde veio a ser conhecido como bacilo de Pfeiffer (SILVEIRA, 2005). Em 1917 Winslow e colaboradores, durante o Comitê de Sistemática Bacteriana, criaram o gênero *Haemophilus*, e desde então o *Bacillus influenzae* passou a se chamar *Haemophilus influenzae* (HEDEGAARD, et al., 2001, DE ALMEIDA; MARZOCHI, 2006).

1.1 GÊNERO *HAEMOPHILUS*

O gênero *Haemophilus*, cujo nome significa “amantes do sangue” pertence à família *Pasteurellaceae*. Os micro-organismos desse gênero são nutricionalmente exigentes, pois necessitam dos fatores de crescimento X e /ou V que estão presentes nas hemácias de alguns mamíferos (TRABULSI; TOLEDO, 1991, HEDEGAARD, et al., 2001; BINKS, et al., 2012)

O fator X é um grupo de compostos tetrapirrólicos termoestáveis, fornecidos por vários pigmentos que contém ferro, como por exemplo, hemina, hematina e protoporfirina IX. Esses compostos são utilizados na síntese de catalases, peroxidases e citocromos do sistema de transporte de elétrons. O fator V é a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD, coenzima I) ou a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP, coenzima II), que são coenzimas que participam de vários processos metabólicos, como por exemplo, a oxidação da glicose (KONEMAN, et al., 2008).

Atualmente nove espécies de *Haemophilus* estão associadas aos seres humanos como agentes de infecções ou de colonização: *H. ducrey*, *H. aegyptius*, *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. pittmaniae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. sputorum* e *H. influenzae*. Elas estão presentes nas mucosas humanas, particularmente, às do trato respiratório superior, fazendo parte da microbiota da orofaringe e nasofaringe (NØRSKOV-LAURITSEN, et al., 2012; LPSN, 2013).

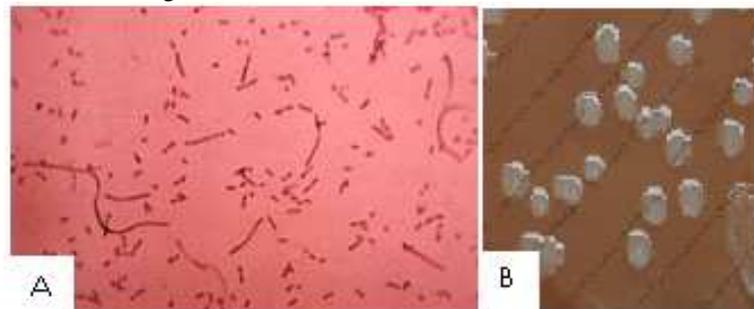
Haemophilus influenzae (Hi), entre as espécies citadas anteriormente, é a que possui maior significado clínico por ser um dos mais importantes patógenos bacterianos em infecções principalmente pediátricas. Essa espécie pode ser encontrada, normalmente, na microbiota do trato respiratório, do trato gênito-urinário e da cavidade oral (LOUNG, et al., 2004; OHKUSU; NASH; INDERLIED, 2005; NØRSKOV-LAURITSEN, et al., 2012).

1.3 HAEMOPHILUS INFLUENZAE

1.3.1 Morfologia e fisiologia

Haemophilus influenzae, assim como as outras espécies do gênero, apresenta-se, morfológicamente, como: pequenos cocobacilos pleomórficos, Gram-negativos, não formadores de esporos e não móveis (Figura 1). Suas colônias são pequenas, redondas e convexas, e quando cultivadas em ágar transparente, exibem duas morfologias distintas: iridescentes e translúcidas (PITTMAN, 1931; HEALTH PROTECTION AGENCY, 2011).

Figura 1. Morfologia de *Haemophilus influenzae*: (A) Esfregaço de LCR corado pelo método de Gram. (B) Colônias em ágar chocolate.



Fonte: Sinusitis Understood: Infectious causes (viruses, bacteria, fungi) of sinusitis (2011); Microbiology en Pictures (2013).

As cepas de Hi possuem como exigência nutricional tanto o fator X quanto o fator V e, além da exigência aos fatores de crescimento, são anaeróbios facultativos, requerendo uma atmosfera de 5-10% de CO₂. Além disso, são fermentadores dos carboidratos glicose e xilose, e positivos para a presença de enzimas como catalase e oxidase (CAMPOS, 1999; KONEMAN, et al., 2001; LEDEBOER; DOERN, 2011).

1.3.2 Principais fatores de virulência

A espécie *Haemophilus influenzae* possui vários fatores de virulência além da cápsula, cuja maioria está relacionada à aderência, colonização e invasão. Alguns desses fatores são encontrados em todos os tipos de cepas de Hi, enquanto outros apenas em não-tipáveis.

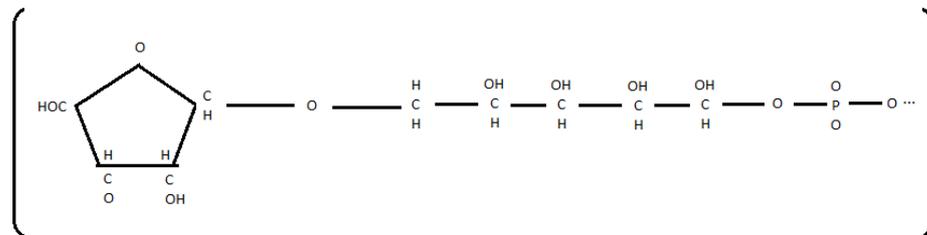
1.2.2.1 Cápsula

Muitos micro-organismos possuem externamente à parede celular, uma camada denominada cápsula, a qual geralmente é de natureza polissacarídica. A cápsula constitui um dos antígenos bacterianos de superfície e está relacionada com a virulência da bactéria, já que confere uma resistência à fagocitose e à atividade bactericida de complemento. A forte carga negativa do polissacarídeo pode provocar repulsão eletrostática das células fagocitárias, e o próprio material capsular pode impedir a fixação de anticorpos e complemento à superfície bacteriana. Desta forma, numa mesma espécie, as cepas que expressam a cápsula apresentam-se mais virulentas do que as não encapsuladas (MARRS, et al., 2001; KONEMAN, et al., 2008; DAVIS, et al., 2011).

Nas cepas patogênicas de Hi a cápsula é o fator de virulência mais importante. Esta pode variar entre os seis tipos (a – f) descritos por Pittman (1931), de acordo com o polissacarídeo capsular (PS). As cepas encapsuladas são também conhecidas como cepas tipáveis, enquanto que as cepas que não possuem cápsula externalizada, são chamadas não encapsuladas ou não tipáveis (HiNT), pois não reagem com os seis tipos de antissoros referentes aos tipos capsulares (PITTMAN, 1931; MARIN; SILVA, 2005; ADAM, 2010).

O tipo capsular b (cepas Hib) é o único tipo capsular que possui dois monossacarídeos do tipo pentose ao invés de açúcares do tipo hexose como subunidades de carboidrato, sendo a cápsula de Hib composta por um ácido teicóico linear que contém ribose, ribitol (álcool açúcar com cinco carbonos) e fosfato ligado por pontes fosfodiéster, formando o polissacarídeo poliribosil ribitol fosfato (PRP) (Figura 2). O tipo capsular b é considerado o mais patogênico e foi o mais frequente em infecções graves infantis até o final da década de 80 (MARIN; SILVA, 2005; ARACIL, et al., 2006, KONEMAN, et al., 2008; LEDEBOER; DOERN, 2011).

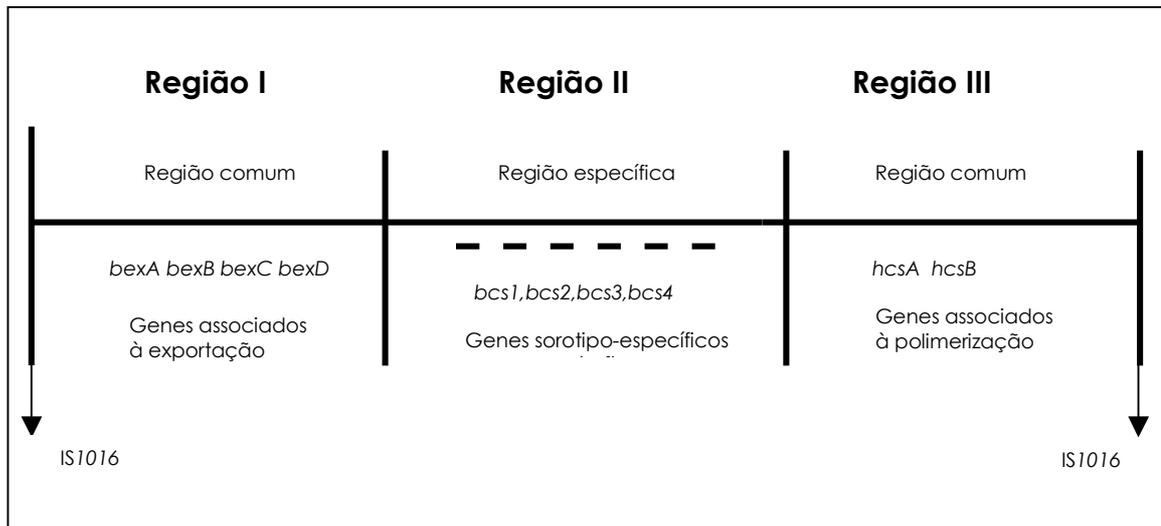
Figura 2. Estrutura da unidade repetitiva do polissacarídeo capsular de Hib- PRP.



Fonte: adaptada de Martinez; Trabulsi (2008).

Todas as cepas encapsuladas possuem um locus genético chamado *cap*, um fragmento do cromossomo de aproximadamente 17 kb, composto por três regiões (I, II e III). A região central (II) se caracteriza pela especificidade ao sorotipo, ou seja, varia conforme o tipo capsular (a – f). Ela é margeada pelas regiões homólogas I e III, as quais contêm os genes *bexABCD* e *hcsAB*, respectivamente, que são altamente conservados, estando presentes em todos os tipos capsulares (Figura 3). Os genes da região I codificam para uma molécula de exportação capsular dirigida por ATP, enquanto que os da região III parecem estar envolvidos nas etapas de polimerização capsular (KROLL, et al., 1990; SATOLA; SCHIRMER; FARLEY, 2003; DAVIS, et al., 2011).

Figura 3. Esquema simplificado do locus *cap* de *Haemophilus influenzae*.

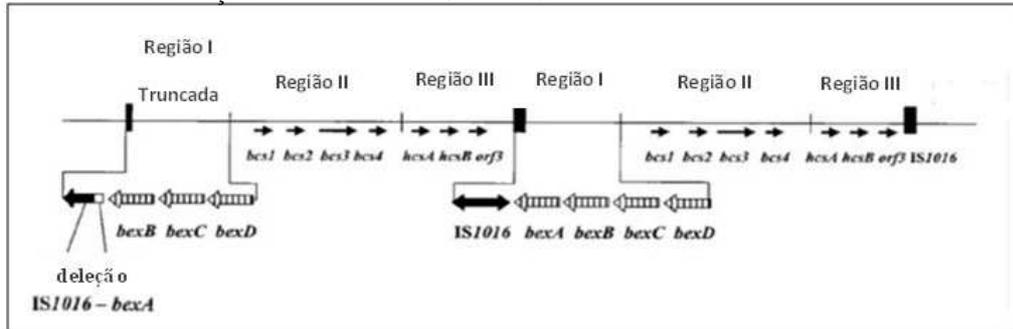


Fonte: adaptada de De Almeida e colaboradores (2005).

A organização e genética do locus *cap* são complexas. Duplicações, perda parcial e perda total do locus têm sido documentadas. Exemplo disto é que a maior parte dos isolados clínicos pertencentes ao tipo b (98%) possui uma duplicação parcial deste fragmento, enquanto que as cepas dos tipos a, c, d, e, f geralmente possuem uma única cópia do locus *cap*. No entanto, evidências recentes sugerem que cepas invasivas de Hi não b também podem apresentar a duplicação desse locus (MARRS, et al., 2001; DAVIS, et al., 2011). Exemplo disto é que cepas do sorotipo a, cuja maioria possui apenas uma cópia do locus *cap*, já foram descritas apresentando duplicação parcial desse fragmento, com o tipo de alteração que leva à deficiência de capsula, as chamadas cepas a- (KAPOGIANNIS, et al., 2005).

A duplicação parcial do locus *cap* é caracterizada por uma mutação que resulta em duas cópias completas da região II e III, uma cópia completa região I e uma cópia truncada da região I com uma deleção (1.2 Kb) entre o *bexA* e o *IS1016* (Figura 4). Esta alteração resulta em uma região geneticamente instável, com um potencial alto para os eventos de recombinação, o que resultará na formação de diferentes tipos de mutantes (KROLL; MOXON, 1988; MARRS, et al., 2001; SATOLA, et al., 2007; DAVIS, et al., 2011).

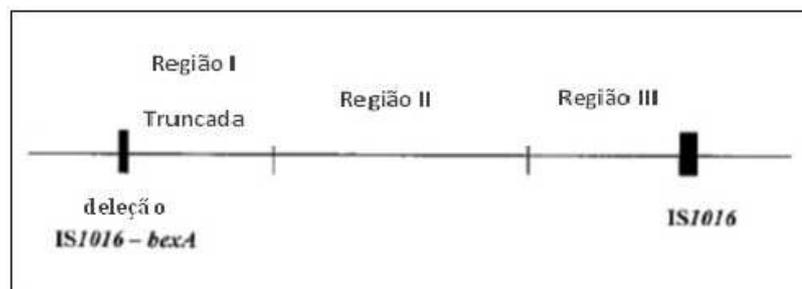
Figura 4. Esquema simplificado do locus *cap* parcialmente duplicado mostrando a região I truncada com a deleção de 1.2-Kb entre *IS1016* e *bexA*.



Fonte: adaptada de Satola; Schirmer; Farley (2003).

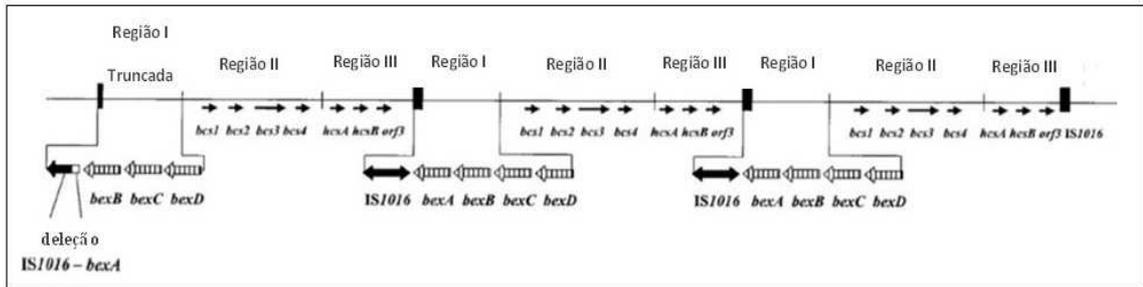
Se durante um evento de recombinação a cópia completa do locus *cap* é perdida, uma cópia truncada irá permanecer contendo o gene *bexA* parcialmente deletado, o que impedirá a formação do componente de ligação de ATP que é essencial para a exportação do material capsular para a superfície da célula bacteriana (Figura 5). Essa situação levará ao aparecimento de mutantes deficientes de cápsula, conhecidos como Hib⁻ ou b⁻, Hia⁻ ou a⁻ (SATOLA; SCHIRMER; FARLEY, 2003; SATOLA, et al., 2007; DAVIS, et al., 2011).

Figura 5. Organização do locus *cap* em variantes Hib⁻ e Hia⁻.



Fonte: adaptada de Satola; Schirmer; Farley (2003).

Outros, apresentam um adicional (n) de cópias do locus *cap* contendo n-1 cópias do *bexA* íntegro (Figura 6). Estes são mutantes que produzem mais polissacarídeo capsular, sendo fortemente encapsuladas (hiperencapsuladas), mais virulentas, levando, dessa forma, a um aumento na patogenicidade (SATOLA; SCHIRMER; FARLEY, 2003; SATOLA, et al., 2007; DAVIS, et al., 2011).

Figura 6. Organização do locus *cap* em variantes hiperencapsuladas.

Fonte: adaptada de Satola; Schirmer; Farley (2003).

1.2.2.2 Fatores de aderência ou adesinas

Os fatores de adesão ou adesinas são estruturas existentes na superfície das células bacterianas que permitem, pelo estabelecimento de ligações específicas, a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro (TRABULSI; TOLEDO, 1991; KLEMM; SCHEMBRI, 2000; VFDB, 2003). No Hi algumas estruturas e moléculas conhecidas como fatores de adesão estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores de aderência de *H. influenzae*.

Fator de aderência	Genes Relacionados	Tipo de Hi
Pili ou fímbria hemaglutinante	<i>hifA</i> , <i>hifB</i> , <i>hifC</i> , <i>hifD</i> , <i>hifE</i>	Hib e HiNT (cerca de 30-40%).
Haemophilus adesão e penetração (Hap)	<i>hap</i>	Todas as cepas de Hi.
Hia (proteína não fimbrial) / Hsf (adesina secundária)	<i>hia</i> , <i>hsf</i>	Hia → cepas HiNT que carecem das adesinas HMW1 / HMW2 Hsf → cepas Hib
Proteínas de alto peso molecular HMW1/HMW2	<i>hmw1A</i> , <i>hmw1B</i> , <i>hmw1C</i> , <i>hmw2A</i> , <i>hmw2B</i> , <i>hmw2C</i>	HiNT (70-80%).
Opacidade associada proteína A (OapA)	<i>oapA</i>	Todas as cepas de Hi
Proteína P5	<i>ompA</i>	Todas as cepas de Hi

Fonte: KLEMM; SCHEMBRI, 2000; MARRS, et al., 2001; VFDB, 2003.

1.2.2.3 Endotoxina Lipo-oligosacarídeo

O lipopolissacarídeo de *H. influenzae* é conhecido como lipo-oligosacarídeo (LOS), pois incorpora em suas cadeias laterais, oligossacarídeos que contêm resíduos de heptoses adicionados de uma grande variedade de açúcares e derivados como: glicose, galactose, lactose, fosforilcolina (CHOP) e ácido siálico. Esse conjunto de açúcares permite ao organismo imitar estruturas comuns de glicolípídeos eucarióticos, e é provavelmente uma estratégia adaptativa para desestruturar as defesas imunológicas (MARRS, et al., 2001; VFDB, 2003; KONEMAN, et al., 2008). Exemplo dessa característica é que o LOS de muitas cepas de Hi apresenta-se siliado, assemelhando-se em nível antigênico e estrutural, aos oligossacarídeos siliados de esfingolípídios glicolados humanos, o que ajuda o micro-organismo a escapar da opsonização e fagocitose.

Os lipo-oligosacarídeos são os maiores glicolípídios expressos em bactérias Gram-negativas de mucosas, e é análogo aos lipopolissacarídeos (LPS) encontrados em outras famílias de Gram-negativas, possuindo a mesma atividade biológica da endotoxina LPS das enterobactérias. Além disso, outras duas propriedades de virulência como: adesão às células do hospedeiro e resistência ao poder bactericida do soro têm sido atribuídas a estas moléculas. A primeira propriedade é mediada por CHOP e a segunda, pelos resíduos de ácido siálico e galactose (PRESTON, et al., 1996; BERESON, et al., 2005).

1.2.2.4 Imunoglobulina A1 protease

A IgA secretada pelo organismo humano desenvolve várias funções de proteção na superfície da mucosa, que incluem a neutralização de toxinas, inibição da fixação do patógeno ao epitélio e aglutinação dos organismos dentro do muco. Porém Hi e vários outros patógenos constitutivamente secretam IgA1 proteases a fim de superar esta barreira imunológica. Estas enzimas inativam a imunoglobulina A1 humana predominante (IgA1), que é a responsável por mais de 90% da IgA presente na orofaringe. Apesar de uma grande quantidade de cepas HiNT possuírem o gene da IgA protease (> 97%), a atividade dessa enzima é maior em isolados clínicos das amostras de escarro, sangue e LCR do que em cepas

isoladas de orofaringe de portadores assintomáticos (TSUJI, et al., 1989; VFDB, 2003; MURPHY et al., 2011).

1.2.2.5 *Proteínas de Membrana Externa*

Haemophilus influenzae possui de seis a oito proteínas de membrana externa (OMP). As proteínas desse tipo que despertaram maior interesse como antígenos potenciais de vacinas contra HiNT foram as chamadas P2 e P6. A primeira é considerada a principal OMP de Hi, representando mais que 50% dessas proteínas. Ela ocorre na forma de trímero na membrana externa atuando como uma porina. Além disso, o antígeno da P2 permite a evasão do micro-organismo aos anticorpos, contribuindo para o desenvolvimento de infecção crônica (VFDB, 2003; KONEMAN, et al., 2008).

A proteína P6 é uma lipoproteína associada a peptídeoglicano e está presente tanto na superfície de cepas típaveis como também das não típaveis. Em virtude de sua natureza conservada e imunogenicidade demonstrada em animais e seres humanos, a OMP P6 também é um potencial antígeno para uma vacina contra HiNT (VFDB, 2003; BERESON, et al., 2005; MURPHY, et al., 2011).

1.2.2.6 *Obtenção de ferro*

As bactérias não conseguem sobreviver no organismo do hospedeiro sem que possa incorporar ferro, o qual é necessário para síntese de enzimas respiratórias. Dessa forma, as proteínas que participam da obtenção e incorporação do ferro podem ser consideradas como fatores de virulência. As fontes de ferro utilizadas por Hi podem ser a hemoglobina, transferrina e hemopexina. E as proteínas que captam esses compostos podem estar localizadas na membrana externa ou serem secretadas para o meio externo. (VFDB, 2003; TRABULSI; MARTINEZ, 2008).

1.2.2.7 Hemocina

A hemocina é uma bacteriocina presente em mais de 90% das cepas de Hib, não sendo produzidas por cepas de Hi não b e HiNT. As bacteriocinas são proteínas produzidas por várias espécies de bactérias e têm a capacidade de inibir o crescimento de cepas da mesma espécie ou de espécies relacionadas. Desse modo, a hemocina pode contribuir para que cepas de Hib possam competir com cepas de HiNT na colonização da nasofaringe (VFDB, 2003; MARIN; SILVA, 2005).

1.2.3 Patogênese e transmissão

Haemophilus influenzae pode ser encontrado como parte da microbiota normal do trato respiratório superior (TRS) de muitos indivíduos saudáveis, onde são geralmente assintomáticos. Adultos e crianças podem ser portadores, ao mesmo tempo, de mais de um tipo de Hi e a taxa desses organismos pode estar entre 20 e 85%. As cepas HiNT junto com *H. parainfluenzae* representam a maioria da microbiota bacteriana proveniente da faringe e nasofaringe (> 90% de indivíduos saudáveis), e além do trato respiratório superior, esse micro-organismo também pode ser encontrado em menor frequência na conjuntiva e no trato genito-urinário (ERWIN, et al., 2005; LEDEBOER; DOERN, 2011).

Os clones de HiNT presentes no TRS diferem quando os portadores assintomáticos são comparados com aqueles com infecção. Em indivíduos colonizados assintomaticamente, os clones variam continuamente, com colonização durando em média de um a dois meses. No entanto, durante a infecção, um único grupo clonal predomina (LEDEBOER; DOERN, 2011).

A colonização assintomática do TRS por cepas encapsuladas pode ocorrer, porém em índices considerados baixos se comparados às cepas não encapsuladas. Micro-organismos do tipo capsular b representavam de 2 a 5% em crianças saudáveis na era pré-vacinal e 60 % da colonização da orofaringe de crianças em creches. Após a introdução da vacina conjugada contra Hib na década de 1980 a colonização em crianças saudáveis caiu para aproximadamente 0,06% (KONEMAN, et al., 2008; MARTINEZ; TRABULSI, 2008; LEDEBOER; DOERN, 2011). Porém, apesar da colonização por esse sorotipo ser

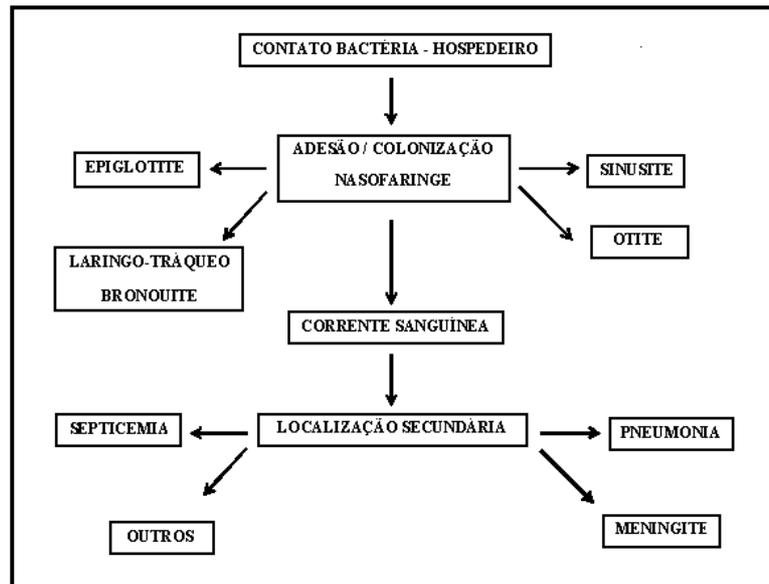
considerada rara, ele pode ser encontrado como parte da microbiota normal, inclusive na sua forma mutante (b-), como relatado por Mukundan e colaboradores (2007).

A infecção por Hi tem início com a colonização das mucosas das vias aéreas superiores. Durante a colonização esse micro-organismo é encontrado na camada mucosa, em locais com células epiteliais não ciliadas em abundância e nos espaços intercelulares do epitélio. Cepas não-tipáveis podem ser encontradas também no interior de macrófagos adenóides. O período de incubação para Hi é pouco entendido e a presença de uma infecção viral anterior ou concomitante pode potencializar a infecção (MARTINEZ; TRABULSI, 2008; LEDEBOER; DOERN, 2011).

Embora Hi se multiplique continuamente no indivíduo colonizado, as doenças somente surgem quando a bactéria se dissemina local ou sistemicamente. Na disseminação local, os sítios de infecção mais comuns são: orelha média (disseminação via tuba auditiva), seios paranasais e trato respiratório inferior (MARTINEZ; TRABULSI, 2008).

Na disseminação sistêmica, a bactéria colonizante invade a mucosa, entra na corrente sanguínea, e devido à característica antifagocítica da cápsula e a ausência de anticorpos anticapsulares, tem a sua proliferação aumentada. Quando a concentração de micro-organismos aumenta, eles podem disseminar para vários sítios, como: sistema nervoso central (meninges), pele, tecido subcutâneo, articulações, pleura, pulmões, brônquios, pericárdio e trato genito-urinário (Figura 7). O que determina o curso da bacteremia e pode influenciar a disseminação são: a presença de anticorpos, de complemento e de células fagocíticas (TRABULSI; TOLEDO, 1991; MARRS, et al., 2001; MARTINEZ; TRABULSI, 2008; LEDEBOER; DOERN, 2011).

Figura 7. Fisiopatologia das infecções por *H. influenzae* tipo b



As defesas do hospedeiro contra uma infecção incluem a ativação da via clássica e alternativa do complemento, e a produção de anticorpos contra a cápsula PRP. O anticorpo para a cápsula de Hib desempenha um papel primário em conferir imunidade. Recém-nascidos tem um baixo risco de infecção, provavelmente devido aos anticorpos adquiridos através do colostro no momento da amamentação. Quando o nível desses anticorpos para antígeno PRP diminui, as crianças adquirem um alto risco para desenvolverem doença invasiva por *H. influenzae*, pois sua resposta imune é baixa, mesmo se anteriormente desenvolveram alguma doença por este agente. Por esse motivo, elas têm um alto risco de repetir infecções, uma vez que os episódios anteriores de Hi não conferem imunidade. Com a idade de cinco anos, a maioria das crianças tem anticorpos adquiridos naturalmente (LEDEBOER; DOERN, 2011).

A transmissão entre indivíduos ocorre pelo contato com gotículas transportadas pelo ar ou por contato direto com as secreções respiratórias infectadas. Desta forma, lugares com aglomeração humana como creches, orfanatos e escolas certamente favorecem a transmissão, e conseqüentemente as infecções invasivas em crianças (MARRS, et al., 2001; MARIN; SILVA, 2005; BRASIL, 2010).

1.2.4 Significância clínica e epidemiologia

As infecções causadas pelo *H. influenzae* têm sido divididas basicamente em dois grupos: infecções causadas pelas cepas do sorotipo b e infecções causadas pelas cepas não-tipáveis e de outros sorotipos. (MARTINEZ; TRABULSI, 2008)

As cepas encapsuladas, especialmente as do sorotipo b (Hib), eram responsáveis por mais de 95% das doenças invasivas causadas por *H. influenzae* em crianças e pela metade das doenças invasivas em adultos, incluindo: meningite, epiglote, pneumonia, celulite (bochecha e região orbital), artrite séptica (geralmente de uma das grandes articulações), bacteremia e infecções menos comuns como: endoftalmite, infecção do trato urinário, abscessos, adenite cervical, glossite, osteomielite e endocardite (LOUNG, et al., 2004; MARTINEZ; TRABULSI, 2008; LADHANI, 2012).

As principais doenças infantis causadas por este sorotipo são pneumonia, meningite e bacteremia. Antes da vacinação estima-se que Hib foi responsável por cerca de três milhões de doenças graves e 386.000 mortes por ano em todo mundo, principalmente por meningite e pneumonia, com 95% dos casos e 98% das mortes ocorrendo em pacientes em países em desenvolvimento. Dessas enfermidades, a meningite destacou-se como a mais importante, pois até a década de 1990 foi a causa mais frequente de meningite bacteriana em crianças levando à morbidade e mortalidade significantes em grande parte do mundo (TRISTAM; JACOBS; APPELBAUM, 2007; LADHANI, 2012) . A taxa de mortalidade por essa enfermidade em crianças em países desenvolvidos era de 5% a 10% e até um terço dos sobreviventes desenvolveram complicações neurológicas de longo prazo incluindo surdez neurossensorial, paralisia cerebral e epilepsia (LADHANI, 2012).

Nos Estados Unidos, no final da década de 1980, a incidência anual de infecções causadas por essa bactéria estava na faixa de 67 a 129 casos por 100.000 em crianças de até 5 anos de idade, sendo 50% dos casos ocorridos em crianças com idade inferior a 2 anos (DE ALMEIDA; MARZOCHI, 2006). No Brasil, no período anterior à introdução da vacina (1990 – 1999), o número de casos registrados de meningite bacteriana causada pelo Hib em crianças de até 1 ano de idade foi de 22.3 casos/100.000 indivíduos e em crianças de até 4 anos de idade foi de 8.8 casos/100.000 indivíduos. A taxa de letalidade nestes grupos foi de 19,9% e 17,1% respectivamente. Em adultos, a principal doença causada pelo tipo sorológico b é a pneumonia adquirida na comunidade (TRISTAM; JACOBS; APPELBAUM, 2007; ADAM, 2010).

O risco de morte em infecções por Hi, no entanto, felizmente, tornou-se extremamente raro em países desenvolvidos desde o desenvolvimento e introdução da vacina pediátrica conjugada contra Hib, pois esta, não extinguiu, mas proporcionou uma diminuição significativa deste agente. *Haemophilus influenzae* tipo b ainda aparece como causador de infecções invasivas diversas (ADAM, 2010), estando nas crianças com até três anos de idade a maior porcentagem dos indivíduos infectados, caracterizando essa população como altamente susceptível à colonização pelo Hi. Porém, quando as infecções causadas por Hib ocorrem hoje, geralmente são em crianças não vacinadas ou com o esquema de vacinação incompleto, e em adultos que sofreram algum tipo de traumatismo craniano ou possuem alguma doença de base (PELTOLA, 2000; BENDER, et al., 2010; LEDEBOER; DOERN, 2011).

As cepas não tipáveis, bem como os outros sorotipos, são responsáveis, na sua maioria, por infecções do trato respiratório. No entanto, HiNT vêm merecendo atenção epidemiológica pelo aumento na frequência com que estão causando doenças invasivas, inclusive em adultos (WARD, 1996; PERIC, et al., 2003; RUBACH, et al., 2011). Esse micro-organismo é uma importante causa de conjuntivite, otite média aguda, sinusite aguda, exacerbação bacteriana aguda de bronquite crônica, pneumonia (adquirida na comunidade) e septicemia (neonatal e maternal). Além destas infecções, as amostras não-tipáveis podem ser a causa de infecções invasivas e infecções pulmonares em pacientes portadores de processos pulmonares crônicos (LEDEBOER; DOERN, 2011). As infecções pelas cepas não-tipáveis são frequentemente precedidas por estados gripais (MARTINEZ; TRABULSI, 2008).

Pessoas com risco para infecções sistêmicas por HiNT incluem fumantes, e também aquelas com doença pulmonar obstrutiva crônica, infecção viral, infecção bacteriana recorrente e alterações fisiológicas, fibrose cística, asplenia funcional ou anatômica, anemia falciforme, deficiências de complemento, doença de Hodgkin's, hipogamaglobulinemia adquirida ou congênita, e com estados de imunodeficiência de células T, como por exemplo, infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV).

1.2.5 Diagnóstico laboratorial e métodos de tipificação

1.2.5.1 Exames microscópicos: bacterioscopia direta e pós-cultura

Sempre que possível a bacterioscopia do material clínico deve ser realizada. A presença de células sugestivas de Hi (pequenos cocobacilos Gram-negativos pleomórficos, com formas filamentosas ou em bastão, cocobacilares e cocoides), após coloração de Gram, indica uma possível infecção por este agente, direcionando dessa forma, os próximos passos a serem tomados pelo microbiologista para identificação deste micro-organismo. Porém, a certeza da identificação só poderá ocorrer após cultura, ou por métodos moleculares.

Após crescimento em meio de cultura, o exame microscópico, agora da colônia, deverá ser realizado a fim de se confirmar o resultado obtido na bacterioscopia direta.

1.2.5.2 Cultura

O ágar-chocolate (ágar sangue aquecido a 70°C, o que o torna escurecido recebendo o nome de chocolate) é o meio mais indicado para o crescimento de Hi “*in vitro*”, pois a adição de sangue ao ágar base fundido e aquecido resulta na lise dos eritrócitos, e na liberação dos fatores X e V para o meio de crescimento, os quais são requeridos por Hi. A presença de uma atmosfera com 5 - 10% de CO₂, e uma temperatura de 35 - 37°C, por um tempo de incubação 16 - 48 h, favorecem também a cultura dessas bactérias “*in vitro*”, já que estes micro-organismos são anaeróbios facultativos (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2011).

Na falta de ágar chocolate, poderá ser feito o teste de satelitismo, onde o material clínico poderá ser semeado junto com *Staphylococcus aureus* em ágar sangue. As colônias de *Haemophilus influenzae* crescerão ao redor das colônias de *S. aureus*, este micro-organismo produzirá o fator V, além de causar hemólise no ágar sangue liberando o fator X, ambos necessários para o crescimento de Hi (KONEMAN, et al., 2001).

1.2.5.3 *Requerimento de fatores de crescimento, produção de hemólise e testes bioquímicos*

O fator X (hemina) e o fator V (NAD) são requeridos de forma combinada por *Haemophilus influenzae*, o que, desta forma, diferencia essa espécie de outras do mesmo gênero. O teste de necessidade desses fatores consiste em colocar discos de papel impregnados com os V, X ou VX, na superfície de um meio de cultivo deficiente de qualquer fator, previamente semeado com a suspensão bacteriana a ser identificada. O resultado será positivo para Hi se o micro-organismo analisado apresentar crescimento somente ao redor do disco impregnado com os fatores V e X combinados (KONEMAN, et al., 2001).

Algumas espécies de *Haemophilus* são produtoras de hemólise em ágar suplementado com sangue de cavalo. Essa característica também pode ser utilizada para diferenciar espécies desse gênero, pois nem todas produzem hemólise, como, por exemplo, as cepas de Hi.

Alguns testes bioquímicos para identificação de Hi são os de fermentação em caldo dos carboidratos - glicose, sacarose, lactose, manose, frutose, ribose e xilose – em uma base contendo vermelho de fenol como indicador de pH, suplementada com hemina, NAD e menadione. Os caldos são incubados 35-37°C por 24 horas, e as cepas pertencentes à *H. influenzae* fermentam somente a glicose e xilose (CAMPOS, 1999; LEDEBOER; DOERN, 2011). A produção de catalase e oxidase são também testes bioquímicos utilizados na identificação da espécie em questão (ANEXO A).

1.2.5.4 *Sorotipificação*

A sorotipificação pode ser realizada por teste de aglutinação (soroaglutinação ou sorologia) ou por métodos moleculares.

O teste de soroaglutinação ou sorologia baseia-se na aglutinação do complexo antígeno-anticorpo formado pelo polissacarídeo capsular da bactéria (antígeno) e o anticorpo específico presente no antissoro. Para *Haemophilus influenzae* são utilizados seis antissoros comerciais que reagem com os diferentes polissacarídeos capsulares (a-f). A aglutinação com um desses antissoros identificará o tipo de cepa Hi encapsulada, e a não aglutinação com nenhum dos seis antissoros confirmará a cepa como HiNT (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2011; LEDEBOER; DOERN, 2011).

Um dos métodos moleculares utilizados para sototipificação é a *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR), que utiliza iniciadores específicos (“*primers*”) que são utilizados para amplificação de fragmentos de DNA, que irão identificar e diferenciar, no caso de *H. Influenzae*, as cepas encapsuladas das não encapsuladas, os diferentes tipos capsulares, bem como as cepas que sofreram rearranjo genético do locus *cap* (DE ALMEIDA; MARZOCHI, 2006; CERQUETTI, 2013). Os *primers* empregados na PCR para Hi foram descritos pelos pesquisadores van Ketel e colaboradores (1990) e Falla e colaboradores (1994), os quais descreveram além de iniciadores específicos para determinar a espécie Hi, *primers* para cada um dos seus seis tipos capsulares.

A PCR é considerada o método de referência para a determinação dos tipos capsulares como confirmação do método sorológico e também permite diferenciar amostras de cepas com deficiência capsular (b-) de amostras consideradas não tipáveis, as quais são indistinguíveis pela sorologia (DE ALMEIDA; MARZOCHI, 2006; CERQUETTI, 2013).

1.2.5.5 Biotipificação

A biotipificação é baseada nos resultados diferenciais das reações bioquímicas de indol, urease e ornitina decarboxilase de acordo com Kilian (1976), levando a oito biotipos diferentes (I-VIII) (Tabela 2), o que faz com que esse método tenha um grande valor epidemiológico (MARRS, et al., 2001; DE ALMEIDA, MARZOCHI, 2006). No entanto, a biotipificação não revela a estrutura populacional, a relação genética entre as linhagens, que estão sujeitas a variações fenotípicas e não fornecem também qualquer dado de origem clonal. Dessa forma, é importante que se tenha uma complementação por métodos moleculares, sobretudo os de tipificação molecular (LANCELLOTTI, et al., 2008; ULANOVA; TSANG, 2009).

1.2.5.6 Métodos de tipificação molecular

Ao contrário dos métodos tradicionais, os métodos de tipificação molecular podem levar à biologia da população e informação sobre a estrutura genética. Dessa forma, vários

desses métodos foram propostos para tipificação de *H. Influenzae* tais como: *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), Ribotipagem (tipagem dos genes de RNAr), *enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) typing*, *multilocus variable number tandem repeats analysis* (MLVA), *multilocus sequence typing* (MLST), *variable number tandem repeats (VNTR) typing e pulsed-field gel electrophoresis analysis* (PFGE) (LANCELLOTTI, et al., 2008; ULANOVA; TSANG, 2009; CERQUETTI, 2013). Desses métodos alguns não estão sendo muito utilizados para caracterização de Hi. O MLEE, por exemplo, é um deles, provavelmente por requerer um trabalho laboratorial intensivo levando, no entanto, a uma baixa produção (LANCELLOTTI, et al., 2008; ULANOVA; TSANG, 2009; CERQUETTI, 2013).

A análise por PFGE, dentre os métodos de tipificação anteriormente citados é uma ferramenta discriminatória poderosa para distinção entre cepas de *H. influenzae* e, até o presente, é considerado “padrão ouro” para tipificação de micro-organismos dessa espécie (PETTIGREW, et al., 2002; MAGALHÃES, et al., 2005; CERQUETTI, 2013). Essa técnica é realizada com o intuito de se comparar os padrões de DNA genômico e discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie. Para isso, o DNA bacteriano total, incorporado em bloco de agarose, é digerido com enzima de restrição de corte raro que cliva o cromossomo em grandes fragmentos, os quais são então, são separados por eletroforese de campo pulsado, levando a um padrão de bandas característico (MAGALHÃES, et al., 2005).

As enzimas de restrição usadas para Hi são: *SmaI*, *ApaI*, *NaeI*, e *EagI*. Essas enzimas produziram distribuições de tamanhos de fragmentos de DNA úteis para o mapeamento do genoma de Hi por PFGE. Porém, a enzima *SmaI* é a mais utilizada, uma vez que produz um menor número de fragmentos, com a exceção das cepas do tipo e cuja enzima frequentemente empregada é a *ApaI* (CERQUETTI, 2013).

Muitas pesquisas sobre *H. influenzae* têm utilizado PFGE. Entre elas incluem-se estudos sobre: transmissão contínua de doença por Hib com diferentes abordagens, monitoramento de isolados de Hib de vacinados, caracterização de isolados não b invasivos na era pós-vacinal, portadores de *H. influenzae* e colonização (CERQUETTI, 2013).

1.2.6 Tratamento e Profilaxia

1.2.6.1 Antibióticos e resistência bacteriana

O antibiótico de escolha, bem como a duração do tratamento para infecções por qualquer micro-organismo patogênico irá depender do sítio infectado e da gravidade da doença causada por este agente. Para o tratamento das infecções causadas por *H. influenzae* os antibióticos de escolha são os β -lactâmicos, os quais incluem: penicilinas e seus derivados, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e β -lactâmicos associados a inibidores de β -lactamase (ROSSI, 2005; KONEMAN, et al., 2008).

Nos países onde a vacina contra Hib ainda não é utilizada, é recomendado pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América, o tratamento das meningites causadas por este agente em crianças menores que sete anos, com o uso empírico de vancomicina adicionada de uma cefalosporina de amplo espectro como cefotaxima ou ceftriaxona, e como terapias alternativas, cloranfenicol, cefepime e meropenem. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda que o tratamento de meningites causadas por *H. influenzae* seja realizado com o uso de ceftriaxona ou cloranfenicol (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; BRASIL, 2010a).

Em situações em que a cepa causadora da doença é suscetível à ampicilina este antibiótico é recomendado como terapia padrão, adicionado a uma cefalosporina de amplo espectro, cefepime ou cloranfenicol, estes como antibióticos alternativos. Para cepas resistentes à ampicilina, o tratamento deve ser com uma cefalosporina de amplo espectro, cefepime ou cloranfenicol, como alternativos. Para pacientes adultos, uma fluoroquinolona como gatifloxacina ou moxifloxacina, pode ser adicionada à lista de antibióticos alternativos (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; BARBOSA, et al., 2011).

As infecções associadas às cepas de HiNT como: bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica e otite média, frequentemente são tratadas com ampicilina ou amoxicilina (quando estas apresentam-se sensíveis), ou com macrolídeos orais, sulfonamidas ou fluoroquinolonas, quando estas apresentam resistência aos dois antibióticos anteriormente citados (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; KONEMAN, et al., 2008).

Apesar dos β -lactâmicos, como a ampicilina, serem utilizados como terapia padrão, desde o começo da década de 1970, cepas resistentes a estes compostos têm emergido e se

propagado (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; MARTINEZ, TRABULSI, 2008; BARBOSA, et al., 2011).

Em Hi, a resistência à ampicilina e outros β -lactâmicos é devido principalmente a dois mecanismos: um enzimático e o outro não enzimático. O primeiro é caracterizado produção de enzimas chamadas de β -lactamases, que hidrolisam a região amida do anel β -lactâmico de análogos da penicilina, inativando dessa forma, o antibiótico. As cepas de Hi podem produzir dois tipos de β -lactamases TEM-1 e ROB-1, e ambas as enzimas são associadas a plasmídeos, e são produzidas em grande quantidade (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; MARTINEZ, TRABULSI, 2008; BARBOSA, et al., 2011).

O segundo mecanismo se caracteriza pela diminuição da afinidade de β -lactâmicos por Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP), alteradas. As cepas resistentes por este mecanismo são chamadas de cepas ampicilina resistentes não produtoras de β -lactamases (*β -lactamases-non-producing ampicillin-resistant-BLNAR*) e têm sido cada vez mais descritas em todo o mundo (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; BARBOSA, et al., 2011).

As cepas de Hi podem ainda possuir os dois mecanismos anteriores juntos, ou seja, podem produzir β -lactamases e, além disso, possuir PBPs alteradas. A presença desses dois mecanismos na mesma cepa pode resultar em um fenótipo que se caracteriza pela resistência ou diminuição da susceptibilidade para amoxicilina / ácido clavulânico e as cepas com essa particularidade são definidas como cepas resistentes à amoxicilina / ácido clavulânico positivas para β -lactamases (*β -lactamase-positive amoxicillin / clavulanic acid-resistant – BLPACR*). Elas parecem estar aumentando desde sua primeira descrição nos EUA (BARBOSA, et al., 2011).

Isolados de *H. influenzae* produtores de β -lactamase permanecem suscetíveis às cefalosporinas e carbapenêmicos orais e parenterais, e também são suscetíveis à combinação de agentes nos quais um inibidor de β -lactamase, tal como clavulanato, sulbactam ou tazobactam, está combinado com um agente β -lactâmico. Exemplos: amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, e piperacilina-tozobactam (LEDEBOER; DOERN, 2011).

Entre os outros antibióticos que são relevantes para o tratamento de infecções por Hi, a resistência à sulfametaxazol-trimetoprim (SUT), entre as cepas dessa espécie é comum, e ocorre devido ao aumento na produção da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) com afinidade alterada para o trimetoprim. A taxa de resistência para SUT é de aproximadamente 20%, sendo este o segundo antibiótico, cujas cepas de Hi são mais resistentes. Em alguns países da Ásia, 60% das prescrições de SUT foram principalmente para otite média. Enquanto que na Finlândia este antibiótico foi prescrito em 81% para infecções respiratórias e 15% para

infecções urinárias (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; MOHD-ZAIN, et al., 2012).

No Brasil, no ano de 2011, houve 26% de resistência ao sulfametaxazol-trimetoprim. Porém, este antibiótico ainda é indicado para infecções do trato urinário, altas e baixas, uretrites e prostatites agudas ou crônicas, otite média, sinusite e exacerbação aguda de bronquite crônica como alternativa para pacientes alérgicos aos β -lactâmicos. É a primeira escolha para o tratamento e profilaxia da pneumonia por *Pneumocystis carinii* nos pacientes portadores de alguma imunodepressão, além de ser utilizado contra infecções por outros micro-organismos (ANVISA, 2007; WASHINGTON, 2012).

Apesar de todas essas indicações, esse antibiótico tem sido menos recomendado no tratamento empírico das infecções mais graves, devido à frequência cada vez maior de germes resistentes (ANVISA, 2007).

A taxa de resistência para cefalosporinas, macrolídeos, fluoroquinolonas, e tetraciclina orais e parenterais, permanece em níveis menores que 1% (TRISTRAM, JACOBS, APPELBAUM, 2007; LEDEBOER; DOERN, 2011).

1.2.6.2 Quimioprofilaxia

A quimioprofilaxia está indicada, em caso de meningite, para todos os contatos domiciliares, incluindo os adultos, desde que existam menores de quatro anos de idade, sem vacinação ou com o esquema de vacinação incompleto, além do indivíduo enfermo. Se o tratamento do doente com meningite for instituído com ceftriaxona nas doses indicadas, não é necessária a profilaxia do caso antes da alta (quimioprofilaxia de alta) (BRASIL, 2010).

O antibiótico de escolha, no caso de indicação à quimioprofilaxia é a rifampicina, por via oral. Essa droga age eliminando as células de Hi da orofaringe, erradicando o estado de portador, e, portanto, impedindo a transmissão do agente causador da doença (KONEMAN, et al., 2008).

Segundo o Ministério da Saúde (MS) a rifampicina deve ser administrada por quatro dias nas seguintes dosagens: adultos 600mg/dose, a cada 24h; crianças de um mês a 10 anos: 20mg/Kg/dia, até dose máxima de 600mg; menores de um mês de idade: 10mg/Kg/dia.

1.2.6.3 Vacina contra Hib

Antes do uso generalizado da vacina conjugada em 1990, estimava-se que 27 mil casos anuais de meningite nos países desenvolvidos e 330.000 nos países em desenvolvimento eram causados por Hib (PELTOLA, 2000; MARRS, et al., 2001). Porém a preocupação na comunidade científica, com uma vacina eficaz, já acontecia em 1960. Passou-se a investir no polissacarídeo capsular do sorotipo b de *H. Influenzae*, que foi reconhecido como um dos principais fatores de virulência da doença invasiva. Com isso, vários estudos tiveram o tipo de cápsula b como foco principal para o desenvolvimento de uma vacina.

Em 1977, um estudo prospectivo realizado na Finlândia, onde se utilizava a cápsula tipo b purificada ou poli-ribosil-ribitol fosfato (PRP) como vacina, demonstrou uma eficácia de 90% em crianças de 18-71 meses (PELTOLA, 2000; MARRS, et al., 2001). Porém, em crianças mais novas, essa vacina revelou-se ineficaz, pois a natureza do antígeno da mesma era célula-T independente e conseqüentemente incapaz de induzir uma memória, ou um reforço da resposta imune. Ao se conjugar o PRP à proteínas carreadoras, conseguiu-se resolver esse problema. O antígeno (PRP simples) que induzia uma resposta T independente, com a conjugação, passou a induzir uma resposta T dependente, conferindo uma imunogenicidade maior.

Atualmente, quatro tipos de vacinas conjugadas contra Hib são licenciadas no mundo. Todas elas utilizam o mesmo princípio imunogênico variando apenas quanto ao tipo de carreador protéico que pode ser: toxóide diftérico (PRP-D), toxina diftérica mutante atóxica CRM₁₉₇ (PRP-HbOC), toxóide tetânico (PRP-T) e proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (PRP-OMP). Além das vacinas conjugadas, as vacinas combinadas têm sido utilizadas em todo o mundo, pois esse tipo de imunobiológico traz benefícios como: facilidade de administração, redução de dor e do medo nas crianças, além de diminuir o número de idas aos serviços de saúde, contribuindo para o alcance elevado das coberturas vacinais (MARRS, et al., 2001; DE ALMEIDA; MARZOCHI, 2006; LADHANI, 2012; MS, 2012)

No Brasil, a vacina contra Hib conjugada com o toxóide tetânico foi introduzida no Programa Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde em agosto de 1999. Este programa vem buscando adotar estratégias, visando à inclusão de novas vacinas ou a combinação de vacinas já existentes nos calendários de vacinação. Exemplos são: a introdução da vacina tríplice viral (sarampo, rubéola e caxumba) desde 2002 e da tetravalente

(difteria, tétano, coqueluche e *Haemophilus influenzae* tipo b), em 2003. Esse último imunobiológico tem apresentação na forma de líofilo, o que facilitou a combinação com a vacina contra difteria, tétano e pertussis, que, sendo apresentada na forma líquida, funciona como diluente. Esses dois produtos são produzidos pelos Institutos Bio-Manguinhos/Fiocruz e Butantan respectivamente, ambos pertencentes ao parque nacional de produtos biológicos (DE ALMEIDA & MARZOCHI, 2006; BRASIL, 2012).

Em 2010, o MS por meio do PNI, a fim de ampliar o calendário básico de vacinação da criança, introduziu a vacina conjugada pneumocócica 10-valente para imunização ativa de crianças de dois meses a < 24 meses, contra doença invasiva e otite média aguda, causadas por *Streptococcus pneumoniae*. Essa vacina é constituída por 10 (dez) sorotipos de pneumococos (1, 4, 5,6B,7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) e para oito de seus sorotipos, é conjugada com a proteína D de *Haemophilus influenzae* NT e carreadores de toxóide diftérico (DT). Para os outros dois sorotipos é conjugada com o toxóide tetânico (TT ou T) (BRASIL, 2010).

A proteína D (PD) é uma lipoproteína associada à membrana externa, com 42 kDa, altamente conservada, e encontrada em todos *Haemophilus influenzae* incluindo os não tipáveis. Ela é um fator de virulência que possui atividade glicerofosfodiester fosfodiesterase, levando à libertação de fosforilcolina a partir de células epiteliais hospedeiras (TOROPAINEN, et al., 2008)

Segundo Pelton e colaboradores (2013) em um estudo clínico para avaliar a capacidade da proteína D conjugada em conferir proteção contra HiNT da nasofaringe de portador, em uma população de crianças, demonstrou proteção periférica. Dessa forma, espera-se que ao diminuir o número de portadores com a utilização da vacina 10-valente, se diminua, também, os casos de doenças causadas pelos Hi não tipáveis (BRASIL, 2010, PELTON et al, 2013).

Outra vacina introduzida no calendário infantil pelo o Sistema Único de Saúde (SUS) no segundo semestre de 2012 foi a vacina pentavalente. Ela previne contra difteria, tétano, *pertussis*, hepatite B e meningites causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b, substituindo, portanto a vacina tetravalente. Inicialmente, esta vacina foi administrada em crianças com menos de sete anos de idade que estavam iniciando ou completando esquema de vacinação (BRASIL, 2012).

O esquema de vacinação para a vacina pentavalente no Brasil consiste na aplicação de três doses, com intervalo de 60 dias (mínimo de 30 dias), a partir de dois meses de idade. Os dois reforços necessários são realizados com a vacina DTP (difteria, tétano *pertussis*), o

primeiro reforço aos de 15 meses de idade e o segundo reforço aos quatro anos. A idade máxima para aplicação da DTP é de seis anos 11 meses e 29 dias. Além disso, faz parte deste esquema, para os recém-nascidos, a primeira dose nas primeiras 24 horas, preferencialmente nas primeiras 12 horas, com a vacina hepatite B (recombinante) (BRASIL, 2012).

3.2.7 Situação atual

Poucas vacinas na história induziram um declínio tão acentuado na incidência de doenças invasivas causadas por um agente, em um período de tempo tão curto e em âmbito mundial, como as vacinas conjugadas contra Hib. A capacidade dessas vacinas em prevenirem a colonização da nasofaringe por Hib na maioria das vezes, em parte, explica os bons resultados, pois essa característica contribui para diminuir a transmissão e leva a uma proteção indireta, a chamada “imunidade de rebanho” (PELTOLA, 2000; KASTRIN, et al., 2010; SHIMOL; DAGAN, 2012).

Nos EUA após a introdução da vacina contra Hib, licenciada em 1987, o número de casos de doenças invasivas por Hib diminuiu 99%, e os casos anuais de meningites em crianças menores que cinco anos caiu rapidamente de mais de 10 mil casos para menos de 100 casos por ano (RIBEIRO, et al., 2007; JACUPS, 2011). Um sucesso semelhante ocorreu em outros países que desenvolveram um programa de vacinação para Hib, tais como Canadá (redução de casos de 97% desde a introdução da vacina em 1988) e Inglaterra, cuja redução foi de 90% desde a introdução em 1992 (HARGREAVES, et al., 1996; NACI, 2006; ADAM, et al., 2010).

Na América Latina, o uso da vacina conjugada contra Hib também trouxe benefícios. O Chile, que foi o primeiro país a mostrar os resultados positivos com esse tipo de vacina, teve um declínio no número de doenças por Hib de 90%. No Uruguai a incidência de meningites causadas por Hib em crianças menores que cinco anos caiu de 17-22% em 1992 e 1993 para 1% em 1995 e 1996 (PELTOLA, 2000).

No Brasil a vacina conjugada contra Hib foi implementada como rotina no Programa Nacional de Imunizações (PNI) em 1999, em crianças menores que um ano de idade. Dados parciais em 2001 mostraram uma redução dos casos de meningites causadas por Hib em 83%, passando de 1368 casos em 1999 para 234 casos em 2001 (DE ALMEIDA, et al., 2005).

Apesar dos ótimos resultados obtidos com implementação da vacina conjugada contra Hib, atualmente temos outro cenário nas doenças causadas por essa espécie. Estudos têm mostrado que após a introdução da vacina supracitada a incidência de doenças invasivas causadas por *H. influenzae* não b e NT têm aumentado inclusive no Brasil (DE ALMEIDA, et al., 2005; TSANG, et al., 2007; ZANELLA, et al., 2011; LIVORSI, et al., 2012).

A caracterização dessas doenças na era pós-vacinal têm sido realizada em vários países que adotaram um programa de vacinação contra Hib, e grande parte dos resultados obtidos com esses estudos apontam, atualmente, para o HiNT como o principal causador de doenças invasivas, bem como para as cepas encapsuladas de ambos sorotipos a e f (DE ALMEIDA, et al., 2005; TSANG, et al., 2007; LANCELLOTTI, et al., 2008; KASTRIN, et al., 2010; MOJGANI, et al., 2011). Além desses sorotipos, trabalhos têm identificado também como causadores de doenças graves, os mutantes de Hia e Hib deficientes de cápsula (a- e b-). Nos Estados Unidos e no Brasil, casos com estes mutantes sendo isolados em dois materiais clínicos (LCR e sangue) provenientes do mesmo paciente foram descritos (OHKUSU, et al., 2005; LIMA, et al., 2010, CALDEIRA, et al., 2013).

Outra mudança no cenário das doenças causadas por Hi é a faixa etária. Enquanto na era pré-vacinal a faixa etária alvo desse micro-organismo era basicamente de crianças menores que cinco anos, atualmente pesquisas têm mostrado um aumento em doenças invasivas causadas por esse agente em indivíduos com idade acima de 60 anos (DWORKIN; PARK; BORCHARDT, 2007; RESMAN, et al., 2011; ZANELLA, et al., 2011).

Além das mudanças na epidemiologia de *H. influenzae*, trabalhos recentes chamam a atenção para falhas vacinais, as quais podem levar à re-emergência de doenças invasivas causadas por Hib. Segundo Aracil e colaboradores (2006) houve um aumento no número de casos de doença invasiva causada por Hib em crianças vacinadas no Reino Unido em 2003. Esse aumento não foi causado por isolados pertencentes a um genótipo específico ou novo, mas sim por genótipos que já circulavam na era pré-vacinação, antes de vacinas conjugadas contra o Hib estarem disponíveis, o que caracteriza então, a falha vacinal. Nesse caso, houve a necessidade de modificação do tipo de vacina utilizada e um reforço em 2006 para que houvesse novamente uma diminuição nos casos de doenças invasivas por Hib (LADHANI, 2012).

Somando-se aos fatos, Batalha e colaboradores (2010), em estudo utilizando isolados clínicos de Hi do Brasil, sugerem que provavelmente está ocorrendo uma mudança gradual do gene capsular dos micro-organismos dessa espécie e que novas variantes podem estar emergindo entre as cepas brasileiras, o que poderia levar também a uma falha vacinal, visto

que mudanças na cápsula poderiam interferir na imunidade conferida pela vacina hoje utilizada.

Dessa forma, é estritamente necessário que as doenças causadas por Hi sejam acompanhadas e que dados sobre os sorotipos com maior frequência nessas enfermidades sejam obtidos. Porém, poucos estudos sobre a situação de Hib e dos outros sorotipos têm sido publicados no Brasil (DE ALMEIDA, et al., 2005). Exemplo dessa situação é a falta de dados sobre Hi em áreas brasileiras, sobretudo no estado e município do Rio de Janeiro.

De acordo com Pereira (2010), no Boletim Informativo do Diagnóstico Laboratorial das Meningites Bacterianas 2010, o estado do Rio de Janeiro no primeiro trimestre do ano em questão, não teve seus dados informados e nos outros trimestres não apresentou isolados de meningite identificados como *H. influenzae* (Tabela 2).

Dados obtidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) mostram que no período entre 2001 e 2012 houve 53 casos de meningite por *Haemophilus influenzae* no município do Rio de Janeiro (Figura 8). Desses casos, 20 foram confirmados com a cultura dos materiais clínicos, 29 por aglutinação em látex, dois por outras técnicas não citadas e outros dois não tinham essa informação (BRASIL, 2013).

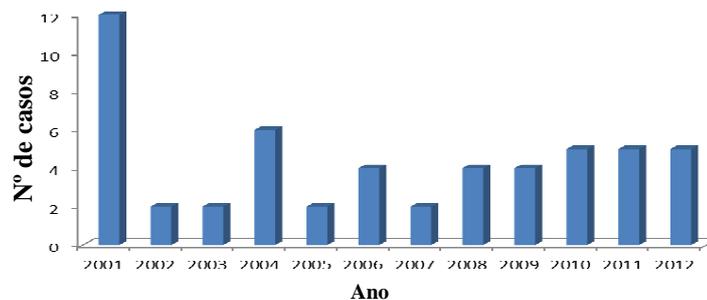
Tabela 2. Meningites causadas por *H. influenzae* em diferentes regiões do Brasil no ano de 2010.

Regiões e estados brasileiros	2010				Total	
	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre		
Norte	AM	0	0	2	...	2
	AP	0	3	6	0	9
	RR	0	0	0	0	0
	RO	0	...	0
	AC
	PA	0	0	0	0	0
	TO	0	1	1
Nordeste	PB	0	0	0	0	0
	RN	0	...	0
	BA	7	...	7
	PE	1	2	3
	CE	4	...	4
	AL
	PI
	SE	0	0	0	0	0
	MA
Sudeste	MG	0	...	0
	SP
	RJ	...	0	0	0	0
	ES	1	1
Centro-Oeste	DF	1	1	2	5	9
	GO	0	1	2	2	5
	MT	0	0	0
	MS	0	0	0
Sul	SC	0	2	3	0	5
	PR
	RS
Total	1	7	27	11	46	

(...) Dados não informados

Fonte: PEREIRA, 2010.

Figura 8. Variação anual do número de casos de meningite no município do Rio de Janeiro.

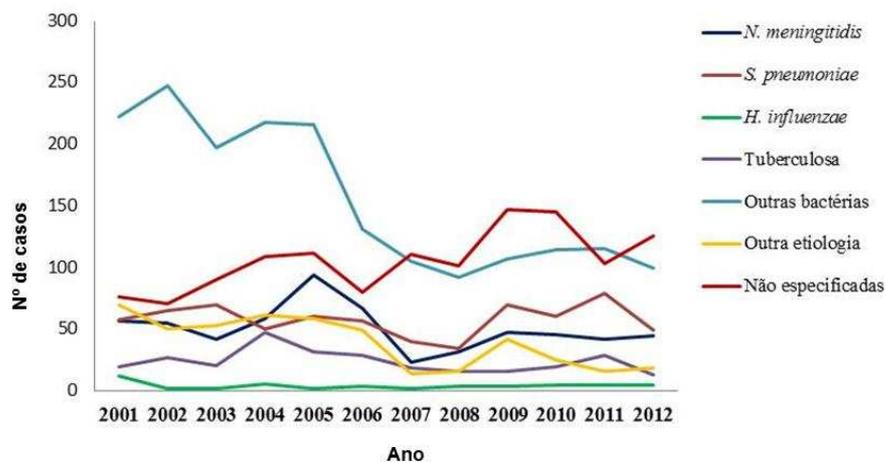


Fonte: BRASIL, 2013.

Apenas o sorotipo b teve a sua frequência determinada, já que a aglutinação em látex só identifica esse sorotipo. Dessa forma, 24 casos não citaram o sorotipo causador da meningite, o que não permite saber a situação desses sorotipos como causadores dessa enfermidade.

Ainda em relação à identificação, os dados mostrados apresentam-se questionáveis quanto à etiologia bacteriana dos casos de meningite. Isso pelo fato de que em muitas ocasiões, o agente causador não é identificado corretamente, ou simplesmente não é identificado, o que leva a um alto número de meningites não especificadas, o qual mostrou um aumento a partir do ano de 2009 no Rio de Janeiro, de acordo com a Figura 9 (BRASIL, 2013).

Figura 9. Variação das meningites bacterianas, em todas as faixas etárias, conforme a etiologia do agente causador.



Fonte: BRASIL, 2013

Outro problema com os poucos dados apresentados é a confiabilidade. Os dados do Sinan e os dados fornecidos pelo Boletim Informativo do Diagnóstico Laboratorial das Meningites Bacterianas (2010) são contraditórios. No boletim supracitado, o Estado do Rio de Janeiro não apresenta cepas de meningite identificadas como Hi em 2010. Porém, pelo Sinan, houve cinco casos de meningite por este agente, sendo três deles confirmados por cultura e dois por aglutinação em látex (Figura 8).

4 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e difusão do uso de vacinas conjugadas do polissacarídeo de *H. influenzae* tipo b (Hib) é considerado um grande avanço na saúde pública mundial. No Brasil, este tipo de vacina foi introduzido no calendário de rotina do Programa Nacional de Imunizações (PNI) em agosto de 1999, sendo um marco para a saúde pública brasileira.

Observamos que após a utilização da vacina conjugada contra Hib, houve um declínio acentuado na incidência de doenças invasivas causadas por este agente; revelando, portanto, um impacto positivo desta vacina no Brasil. Porém, por ser uma vacina sorotipo-específica, conferindo imunidade apenas para o sorotipo b, faz-se necessário que haja uma vigilância epidemiológica dos Hi circulantes em isolados clínicos, pois relatos de infecções sistêmicas tendo como agente Hi não b e cepas HiNT, têm aumentado em frequência, inclusive em adultos. Além disso, re-emergência de doenças causadas por Hib em crianças vacinadas, casos de falha vacinal, e alteração gradual do gene capsular dos micro-organismos dessa espécie têm sido temas de publicações que corroboram para a importância desse monitoramento.

Apesar da necessidade do acompanhamento desse micro-organismo como causador de doenças, poucos são os dados publicados no Brasil sobre a situação de Hi na era pós-vacinal, incluindo a cidade do Rio de Janeiro, a segunda cidade brasileira com maior população.

Dessa forma, levando-se em conta que o campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS) engloba a execução de ações de vigilância sanitária; vigilância epidemiológica; saúde do trabalhador; e assistência terapêutica integral, inclusive farmacêutica; e que a vigilância epidemiológica oferece subsídios às autoridades sanitárias para a implementação de respostas rápidas dirigidas ao controle de problemas de saúde e riscos específicos, faz-se necessário que se estabeleça um sistema de vigilância epidemiológica capaz de detectar e investigar rapidamente casos de doenças invasivas causadas por *H. influenzae* no Brasil na era pós-vacinal, a fim de se monitorar a eficácia das vacinas conjugadas contra esse micro-organismo, bem como a epidemiologia do Hi invasivo. Essas informações são fundamentais para obtenção de dados sobre a substituição do sorotipo prevalente, e poderão contribuir para futuras modificações nos planos de vacinação atualmente empregados e o desenvolvimento de novas vacinas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, por meio de métodos fenotípicos e moleculares, cepas de Hi circulantes no município do Rio de Janeiro, utilizando-se amostras de quadros infecciosos isoladas no período de 2000-2012, doze anos de utilização da vacina no Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a espécie das cepas estudadas, por métodos fenotípicos e moleculares, comparando com a identificação realizada nos hospitais de origem;
- Caracterizar os sorotipos e biotipos dos isolados clínicos de *Haemophilus influenzae* deste estudo por métodos sorológicos, bioquímicos e moleculares;
- Avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções por *Haemophilus influenzae*, bem como, detectar cepas produtoras de β -lactamase (BLA+) e cepas resistentes à ampicilina não produtoras de β -lactamase (BLNAR);
- Avaliar o polimorfismo genético das cepas, por perfis de fragmentação do DNA cromossômico, utilizando a técnica do *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

5 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Para realização desse estudo foram utilizadas noventa e seis cepas (96) previamente identificadas como *H. influenzae* provenientes de onze hospitais do Município do Rio de Janeiro, isoladas no período pós-vacinal (2000 - 2012).

Os hospitais que forneceram as amostras possuem características de atendimento variadas e tiveram representantes dos três níveis governamentais (federal, estadual e municipal), bem como de unidades privadas (Tabela 3).

As cepas foram isoladas de casos clínicos como: meningite, septicemia, pneumonia, artrite séptica e infecções respiratórias diversas, sendo quarenta e seis (46) de infecções invasivas (provenientes de sangue, líquido, lavado bronquico, líquido pleural e fragmento de osso) e cinquenta (50) de sítios não estéreis (isoladas de secreção traqueal e escarro). As amostras analisadas fazem parte do acervo da Coleção de Pesquisa do Laboratório de Microorganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), onde são preservadas por liofilização (Tabela 3).

Tabela 3. Origem das cepas de *H. Influenzae* utilizadas no presente estudo.

HOSPITAIS	Sítio	ANO / NÚMERO DE CEPAS													TOTAL
		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS)	Invasivo	4	3	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	12
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Instituto Nacional Fernandes Figueira (IFF)	Invasivo	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	Não invasivo	-	-	13	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG-UFRJ)	Invasivo	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Perinatal	Invasivo	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	1	4
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	2
Hospital Estadual Getúlio Vargas (HEGV)	Invasivo	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	3
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	4
Hospital Copa D'Or	Invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Hospital Estadual Carlos Chagas (HECC)	Invasivo	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Hospital Federal Cardoso Fontes (HFCF)	Invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	2	5	-	10
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	6	4	-	14
Hospital Municipal Lourenço Jorge (HMLJ)	Invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	2	5
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	2	-	5
Hospital Municipal Miguel Couto (HMMC)	Invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2
Casa de Saúde Nossa Senhora do Carmo (CSNSC)	Invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
	Não invasivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	-	6
Total	Invasivo (46)	4	3	10	1	1	0	3	3	3	3	7	5	3	96
	Não invasivo (50)	0	0	13	4	0	0	4	2	5	4	11	7	0	

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

4.2.1 Cultura bacteriana

A caracterização fenotípica das cepas foi iniciada com a abertura da ampola e o cultivo do líofilo em placas contendo ágar chocolate (base de ágar Mueller-Hinton - OXOID, aquecida a 70°C, adicionada de 10% de sangue desfibrinado e estéril de cavalo), enriquecido com 1% de Suplemento VX (Laborclin - LB). As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas, e a partir do crescimento obtido, foi realizada a análise macroscópica da colônia isolada sugestiva de Hi, a análise microscópica pelo método de Gram para

confirmação das características morfo-tintoriais, seguido do estoque (-20°C) em criotubos com caldo BHI adicionado 20% de glicerol para realização de testes futuros.

4.2.4 Avaliação da necessidade de sangue

As cepas foram semeadas em placas com ágar Mueller-Hinton (Oxoid) sem sangue para confirmação de que as mesmas necessitavam de sangue (fatores V e/ou X) para a sua cultura. As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas.

4.2.5 Avaliação da formação de hemólise

As cepas foram semeadas em placas de ágar sangue (base de ágar Mueller-Hinton/Oxoid, suplementado com 10% de sangue de cavalo estéril e desfibrinado, e com 1% de Suplemento VX /Laborclin - LB) para avaliação da formação de hemólise. As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas.

4.2.4 Testes bioquímicos

4.2.4.1 *Fermentação de carboidratos*

A identificação bioquímica dos isolados de Hi foi realizada através de testes de fermentação em caldo dos carboidratos - glicose, sacarose, lactose, manose – em uma base contendo vermelho de fenol como indicador de pH (base *Phenol Red Broth* – Difco), suplementada com soluções de 10 µg/mL de hemina, 10 µg/mL NAD e 1% dos carboidratos supracitados. Os caldos foram inoculados com a cepa a ser identificada e incubados 35-37°C por 24 horas (CAMPOS, 1999, KONEMAN, et al., 2001).

4.2.4.2 Biotipificação

A biotipificação foi realizada pelos testes bioquímicos da ornitina descarboxilase, da urease e do indol de acordo com Kilian (1976) (MARRS, et al., 2001; DE ALMEIDA; MARZOCHI, 2006), sendo os reagentes preparados e envasados pelo Setor de Meios de Cultura do Departamento de Microbiologia do INCQS.

Para o teste da ornitina descarboxilase utilizou-se base Moeller (Difco) acrescida de 1% de L-ornitina (pH 6,0), sem adição dos fatores de crescimento. Após inoculação, adicionou-se aproximadamente 1,0 mL de óleo mineral e incubou-se a 37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas.

O meio para verificação da atividade da urease foi produzido utilizando-se um substrato (KH₂PO₄ – 0,1 g, K₂HPO₄ – 0,1 g, NaCl – 0,5 g), uma solução indicadora (*Phenol Red Broth* – Difco) e uma solução aquosa de uréia filtrada.

A solução para o teste de indol foi produzida utilizando-se como substrato L-triptofano (0,1% / Sigma) em tampão fosfato pH 6,8. Após a inoculação e o tempo de incubação (37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas), adicionou-se o reagente de Kovacs.

As cepas foram classificadas de acordo com os resultados da tabela 4.

Tabela 4. Biotipificação de *Haemophilus influenzae*.

Biotipo	Indol	Urease	Ornitina Descarboxilase
I	+	+	+
II	+	+	–
III	–	+	–
IV	–	+	+
V	+	–	+
VI	–	–	+
VII	+	–	–
VIII	–	–	–

Fonte: adaptada de DE ALMEIDA; MARZOCHI (2006).

4.2.5 Sorotipificação

A sorotipificação foi realizada através do método de Soro Aglutinação em Lâmina (SAL), utilizando os seis antissoros (Becton, Dickinson and Company / BD) específicos para os seis tipos capsulares (a-f) de Hi. Para realização dessa técnica, ressuspendeu-se o antissoro em 1,0 mL de água para injeção e aplicou-se uma gota do mesmo em lâmina para microscopia. Após a etapa anterior, inoculou-se uma pequena quantidade de massa bacteriana (1-2 colônias) de cultura com até 48h, com a ajuda de um pequeno bastão de vidro estéril, homogeneizando-se completamente. As cepas que não aglutinaram com qualquer dos antissoros supracitados foram consideradas não encapsuladas (CAMPOS, 1999).

Para cada frasco de antissoro aberto, foi realizado o controle de qualidade do mesmo com uma cepa de referência (ATCC) do sorotipo compatível ao respectivo antissoro.

4.2.6 Testes de sensibilidade aos antibióticos

4.2.6.1 Método de Difusão em ágar (“Kirby-Bauer”)

Este ensaio foi realizado de acordo com Bauer e colaboradores (1966). O meio de cultura utilizado foi o *Haemophilus* Test Medium (HTM) que consiste na base de Mueller-Hinton (OXOID) suplementada com 15 µg/mL de hemina (fator X), 15 µg/mL de NAD (fator V) e 5 mg/mL de extrato de levedura. A suspensão das colônias foi realizada em caldo BHI, ajustada à escala de 0,5 McFarland e inoculada uniformemente, com um “swab” estéril, em placa contendo o meio HTM. Após inoculação da suspensão bacteriana os discos de antibióticos foram distribuídos na superfície do meio, sendo as placas incubadas a uma atmosfera de 5% de CO₂, a 35-37°C, por 16 a 18 horas. Os antibióticos utilizados foram: ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftriaxona (30 µg), meropenem (10 µg), sulfametoxazol – trimetoprim (25 µg), ciprofloxacina (5 µg), rifampicina (5 µg) e azitromicina (15 µg), que são os principais antibióticos utilizados no tratamento das infecções causadas por *Haemophilus influenzae* (BRASIL, 2010a; CLSI, 2011). Para o controle de qualidade do ensaio, foi utilizada a cepa de

Hi ATCC 49247. Após a incubação, o diâmetro dos halos de inibição formados nos antibiogramas foi medido utilizando-se uma régua.

4.2.6.2. *Determinação da Concentração Inibitória Mínima- CIM*

Algumas cepas desse estudo apresentaram resistência microbiana no método de difusão em ágar para ampicilina (AMP - 10 µg), sulfametoxazol – trimetoprim (SUT - 25 µg) ou ambos os antibióticos. Dessa forma, para confirmação da resistência para esses antibióticos determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Para a ampicilina a CIM foi determinada pela técnica de diluição em ágar e as concentrações de antibiótico utilizadas foram: 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL e 64 µg/mL (ANEXO B).

A CIM para o sulfametoxazol – trimetoprim foi determinada pela a técnica de gradiente de difusão (fitas de Etest / Biomerieux), em que a concentração de antibiótico variou de 0,002 – 32 µg/mL. Para isso, fez-se uma suspensão bacteriana em caldo BHI suplementado com os fatores VX, ajustada à escala de 0,5 McFarland, a qual foi inoculada com um “swab” estéril em placa contendo o meio HTM. Após a inoculação, adicionou-se à superfície do meio a fita de Etest, e incubou-se as placas a uma atmosfera de 5% de CO₂, a 35-37°C, por 20 a 24 horas.

Em ambos os testes foi utilizada a cepa de Hi ATCC 49247 para o controle de qualidade.

4.2.6.3 *Análise dos Testes de Sensibilidade*

Os resultados obtidos pelos testes de sensibilidade foram interpretados de acordo com os padrões apresentados pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011) (Tabela 5).

Tabela 5. Critérios de interpretação dos testes de susceptibilidade aos antibióticos para *H. influenzae*.

Critérios interpretativos do teste de disco difusão			
Agente antimicrobiano	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	S	I	R
Ampicilina	≥ 22	19-21	≤ 18
Amoxicilina – Ácido clavulânico	≥ 20	---	≤ 19
Cloranfenicol	≥ 29	26-28	≤ 25
Ceftriaxona	≥ 26	---	---
Sulfametoxazol – Trimetoprim	≥ 16	11-15	≤ 10
Ciprofloxacina	≥ 21	---	---
Meropenem	≥ 20	---	---
Azitromicina	≥ 12	---	---
Rifampicina	≥ 20	17-19	≤ 16

Critérios interpretativos para CIM			
Agente antimicrobiano	Concentração de antibiótico (µg/mL)		
	S	I	R
Ampicilina (Macrodiluição)	≤ 1	2	≥ 4
Sulfametoxazol – Trimetoprim (Etest)	≤ 0,5	1-2	≥ 4

CIM: Concentração Inibitória Mínima; S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente

Fonte: CLSI, 2011.

4.2.6.4 Pesquisa de β -lactamase

O método utilizado para a pesquisa de β -lactamase foi o da cefalosporina cromogênica descrito por O'Callaghan e colaboradores (1972), utilizando-se nitrocefina (Oxoid). Esse método consiste na inoculação das cepas que apresentaram resistência à ampicilina em placa com o meio HTM (fazendo-se um "spot"), posterior incubação dessas cepas por 24 h e adição da nitrocefina no crescimento microbiano obtido. A observação da coloração avermelhada posterior à reação das cepas com a nitrocefina indica positividade para a β -lactamase. As cepas ATCC 29213 (*S. aureus* = β -lactamase positiva), ATCC 25923 (*S. aureus* = β -lactamase negativa) e uma cepa de Hi de isolado clínico do Setor de Vacinas Hib,

classificada como β -lactamase positiva, foram utilizadas para o controle de qualidade do ensaio.

4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

4.3.1 Extração e purificação do DNA genômico

Foi utilizado o DNA genômico para os procedimentos moleculares deste trabalho. Após o cultivo da cepa de Hi em meio de ágar chocolate suplementado, uma alça (10 μ L) da cultura foi utilizada para a extração e purificação do DNA seguindo as etapas do protocolo do DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (Qiagen Inc.Valencia, Calif.). Após a extração e purificação, o DNA foi estocado a -20°C .

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.3.2.1 *Confirmação do gênero, espécie e da presença de cápsula*

A confirmação do gênero *Haemophilus* foi obtida amplificando-se um segmento de DNA do gene codificante da proteína P6, que está localizada na membrana externa, e é comum a todos os tipos de *Haemophilus influenzae*, utilizando-se os iniciadores P6-F e P6-R. A confirmação de espécie e da presença de cápsula foi obtida amplificando-se um segmento do gene *bexA* utilizando-se iniciadores HI-I e HI-II. Ambos os pares de iniciadores foram descritos por van Ketel e colaboradores (1990) (ANEXO C), e os resultados foram obtidos através da realização de PCR multiplex, de acordo com o protocolo a seguir (Tabela 6).

Tabela 6. Protocolo da PCR multiplex para confirmação de gênero, espécie e presença de cápsula em *H. Influenzae*.

Reação com 25µL por amostra.		
Reagentes	[] Final	
H ₂ O	---	
Máster Mix (Promega)	1 X	
Iniciadores	Hi-1	2,0 pmols
	Hi-2	2,0 pmols
	P6-F	1,2 pmols
	P6-R	1,2 pmols
DNA extraído	---	
Programa		
Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
95	5	---
95	1	---
55	1	40
72	2	---
72	10	---

4.3.2.2 Confirmação do tipo capsular de Hi

A confirmação do tipo capsular foi obtida amplificando-se um segmento de DNA da região II do gene *cap* (ANEXO C) de acordo com Falla e colaboradores (1994). Para isso, utilizou-se a Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) de acordo com o protocolo apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Protocolo da PCR para confirmação do tipo capsular de *H. Influenzae*.

Reação com 25µL por amostra.		
Reagentes	[] Final	
H ₂ O	---	
MgCl ₂	8,0 mM	
Tampão	1 X	
dNTPs (Mistura)	0,4 mM (cada)	
Iniciadores	Tipo - F	2,0 pmols
	Tipo -R	2,0 pmols
<i>Taq</i> Polimerase	0,5 U	
DNA extraído	Quantidade necessária	
Programa		
Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
94	7	---
94	1	
60	1	35
72	1	
72	10	---

4.3.2.3 Análise dos produtos gerados pela PCR

Os produtos gerados pelas PCRs foram analisados em gel de agarose a 1% (Sigma Aldrich, MO, USA) adicionado de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A visualização e documentação dos géis foram realizadas sob luz ultravioleta em equipamento ImageQuant 300 (GE Healthcare Life Sciences).

4.3.3 Macrorestrição do DNA e Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (PFGE)

As técnicas da Macrorestrição do DNA e PFGE foram realizadas adaptando-se os protocolos descritos por Curran; Hardie; Tower (1994) e Soares e colaboradores (1993).

4.3.3.1 Amostras bacterianas

Todas as amostras bacterianas deste estudo (n=96) foram utilizadas para avaliação do polimorfismo genético. Além delas, foram incluídas duas cepas do Estado de Pernambuco (Hib e Hib⁺) e uma ATCC 10211 (Hib) para fins de comparação entre estas cepas com as demais do Rio de Janeiro.

A extração do DNA para a técnica de PFGE iniciou-se com cultivo das cepas estocadas em criotubos, em placas contendo ágar chocolate (base de ágar Mueller-Hinton - OXOID, aquecida a 70°C e adicionada de 10% de sangue estéril e desfibrinado de cavalo), enriquecido com 1% de Suplemento VX (Laborclin - LB). As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas.

5.3.3.2 Preparação do DNA cromossômico

Uma suspensão bacteriana foi preparada utilizando-se, aproximadamente ½ alçada (10 µL) de cultura bacteriana em 300 µL de tampão PIV (Tris 10 mM + NaCl 1M pH 8.0). Após três lavagens (centrifugação a 12.000 g / 4'), misturou-se a suspensão bacteriana (300 µL) com 300 µL de agarose (Nusieve GTG BMA), de forma que a concentração final ficasse a 2,5%. Após solidificação, a agarose foi fatiada em pequenos discos (\pm 1 mm de espessura) chamados de *plugs*, os quais foram incubados em tampão de lise EC (Solução Tris 6,0 mM pH 8,0 + NaCl 1 M + EDTA) contendo lisozima (1 mg/mL) sem RNase, a 37° com agitação lenta, *overnight*. Após esse tempo, os *plugs* foram incubados em tampão ES (EDTA 0,5 M pH 9,0 + sarcosil 1%) com proteinase K (0,1 mg / mL), a 50°C por 48 h. Na etapa final, os *plugs* foram lavados (seis lavagens de 30 min a 37° com agitação) utilizando-se tampão TE (Tris-HCl 0,01 M pH8,0 + EDTA dissódico 1 mM pH 8,0) e estocados em geladeira (4 – 8°C).

4.3.3.3 Restrição e Eletroforese dos fragmentos de DNA

O DNA contido em cada *plug* foi digerido com a enzima *SmaI* (20 UI - Biolabs) a 25°C por \pm 18h. Após esse tempo, aplicou-se em gel de agarose a 1%, uma fina porção do peso molecular Lambda DNA Ladder (50-1000 Kb), no *slot* anterior às amostras e no posterior às mesmas. Aplicou-se, então, o DNA das cepas digerido e realizou-se a corrida de PFGE utilizando-se como tampão, TBE 0,5 X (Tris/Borato/EDTA). O aparelho específico para esse procedimento foi o “CHEF-DR III System” (Bio-Rad, Richmond, CA EUA), e os parâmetros utilizados se encontram no protocolo da tabela 8.

Tabela 8. Protocolo de corrida do gel de eletroforese.

Parâmetros de corrida	
Pulso inicial: 1s	Voltagem: 6V/cm
Pulso final: 26s	Ângulo: 120°C
Tempo de corrida: 26h	Tempertura: 12°C

5.3.3.4 Visualização e análise dos perfis de fragmentação do DNA

Após a eletroforese os fragmentos em gel de agarose foram corados com brometo de etídio (10mg/mL) por 30 minutos e descorado em água *over night*. A visualização e documentação foram feitas sob luz ultravioleta em equipamento MiniBis Pro: Fotodocumentador para Fluorescência UV e Luz branca (DNR).

A análise dos genótipos e a subsequente confecção dos dendogramas, foi realizada através do programa BioNumerics versão 6.6. A definição de um genótipo de PFGE foi baseada em um ponto de corte de similaridade de 80% (coeficiente de Dice representado por UPGMA, 1,0% de otimização e 1,0% de tolerância).

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DOS PACIENTES

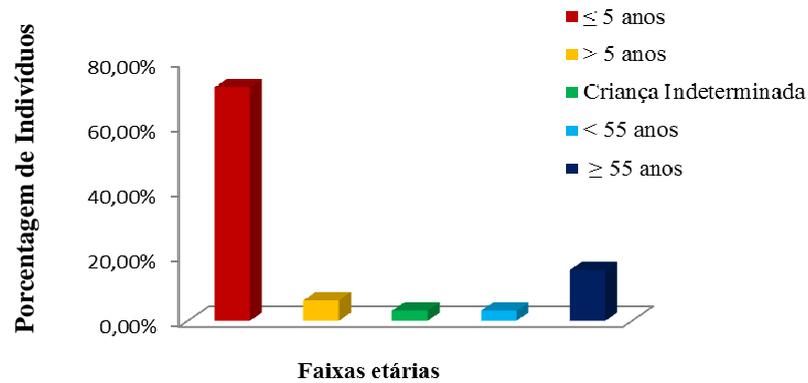
As informações sobre os pacientes de onde as cepas foram isoladas, como, por exemplo, sexo e idade, não puderam ser obtidas integralmente pela dificuldade de se conseguir esses dados no setor laboratorial dos hospitais. Dos 96 pacientes, 78 (81,25%) tiveram o sexo identificado, sendo que destes 30 (38,46%) tiveram infecções invasivas e 48 (61,54%) não invasivas. Nas duas situações (doença invasiva e não invasiva) o número de indivíduos do sexo masculino foi ligeiramente maior, com uma diferença de seis pacientes (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição do sexo entre as doenças invasivas e não invasivas causadas por *H. influenzae*.

SEXO	TIPO DE INFECÇÃO	
	Invasivas (n=30)	Não Invasivas (n=48)
Masculino (%)	(n=18) 60%	(n=27) 56,25%
Feminino (%)	(n=12) 40%	(n=21) 43,75%

Em relação à idade, esse dado foi obtido somente para 56,25% (54/96) dos pacientes (32 com doenças invasivas e 22 não invasivas), prejudicando, desta forma, esta análise. Entretanto, as informações obtidas mostraram que daqueles que tiveram doenças invasivas, 26 81,65% (26/46) eram crianças, cuja grande maioria, 71,88% (23/26) possuía menos que cinco anos de idade. O número de adultos com doenças invasivas foi baixo, somente seis (18,75%), cuja maioria (5/6) apresentava idade maior que 55 anos (Figura 10).

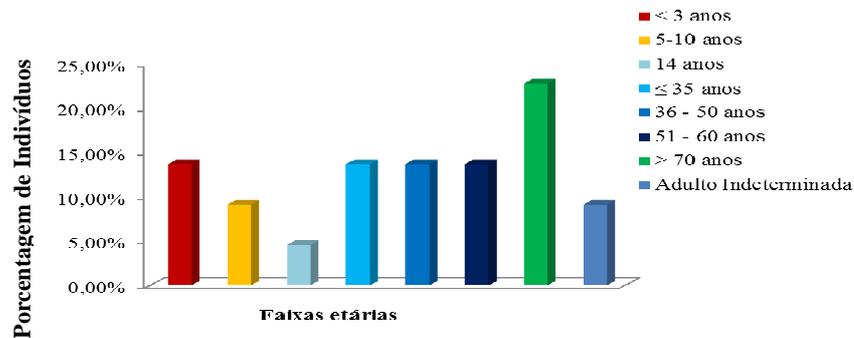
Figura 10. Gráfico da distribuição da idade em pacientes com doenças invasivas causadas por *H. influenzae* (n=32).



Não foi possível obter dados sobre vacinação das crianças que tiveram doenças causadas por Hi sobretudo, invasivas (n=26). Porém, fazendo uma estimativa pela idade que tinham, e o ano da introdução da vacina conjugada contra Hib no Programa Nacional de Imunização (PNI), 17 dessas crianças (61,53%) estavam em idade de terem recebido a vacina.

Em relação aos pacientes acometidos de doenças não invasivas, cinco (22,72%) eram crianças, um era adolescente, 14 (63,64%) eram adultos e dois (9,09%) eram adultos que não tiveram a idade identificada. Três crianças pertenciam a faixa etária abaixo de três anos, duas tinham idade entre 5 e 10 anos, e um adolescente com 14 anos. No entanto, os dados referentes às idades dos adultos foram bastante diversos, tendo as idades variado de 19 a 77anos (Figura 11).

Figura 11. Gráfico da distribuição da idade em doenças não invasivas causadas por *H. influenzae* (n=22).

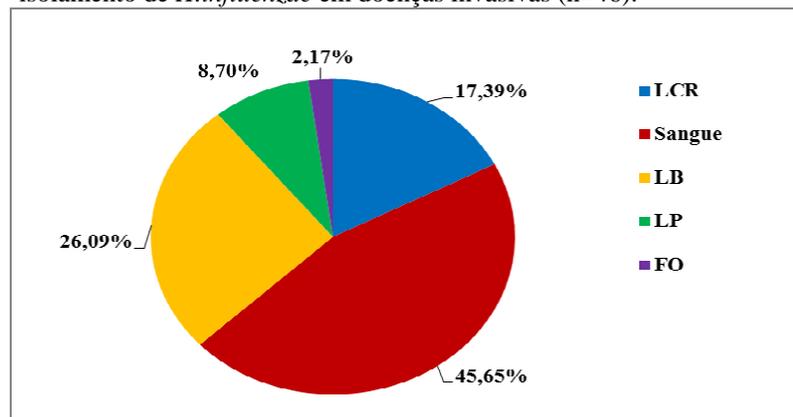


5.2 MATERIAIS CLÍNICOS

As cepas invasivas (n=46) utilizadas nesse estudo foram isoladas de cinco tipos de materiais clínicos: líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue, lavado broncoalveolar (LB), líquido pleural (LP), fragmento de osso (FO), enquanto as cepas não invasivas (n=50) foram isoladas apenas de secreção traqueal (ST) e escarro.

O material clínico de onde foi isolado *Hi* com maior frequência nas doenças invasivas foi o sangue (n=21/46), seguido de LB (n= 12/46). No entanto, em doenças não invasivas, a diferença no número de ST (n=29) e de escarro (n=21) foi relativamente pequena (Figura 12).

Figura 12. Gráfico de distribuição dos materiais clínicos utilizados para isolamento de *H.influenzae* em doenças invasivas (n=46).



5.3 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

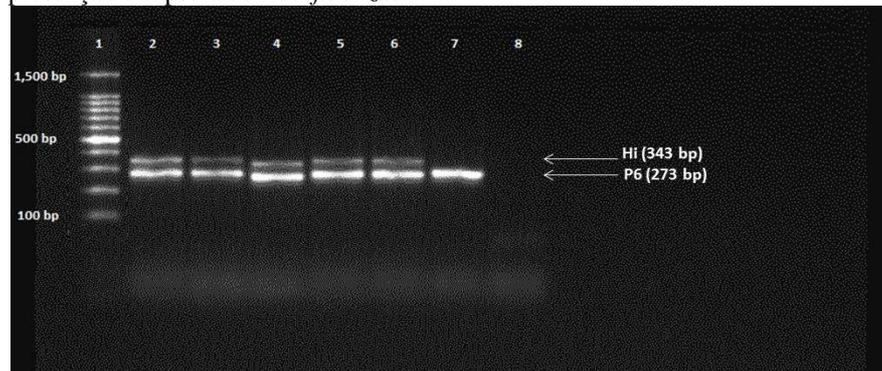
A confirmação da identificação das cepas utilizadas nesse estudo foi realizada por métodos fenotípicos, bioquímicos e moleculares. Em relação ao fenótipo das cepas, além da morfologia celular e colonial foram observadas a necessidade dos fatores de crescimento V e X, e a formação de hemólise em sangue de cavalo. Para essas duas características, os resultados foram condizentes com a espécie *H. influenzae*. Nenhuma das cepas foi capaz de crescer em meio com ausência de sangue, ou seja, 100% delas foram dependentes dos fatores V e/ou X para seu crescimento. Além disso, nenhuma delas foi produtora de hemólise do

tipo β em sangue de cavalo, que é uma característica de *H. haemolyticus*, utilizada para diferenciar Hi de *H. haemolyticus*.

As provas de fermentação da glicose, sacarose, manose e lactose tiveram como resultado somente a fermentação da glicose por todas as cepas, ou seja, 100% das cepas foram capazes de fermentar somente a glicose, confirmando mais uma vez a identificação dessas como *H. influenzae*.

O método molecular utilizado para confirmação do gênero e espécie foi a amplificação do segmento de DNA do gene codificante da proteína P6 pela reação de PCR. Os resultados obtidos também confirmaram as cepas como sendo da espécie *H. influenzae*, visto que 100% delas apresentaram amplificação para o segmento P6.

Figura 13. Gel demonstrativa PCR multiplex para confirmação de gênero, espécie e presença de cápsula de *H. influenzae*.

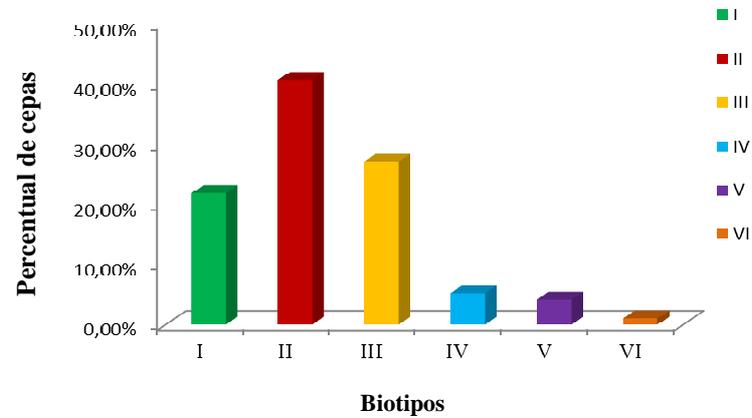


Linha 1: Padrão de Tamanho Molecular; Linha 2: ATCC10211 (Hib/Controle Positivo); Linha 3: P2823 (Hia); Linha 4: P2482 (Hib); Linha 5: P2597 (Hic); Linha 6: P2481 (Hif); Linha 7: P2480 (HiNT); Linha 8: Controle Negativo.

5.4 BIOTIPIFICAÇÃO

As 96 cepas desse estudo foram distribuídas em seis dos oito biotipos descritos para Hi, dentre os quais estão incluídos os biotipos: I, II, III, IV, V, VI. Dentre os biotipos anteriormente citados os biotipos prevalentes foram II, III e I (Figura 14).

Figura 14. Gráfico dos diferentes biotipos encontrados no estudo (n=96).



Em relação às cepas invasivas, foram observados representantes de quatro dos oito biotipos (I, II, III e IV), com o predomínio do biotipo II (n=21) seguido do I (n=14) (Figura 15). A maioria das cepas do biotipo II foi isolada de sangue e LCR, enquanto que as cepas de biotipo I foram predominantemente isoladas de sangue e LB (Tabela 10).

Figura 15. Gráfico de distribuição dos biotipos em cepas invasivas de *H. influenzae* (n=46)

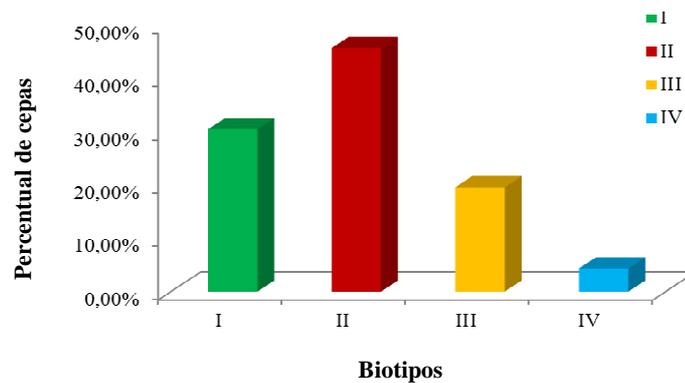
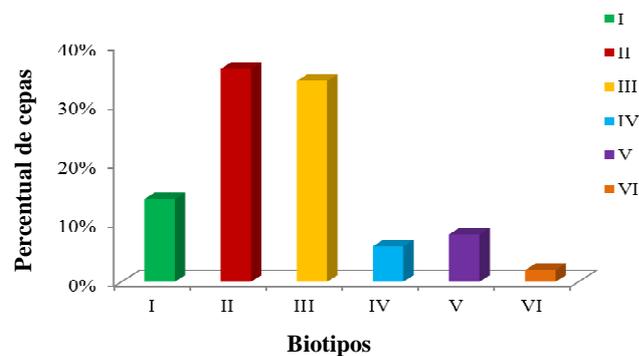


Tabela 10. Distribuição dos biotipos por material clínico em doenças invasivas causadas por *H. influenzae*.

Materiais clínicos	Biotipos obtidos em cepas invasivas (n=46)			
	I	II	III	IV
Líquido cefalorraquidiano	3	4	0	1
Sangue	6	14	1	0
Lavado Broncoalveolar	4	1	6	1
Líquido Pleural	1	1	2	0
Fragmento de Osso	0	1	0	0
Total	14	21	9	2

As cepas não invasivas apresentaram maior diversidade dispondo de representantes de seis dos oito biotipos para Hi (I, II, III, IV, V, VI). Os biotipos que prevaleceram neste caso foram o II (n=18) e o III (n=17) (Figura 16).

Figura 16. Gráfico de distribuição de biotipos em cepas não invasivas de *H. influenzae* (n=50).



Com relação ao biotipo II, o número de cepas isoladas de ST e escarro, foi de dez e oito respectivamente. Enquanto o biotipo III foi obtido de cepas de ST (n=15) (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição dos biotipos por material clínico em doenças não invasivas causadas por *H. influenzae*.

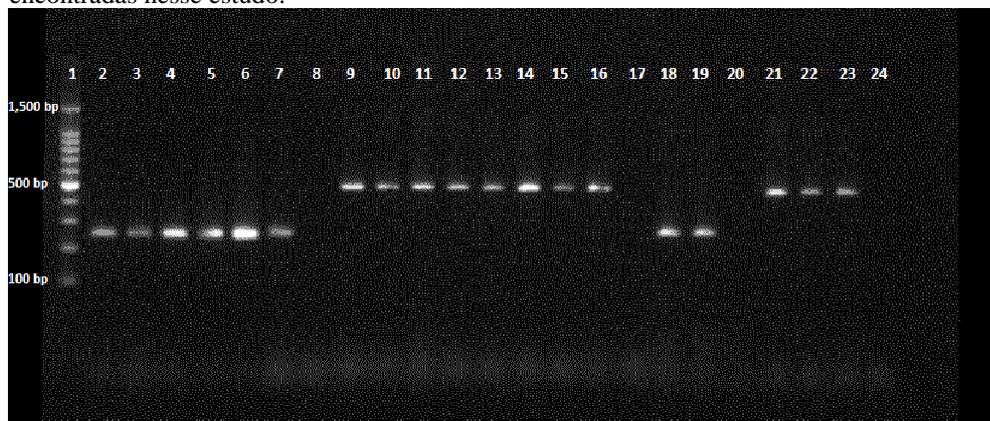
Materiais clínicos	Biotipos obtidos em cepas não invasivas (n=50)					
	I	II	III	IV	V	VI
Secreção Traqueal	1	10	15	2	1	0
Escarro	6	8	2	1	3	1
Total	7	18	17	3	4	1

5.5 SOROTIPIFICAÇÃO POR SOROAGLUTINAÇÃO E PCR

Os sorotipos encontrados pela sorologia foram todos confirmados pela PCR, no entanto sete cepas apresentaram poliaglutinação, tendo aglutinado para três ou mais antisoros. Estas amostras, então, foram consideradas NT pela sorologia e tiveram essa classificação confirmada pela PCR. Todas as cepas encapsuladas apresentaram amplificação do segmento da região I (confirmação da espécie) e II (confirmação do sorotipo) do gene *cap*. Aquelas que não amplificaram para os dois segmentos supracitados foram consideradas HiNT.

Entre as 96 amostras desse estudo foram encontradas 81 (84,37%) cepas HiNT e 15 (15,63%) cepas encapsuladas, as últimas incluindo quatro dos seis sorotipos capsulados (a,b,c,f) (Figura 17).

Figura 17. Gel da PCR para confirmação de sorotipos, contendo as 15 cepas encapsuladas encontradas nesse estudo.



Linha 1: Padrão de Tamanho de Peso Molecular; Linha 3 a 7: Cepas clínicas Hia (250 bp); Linhas 10 a 16: Cepas clínicas Hib (480 bp); Linha 19: Cepa clínica Hic (250 bp); Linhas 22 e 23: Cepas clínicas Hif (450 bp); Linhas 2, 9, 18 e 21: Controles positivos (ATCC 9006/Hia, ATCC 10211/Hib, ATCC 9007/Hic e ATCC 9833/Hif).

Em relação às cepas encapsuladas, 93,33% (14/15) foram isoladas de doenças invasivas, cujo LCR foi o material clínico de onde a maior parte foi obtida. O sorotipo b foi o mais prevalente (7/15), seguido do sorotipo a (5/15), f (2/15) e c (1/15), sendo cinco cepas Hib provenientes de LCR. As cepas não-tipáveis foram provenientes de sítios invasivos (n=32), cuja maioria foi originária de materiais como sangue e LB, e não invasivos (n=49). Não foram encontradas cepas mutantes deficientes de cápsula tanto Hib⁻, quanto Hia⁻ entre os isolados desse trabalho (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição dos sorotipos por material clínico em doenças invasivas causadas por *H. influenzae*.

Material Clínico	Sorotipos					Total
	a	b	c	f	NT	
Líquido Cefalorraquidiano	2	5	0	0	1	8
Sangue	1	1	0	1	18	21
Lavado Broncoalveolar	0	0	1	1	10	12
Líquido Pleural	0	1	0	0	3	4
Fragmento de Osso	1	0	0	0	0	1
Total	4	7	1	2	32	46

Em relação às cepas invasivas com informação de idade, 75% (24/32) foram cepas NT, em todas as faixas etárias. As cepas encapsuladas tiveram maior número na faixa etária de crianças menores que cinco anos (n=6), tendo um predomínio de Hia (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição dos sorotipos por idade em doenças invasivas causadas por *H. influenzae*.

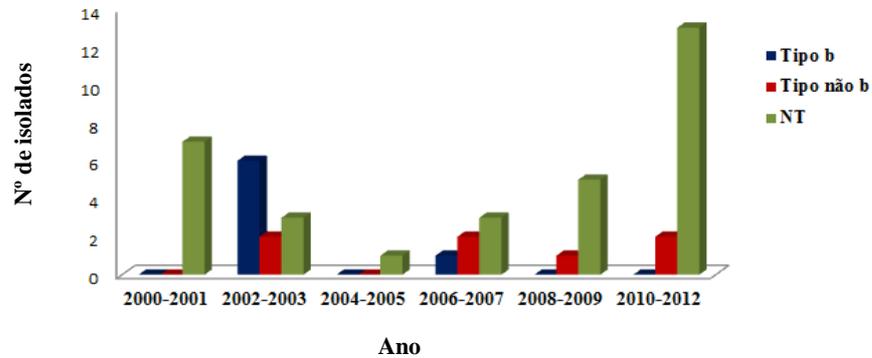
Idade	Sorotipos				Total
	a	b	f	NT	
≤ 5 anos	4	2	0	17	23
> 5 anos	0	0	1	1	2
Criança indeterminada	0	0	0	1	1
< 65 anos	0	0	1	2	3
≥ 65 anos	0	0	0	3	3
Total	4	2	2	24	32

Entre as 17 crianças com a possibilidade de terem sido vacinadas contra Hib devido à faixa etária, 11 (64,70%) tiveram doença invasiva causada por HiNT, e as demais (n=6), doença causada por Hia (n=4) e Hib (n=2).

Entre os isolados de doenças não invasivas somente um representante foi encapsulado. Essa cepa foi isolada de uma secreção traqueal e foi identificado como sendo do sorotipo a. As demais cepas não invasivas (n=49) foram do tipo não encapsulado e foram isoladas de ambos os materiais clínicos (secreção traqueal e escarro).

Com relação ao período de estudo (2000-2012) observou-se uma mudança na predominância dos sorotipos, principalmente com relação às cepas invasivas. Nos primeiros anos da era pós-vacinal, após 1999, o número de infecções invasivas causadas por Hib foi bem maior que as causadas pelos sorotipos não b. No entanto, no final do período desse estudo, observou-se uma predominância dos sorotipos não b, para os quais não existem vacinas (Figura 18).

Figura 18. Gráfico de variação dos sorotipos em doenças invasivas causadas por *H. influenzae* no período de 2000-2012.



Relacionando-se os sorotipos com os biotipos, observamos que as cepas encapsuladas foram predominantemente do biotipo I (7/15), com cinco cepas do sorotipo b e duas do sorotipo f; seguido do biotipo II (6/15), com quatro cepas do sorotipo a, uma do sorotipo b e uma do sorotipo c. As cepas não-tipáveis foram, em sua maioria, dos biotipos II (33/81) e III (26/81) (Tabela 14).

Tabela 14. Correlação entre os sorotipos e biotipos de *H. influenzae* encontrados neste estudo.

Sorotipos	Biotipos					
	I	II	III	IV	V	VI
a	0	4	0	0	1	0
b	5	1	0	1	0	0
c	0	1	0	0	0	0
f	2	0	0	0	0	0
NT	14	33	26	4	3	1
Total	21	39	26	5	4	1

5.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Em relação aos testes de sensibilidade aos antibióticos utilizados (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cloranfenicol, ceftriaxona, meropenem, sulfametoxazol-

trimetoprim, ciprofloxacina, rifampicina e azitromicina), houve resistência somente a dois desses fármacos: ampicilina (AMP) e sulfametoxazol-trimetoprim (SUT).

Das 96 cepas testadas pelo método de difusão em ágar, 27 (28,13%) apresentaram resistência, sendo quatro (4,17%) à AMP, quatro (4,17%) à AMP e SUT, e 19 (19,79%) a SUT. Além das resistentes, duas (2,08%) cepas foram intermediárias à AMP e quatro (4,17%) intermediárias a SUT, por este mesmo método.

Todas as cepas que foram resistentes à ampicilina pelo método de difusão em ágar (n=8) foram resistentes também na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Elas apresentaram $CIM > 64\mu\text{g/mL}$ o que confirma esse resultado. Porém, as duas cepas que foram intermediárias para esse antibiótico não apresentaram a mesma classificação com a CIM. Uma apresentou $CIM = 8,0\mu\text{g/mL}$, o que a caracteriza como resistente e a outra $CIM=1,0\mu\text{g/mL}$, o que a caracteriza como sensível (Tabela 15).

As cepas resistentes e intermediárias em relação à ampicilina foram testadas quanto à produção de β -lactamase. Apenas as duas cepas intermediárias foram negativas para o teste. As demais (n=8) apresentaram-se positivas confirmando a produção dessa enzima por estas cepas, como mecanismo de resistência à ampicilina.

Em relação ao SUT, também foi realizado o teste da CIM para as cepas que apresentaram resistência no teste de difusão em ágar. Comparando-se os resultados dos dois testes observamos algumas incompatibilidades. Das 23 cepas que apresentaram resistência ao SUT no primeiro teste, 21 (91,30%) confirmaram essa condição. Porém duas das cepas que foram resistentes no teste de difusão em ágar apresentaram-se intermediárias no teste da CIM, ambas com concentração inibitória mínima igual a $3,0\mu\text{g/mL}$. Além disso, as quatro cepas intermediárias no teste de difusão em ágar, no teste da concentração inibitória mínima, apresentaram: CIM de $6,0\mu\text{g/mL}$ (uma), $12\mu\text{g/mL}$ (uma) e $CIM > 32\mu\text{g/mL}$ (duas), o que as caracterizam como resistentes ao SUT (Tabela 15).

Tabela 15. Resistência das cepas de *H. influenzae* aos antibióticos ampicilina e sulfametoxazol – trimetoprim.

Antibióticos	Disco difusão			CIM		
	R	I	S	R	I	S
AMP	8	2	86	9	---	87
SUT	23	4	69	25	2	69

CIM: Concentração Inibitória Mínima; S: Sensível; I: Intermediário
R: Resistente; AMP: ampicilina; SUT: sulfametoxazol – trimetoprim.

Levando-se em consideração a CIM, que é uma técnica quantitativa, observou-se maior número de cepas resistentes em isolados de sítios não invasivos (cinco resistentes à AMP e 19 resistentes a SUT) do que em cepas invasivas (quatro resistentes à AMP e seis resistentes a SUT) (Tabela 16).

Tabela 16. Diferença entre o número de cepas, invasivas e não invasivas, resistentes aos antibióticos pela concentração inibitória mínima.

Antibióticos	Invasivas (n=46)			Não invasivas (n=50)		
	R	I	S	R	I	S
AMP	4	---	42	5	---	45
SUT	6	2	38	19	---	31

S: Sensível; I: Intermediário R: Resistente; AMP: ampicilina; SUT: sulfametoxazol – trimetoprim.

Quanto à resistência microbiana nos hospitais, oito das onze instituições que enviaram amostras, apresentaram cepas resistentes. Dessas, aquela com maior porcentagem para a resistência bacteriana, como também com o maior número de cepas enviadas, foi o Hospital Federal Cardoso Fontes (Tabela 17).

Tabela 17. Resistência encontrada nos Hospitais.

Hospitais	AMP		SUT	
	R	I	R	I
IEISS¹ (n=12)	0%	0%	8,33%	0%
IFF² (n=23)	8,70%	0%	26,09%	0%
Perinatal³ (n=6)	16,66%	0%	0%	0%
HEGV⁴ (n=7)	0%	0%	28,58%	14,29%
HFCF⁵ (n=24)	16,67%	4,17%	37,50%	8,33%
HMLJ⁶ (n=10)	10%	0%	20%	0%
HMMC⁷ (n=3)	33,33%	0%	0%	33,33%
CSNSC⁸ (n=7)	0%	0,0%	28,57%	0,00%

¹ Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião; ² Instituto Nacional Fernandes Figueira; ³ Perinatal; ⁴ Hospital Estadual Getúlio Vargas;

⁵ Hospital Federal Cardoso Fontes; ⁶ Hospital Municipal Lourenço Jorge;

⁷ Hospital Municipal Miguel Couto; ⁸ Casa de Saúde Nossa Senhora do

5.7 MACRORESTRIÇÃO DO DNA E ELETROFORESE EM CAMPO ELÉTRICO PULSADO (PFGE)

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das 96 cepas por PFGE evidenciou uma grande diversidade genética. Foram obtidos 41 genótipos ou *clusters*, cujos pulsotipos foram nomeados de A1 a T2 (genótipo com duas ou mais cepas) e AA1 a AX1 (genótipo individual), considerando-se uma similaridade superior a 80 (Figura 19)

Os genótipos prevalentes foram: A (11 cepas), B (10 cepas), C (sete cepas), D (cinco cepas), E (cinco cepas) e F (cinco cepas). Porém, os genótipos compostos por duas ou uma cepa foram os mais frequentes (Figura 19).

O genótipo A, apresentou em sua maioria cepas invasivas (n=7), mas também incluiu cepas não invasivas (n=4). Nesse *cluster* houve o predomínio do biotipo II (n=10), sendo apenas uma cepa do biotipo I. Esse genótipo também apresentou oito cepas com o mesmo pulsotipo (A1), sendo sete invasivas, provenientes do mesmo hospital, com o mesmo biotipo

(II), isoladas em 2000 e 2001, e uma cepa não invasiva, também com o biotipo II e isolada em 2006 (Figuras 19 e 20).

O genótipo B apresentou uma diversidade maior, com cepas HiNT possuindo biotipos II (n=6) e III (n=4). Todas as cepas desse cluster foram não invasivas. (Figura 19).

Os genótipos D e F também incluíram apenas cepas não tipáveis. O primeiro com quatro cepas não invasivas e uma invasiva, todas com o biotipo III e segundo com três cepas não invasivas e duas invasivas, todas pertencentes ao biotipo I (Figura 19).

A maioria das cepas encapsuladas, pertencentes ao mesmo sorotipo, ficou agrupada em um mesmo *cluster* (genótipos C, E e T). Porém, três cepas do sorotipo b e uma do sorotipo a, apresentaram-se fora de seus *clusters*.

As cepas Hia formaram o genótipo E, junto com uma cepa HiNT. Três das quatro cepas do sorotipo a apresentaram perfis idênticos (pulsotipo E1) e a outra cepa do mesmo sorotipo incluída neste *cluster* apresentou a ausência da primeira banda e o aparecimento de duas bandas abaixo. Todas as quatro cepas Hia pertenceram ao biotipo II.

As cepas encapsuladas do sorotipo b (genótipo C) apresentaram-se mais heterogêneas do que as do sorotipo a, incluindo cinco pulsotipos (C1 a C5). Vale ressaltar, que o pulsotipo (C1) das duas cepas de Pernambuco, Hib e Hib⁻ foi o mesmo que de uma cepa do Rio de Janeiro (Figura 19).

Figura 19. Dendrograma das 96 amostras clínicas utilizadas no estudo.

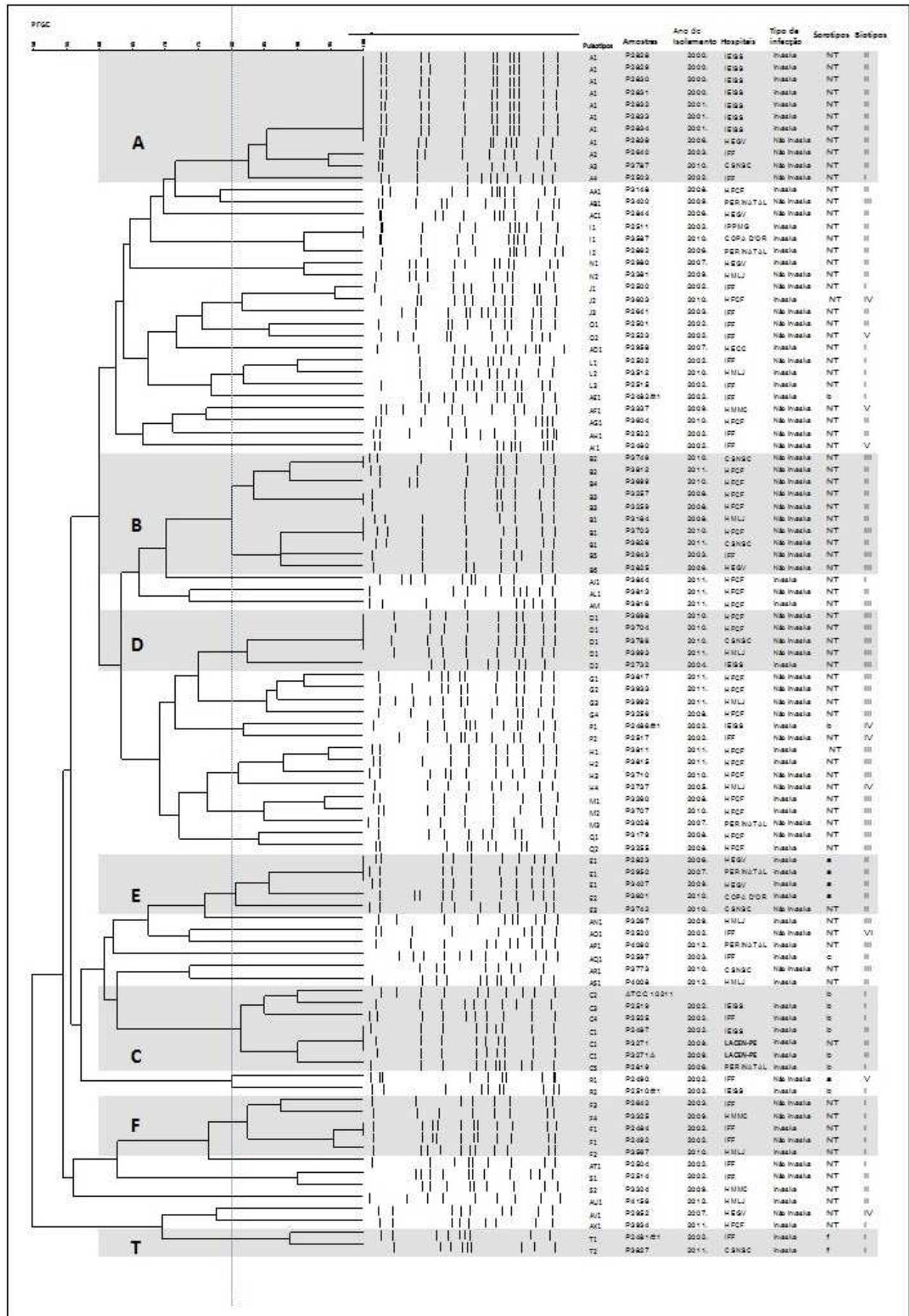
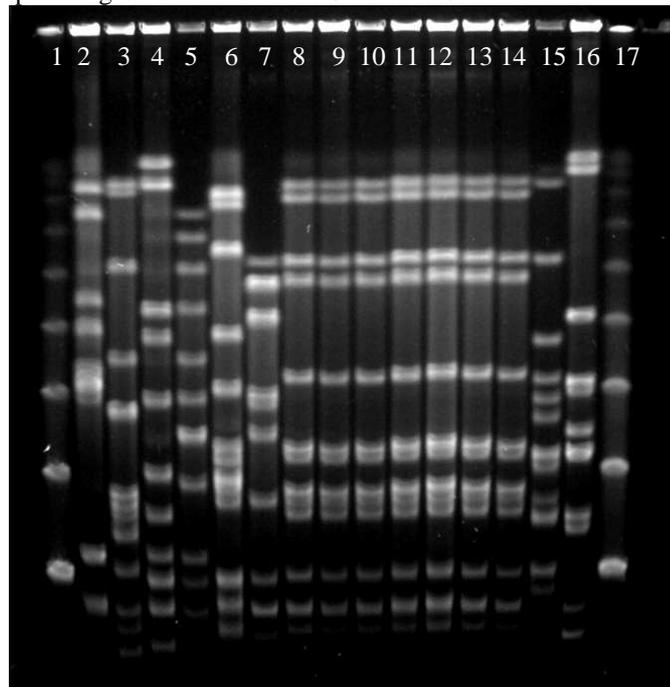


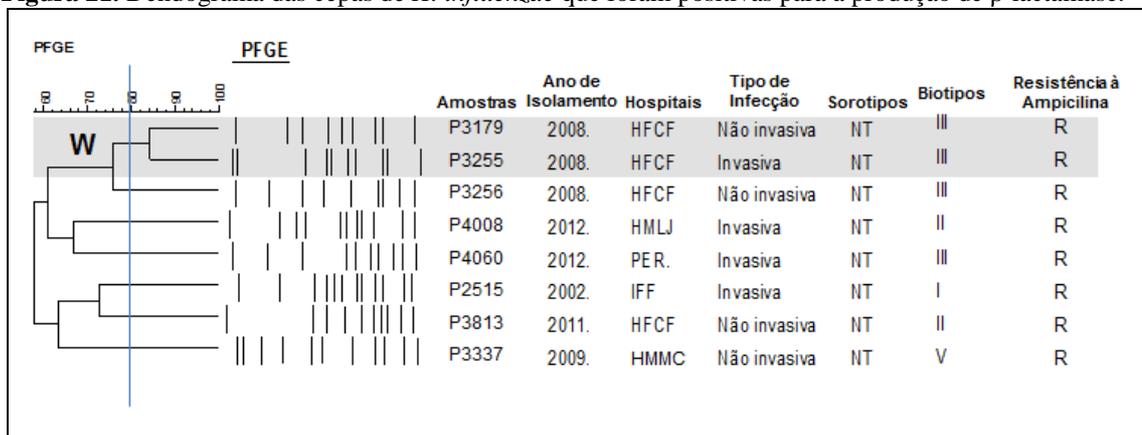
Figura 20. Perfis de fragmentação em amostras de *H. influenzae*, após a digestão com a enzima *Sma*I e PFGE.



Linha 1: Padrão de Tamanho Molecular; Linha 2: P2481; Linha 3: P2511; Linha 4: P2823; Linha 5: P2597; Linha 6: P3148; Linha 7: P3324; Linha 8: P2828; Linha 9: P2829; Linha 10: P2830; Linha 11: P2831; Linha 12: P2832; Linha 13: P2833; Linha 14: P2834; Linha 15: P2525; Linha 16: P3255; Linha 17: Padrão de Tamanho molecular

Em relação às cepas que apresentaram resistência à ampicilina e produziram β -lactamase, apenas um genótipo (W) apresentou duas cepas, com uma similaridade de 80%. As cepas deste *cluster* foram provenientes do mesmo hospital, foram isoladas no mesmo ano e apresentaram o mesmo biotipo (III) (Figura 21).

Figura 21. Dendograma das cepas de *H. influenzae* que foram positivas para a produção de β -lactamase.



6 DISCUSSÃO

Poucos trabalhos sobre a situação atual de *Haemophilus influenzae* tipo b e dos outros sorotipos têm sido publicados no Brasil (DE ALMEIDA et al, 2005). Exemplo dessa situação é a falta de dados sobre este agente infeccioso no Estado e Município do Rio de Janeiro. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi obter dados, através de métodos fenotípicos e moleculares, sobre cepas de Hi circulantes no Município do Rio de Janeiro, utilizando-se amostras de quadros infecciosos isoladas no período de 2000-2012 (doze anos de utilização da vacina no Brasil).

Foram estudadas 96 cepas (46 invasivas e 50 não invasivas), as quais foram provenientes de 11 hospitais com características de atendimento variadas e com representantes dos três níveis governamentais (federal, estadual e municipal), bem como de unidades privadas. Desses hospitais, quatro são considerados Núcleos Hospitalares de Epidemiologia (NHE) do Estado do Rio de Janeiro (Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião, Hospital Estadual Getúlio Vargas, Hospital Estadual Carlos Chagas e Hospital Municipal Miguel Couto) (BRASIL, 2009). O Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS) sempre foi referência no Estado do Rio de Janeiro para o atendimento de pacientes com doenças infectocontagiosas, como a meningite. Segundo Noronha e colaboradores (1997), dos casos de meningite de todas as etiologias notificados diariamente à Coordenação de Programas de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Saúde (RJ), cerca de dois terços foram diagnosticados e tratados no IEISS. Porém, hoje este cenário foi alterado. O IEISS está desativado e suas atividades como referência estadual das meningites foram assumidas pelo Instituto Noel Nutels.

Encontramos dificuldades na obtenção de informações sobre os pacientes de onde as cepas foram isoladas como, por exemplo, sexo e idade. Estas não puderam ser adquiridas integralmente pela dificuldade de se conseguir esses dados no setor laboratorial dos hospitais, pois infelizmente não se encontram facilmente disponíveis. Dos 96 pacientes, em 78 o dado sobre sexo foi obtido, sendo que destes 30 foram acometidos por infecções invasivas e 48 não invasivas. Nas duas situações (doença invasiva e não invasiva) a porcentagem de indivíduos do sexo masculino foi maior do que a do sexo feminino, com uma diferença de seis pacientes em ambos os casos. Vários estudos, com diferentes abordagens, têm mostrado uma prevalência do sexo masculino em relação ao feminino em doenças causadas por *H. influenzae*, porém os trabalhos apenas mostram os dados com relação ao sexo predominante,

mas não explicam se há um motivo para essa diferença na vulnerabilidade do sexo masculino para doenças causadas por esse agente bacteriano (LUONG et al, 2004; TSANG et al, 2007; KASTRIN et al, 2010; LOWTHER et al, 2012; LACHTERMACHER et al, 2013).

Em relação à idade, este dado foi obtido em 54 pacientes, sendo que destes, 32 tiveram doenças invasivas e 22 não invasivas. Daqueles que tiveram doenças invasivas, 26 eram crianças (maioria com idade < 5 anos) e seis eram adultos, cuja maioria apresentava idade > 55 anos. Os nossos resultados em relação às idades encontradas em doenças invasivas na era pós-vacinal não condizem com os dados apresentados pela maioria dos trabalhos que abordam o mesmo tema. Nesses estudos, no período pós-vacinal, a maior incidência das doenças invasivas têm ocorrido em adultos > 65anos, seguida de crianças menores < 5 anos (DWORKIN; PARK; BORCHARDT, 2007; SHUEL et al, 2010; ADAM, et al, 2010; GIUFRÈ et al, 2011; LIVORSI, et al, 2012. Sugerimos, portanto, que essa contradição em nossos resultados seja devido ao baixo número de pacintes com a informação da idade. Além disso, 11 das cepas invasivas foram provenientes de hospitais exclusivamente pediátricos (Instituto Fernandes Figueira, Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira e Perinatal) o que pode ter causado uma seleção nas idades, e por isso ocasionado o aumento do número de doenças invasivas em crianças < 5 anos. Porém, Zanella e colaboradores (2011) encontraram, no Brasil, 507 cepas provenientes de crianças com < 5 anos, em 753 isolados de meningite por Hi no período de 2000-2008 (pós-vacinal), o que reforça nossos dados, mesmo que incompletos.

No que diz respeito aos pacientes que tiveram doenças não invasivas, seis foram crianças (três < 3 anos), 16 foram adultos e dois foram adultos com idade não identificada. Os dados referentes às idades dos adultos foram bastante diversos, tendo as idades variado de 19 a 77 anos, com a maior porcentagem estando em > 70 anos. Qin e colaboradores (2012), ao estudarem cepas de todos os 37 pacientes diagnosticados com infecções do trato respiratório adquiradas em comunidade na cidade de Shangai na China, encontrou entre estas, idades variando de 17 a 99 anos, corroborando com os nossos dados. Essa situação pode ser explicada pelo fato de que a pneumonia adquirida na comunidade (PAC), doença causada em sua maioria pelas cepas de Hi não tipáveis (NT), constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade na população, particularmente de idosos e de pacientes portadores de doenças crônicas (AGRAWAL; MURPHY, 2011; VAN WESSEL et al, 2011). Porém, poucos estudos abordando as doenças não invasivas causadas por Hi e a idade dos pacientes têm sido publicados. Shuel e colaboradores (2010) estudaram cepas de Hi provenientes do

trato respiratório superior, porém a idade dos pacientes com cepas não invasivas não foi informada aos autores.

As cepas invasivas utilizadas nesse estudo foram isoladas de cinco tipos de materiais clínicos: líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue, lavado broncoalveolar (LB), líquido pleural (LP) e fragmento de osso (FO), enquanto que as cepas não invasivas foram isoladas apenas de secreção traqueal (ST) e escarro. O material clínico a partir do qual foi isolado Hi com maior frequência nas doenças invasivas foi o sangue, seguido de LB. No entanto, em doenças não invasivas, a diferença no número de STs (n=29) e de escarro (n=21) foi relativamente pequena.

Após a introdução da vacina conjugada contra Hib, está ocorrendo uma mudança no perfil das fontes de isolamento de Hi. Nós sugerimos que essa alteração se deve ao fato de que na era pré-vacinal, a doença com maior incidência era a meningite, e dessa forma o material clínico que fornecia maior chance de isolamento do causador da doença era o LCR (DE ALMEIDA et al, 2005; LANCELLOTTI et al, 2008). Com a utilização da vacina, houve uma diminuição acentuada no número de casos de meningite, o que diminuiu também, o número de isolados de líquido. Vários trabalhos publicados têm mostrado o sangue como material clínico de doenças invasivas com maior isolamento de *H. influenzae* (TSANG et al, 2007; KASTRIN et al, 2010; SHUEL et al, 2010; GIUFRE et al, 2011; LIVORSI, et al, 2012).

Em relação às cepas não invasivas, as secreções traqueais e escarros foram escolhidos para o presente estudo por serem provenientes, em sua maioria, de pneumonias. O número de secreções traqueais (n=29) foi um pouco maior do que a de escarro (n=21) e nós sugerimos que essa pequena diferença ocorra devido ao fato de que como os materiais clínicos são provenientes de hospitais, supõe-se que os pacientes que estão internados, estejam com pneumonia grave. Estes muitas vezes são intubados, e o material clínico para identificação do agente causador é a secreção traqueal, coletada por sonda de aspiração (ANVISA, 2004).

Após a confirmação da identificação realizada nos hospitais, as cepas foram caracterizadas fenotipicamente, através da biotipificação e sorotipificação. Quanto à biotipificação, as 96 cepas desse estudo foram distribuídas em seis (I, II, III, IV, V, VI) dos oito biotipos descritos para Hi, conforme também encontrado por Shuel e colaboradores (2010) em 125 isolados NT invasivos e não invasivos de Manitoba / Canadá. Porém, nossos dados foram diferentes dos resultados encontrados por Lancellotti e colaboradores (2008), os quais não encontraram, entre 45 cepas isoladas em Campinas – SP, o biotipo II, mas ao contrário de nós, encontraram cepas do biotipo VIII. Dentre os biotipos anteriormente citados o II, III e I, prevaleceram nesta ordem. De acordo com Saito, Umeda, Yoshida (1999), a

maioria dos isolados de materiais clínicos pertence aos biotipos I, II e III, corroborando assim, com os nossos resultados e com os resultados de MOJGANI e colaboradores (2011), que como nós, tiveram a prevalência dos biotipos I, II, III em 38 cepas de Hi isoladas no Irã. Lancellotti e colaboradores (2008) e Shuel e colaboradores (2010), diferentemente de nossos resultados, encontraram prevalência dos biotipos I, IV e VI e II, III e V, nessa ordem, respectivamente.

Em relação às cepas invasivas, foram observados representantes de quatro biotipos (I, II, III e IV), com o predomínio do biotipo II seguido do I. Alguns estudos mostram que a maioria das cepas invasivas são incluídas no biotipos I e II (DE ALMEIDA, et al., 2005; MOJGANI, et al., 2011), porém Lancellotti e colaboradores (2008) encontraram em cepas invasivas os biotipos I, IV e V. Segundo Satola, Napier, Farley (2008), a relação entre biotipo e patogenicidade têm atualmente produzido algumas conclusões conflitantes, visto que esta relação está baseada em dados da era pré-vacinal, onde o sorotipo b geralmente pertencia ao biotipo I e era o principal causador das doenças invasivas.

As cepas não invasivas apresentaram maior diversidade dispondo de representantes de seis (I, II, III, IV, V, VI) dos oito biotipos para Hi, porém os dois biotipos prevalentes foram o II e III. Nossos resultados estão de acordo com a publicação de Saito, Umeda, Yoshida (1999), na qual os autores afirmam que esses biotipos são os predominantes em isolados de nasofaringe. Satola, Napier, Farley (2008) também relatam que a maioria dos isolados não invasivos eram no período pré-vacinal, do biotipo II. Apesar dos nossos resultados, mesmo utilizando cepas do período pós-vacinal, estarem de acordo com o que ocorria antes da vacinação, Lancellotti e colaboradores (2008) não encontraram cepas do biotipo II entre seus isolados não invasivos, o que também pode caracterizar uma mudança na relação entre patogenicidade e o biotipo prevalente.

Os sorotipos encontrados pela sorotipificação foram todos confirmados pela PCR. No entanto, sete cepas apresentaram poliaglutinação, tendo aglutinado para três ou mais antissoros. Estas amostras foram então, consideradas NT pela sorologia e tiveram essa classificação confirmada pela PCR. Entre as 96 amostras desse estudo foram encontradas 15 (15,62%) cepas encapsuladas, incluindo quatro dos seis sorotipos (a,b,c,f), e 81 (84,38%) cepas HiNT.

Em relação às cepas encapsuladas, a maioria foi isolada de doenças invasivas, cujo LCR foi o material clínico de onde a maior parte foi obtida; seguido de sangue e lavado broncoalveolar. O sorotipo b foi o prevalente, seguido do sorotipo a, f e c, sendo a maior parte das cepas Hib, provenientes de LCR. Vale ressaltar, que a maioria das amostras sorotipo b

esteve presente nos primeiros anos do período pós-vacinal (2000-2002), enquanto que nos últimos anos (2006-2012) houve grande predomínio dos isolados encapsulados não b, principalmente Hia. Este sorotipo foi isolado de vários sítios invasivos como LCR, sangue e fragmento de osso (artrite séptica), assim como também mostram Shuel e colaboradores (2011), os quais obtiveram 98 cepas invasivas, sendo dez do sorotipo a, isoladas de LCR e sangue. Apenas uma cepa encapsulada foi isolada de doença não invasiva. Ela foi obtida de uma secreção traqueal e pertenceu ao sorotipo a. Lancellotti e colaboradores (2008) também encontraram uma cepa desse sorotipo causando pneumonia entre as 45 cepas do seu estudo.

Nossos resultados estão de acordo com publicações recentes do período pós-vacinal, inclusive no Brasil, que mostram a emergência dos sorotipos encapsulados não b em doenças invasivas causadas por Hi. Ribeiro e colaboradores (2003) chamaram a atenção para a emergência do sorotipo a após a introdução da vacina em 1999. Da mesma forma, vários autores encontraram entre suas cepas de estudo, Hia como a segunda maior causa de doenças invasivas entre os sorotipos encapsulados (DE ALMEIDA, et al., 2005, TSANG, et al., 2007; LANCELOTTI, et al., 2008; BENDER, et al., 2010; SHUEL, et al., 2010; ZANELLA, et al., 2011). Porém, alguns trabalhos apontam para o sorotipo f como sendo o segundo sorotipo prevalente (DWORKIN, PARK, BORCHARDT, 2007; ADAM, et al., 2010; KASTRIN, et al., 2010; MOJGANI, et al., 2011; RESMAN, et al., 2011; RUBACH, et al., 2011). Nossos resultados mostram o sorotipo f como o terceiro sorotipo prevalente, estando de acordo com Shuel e colaboradores (2011).

Ao relacionarmos os sorotipos com os biotipos, observamos que as cepas encapsuladas foram predominantemente do biotipo I, com cinco cepas do sorotipo b e duas do sorotipo f; seguido do biotipo II, com quatro cepas do sorotipo a, uma do sorotipo b e uma do sorotipo c. A maioria das cepas do sorotipo b foi do biotipo I o que está de acordo com os dados do período pré-vacinal (HARPER; TILSE, 1991; SAITO; UMEDA; YOSHIDA, 1999). Porém, alguns trabalhos publicados na era pós-vacinal também mostram o biotipo I sendo prevalente nas cepas de Hib, concordando com os nossos resultados (LOUNG, et al., 2004; TSANG, et al., 2007). Em relação ao sorotipo a, nossos resultados corroboram com os de Tsang e colaboradores (2007). Esses autores encontraram 36 cepas Hia entre 122 isolados de Manitoba no Canadá (2000-2006) e todas pertenceram ao biotipo II. Da mesma forma, quatro das cinco cepas Hia encontradas nesse estudo se incluem nesse biotipo.

Apesar dos dados incompletos sobre a idade, foi possível observar que a faixa etária em que se teve maior número de cepas encapsuladas foi a de crianças menores que cinco anos, tendo um predomínio de Hia. Estes resultados evidenciam uma provável troca na

epidemiologia de Hi, visto que no período pré-vacinal Hib era o sorotipo prevalente em indivíduos < 5 anos com doenças invasivas. Porém, vale ressaltar que cinco pacientes que tiveram doenças invasivas por cepas Hib não tiveram a idade fornecida, o que alteraria o número de cepas do tipo capsular predominante nessa faixa etária, visto que duas dessas cepas Hib foram provenientes de hospital pediátrico (Instituto Fernandes Figueira). Com relação aos adultos, o único representante encapsulado foi Hif, e foi isolado de um adulto com < 65 anos. (KASTRIN, et al., 2010; SHUEL, et al., 2010; RESMAN, et al., 2011; LIVORSI, et al., 2012)

Entre as crianças com faixa etária compatível ao início da vacinação contra Hib, 11 tiveram doença invasiva causada por HiNT, e as demais, doença causada por Hia e Hib. Devido ao fato de não termos tido acesso às carteiras de vacinação das mesmas, não pudemos afirmar que estas foram ou não vacinadas. Fizemos, desta forma, uma estimativa pela idade em que tiveram a doença e o ano em que a vacina foi implementada ao PNI. Assim, a presença de Hib em crianças que deveriam, pela idade, ter sido vacinadas, pode levar à uma suspeita de falha vacinal. Ribeiro e colaboradores (2007) encontraram no período de cinco anos após o início da vacinação, um único caso na Bahia, cuja criança recebeu as três doses da vacina conjugada contra Hib e mesmo assim contraiu meningite por Hib. Em outros países, esses relatos têm sido feitos e essa é uma grande preocupação com as vacinas hoje utilizadas (RIBEIRO, et al., 2007; LOWTHER, et al., 2012; GREENBERG-KUSHNIR, et al., 2012).

Nas cepas do Rio de Janeiro, que compõem este trabalho, não foram encontradas cepas mutantes deficientes de cápsula tanto Hib⁻, quanto Hia⁻, as quais não aglutinam com os seis antisoros para Hi encapsulados e também não amplificam, em PCR, para a região I do locus *cap*, o que pode levar a uma identificação equivocada quanto ao agente causador da doença. Porém, vários autores (LIMA, et al., 2010; MOJGANI, et al., 2010; GIUFRE, et al., 2011) descrevem esse tipo de Hi e algumas publicações mostram esses mutantes sendo isolados ao mesmo tempo em dois materiais clínicos (sangue e LCR) em um mesmo indivíduo, junto com o seu sorotipo encapsulado, o que pode ser uma estratégia desse micro-organismo para escapar do sistema imune do hospedeiro (OHKUSU; NASH; INDERLIED, 2005). Em 2013, nós, do Setor vacinas conjugadas contra Hib do INCQS, publicamos um caso como este com cepas provenientes de Pernambuco isoladas no período do presente estudo (2000-2012) (CALDEIRA, et al., 2013) (ANEXO D).

As cepas não tipáveis representaram a grande maioria nesse estudo, sendo 32 cepas NT isoladas de sítios invasivos e 49 de sítios não invasivos. O alto número de cepas NT causando doenças invasivas no período pós-vacinal é relatado por inúmeros trabalhos. *H. influenzae* NT, antes da introdução da vacina conjugada contra Hib, era causador de doenças

invasivas principalmente em idosos (VAN WESSEL, et al., 2011). Após a introdução da vacina conjugada contra Hib, HiNT tem sido encontrado como o maior causador desse tipo de doença, em todas as idades, sendo isolado de materiais clínicos como LCR, sangue, lavado broncoalveolar e líquido pelural (DE ALMEIDA, et al., 2005, DWORKIN, PARK, BORCHARDT, 2007; LANCELLOTTI, et al., 2008; ADAM, et al., 2010; BENDER, et al., 2010; RESMAN, et al., 2011; RUBACH, et al., 2011; ZANELLA, et al., 2011; LIVORSI, et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que houve um predomínio das cepas NT em todas as faixas etárias em doenças invasivas, estando de acordo desta forma, com os autores supracitados. Van Wessel e colaboradores (2011) observaram no período de 2001 a 2008 na Holanda, uma alta incidência dessas doenças causadas por cepas NT em grupos de idade específicos, como: recém-nascidos imediatamente após o parto, pessoas idosas e pacientes imunocomprometidos. De outro modo, em estudo nos Estados Unidos (1999-2008), Livorsi e colaboradores (2012) concluíram que doenças invasivas por Hi não-tipável estão, atualmente, associadas principalmente a adultos com doenças crônicas. Nossos resultados, no entanto, mostraram o maior número de doenças causadas por NT em indivíduos < 5 anos estando em desacordo com o último autor. Porém, além do presente estudo ter limitações relacionadas às idades dos pacientes, como dito anteriormente, 11 das cepas invasivas foram provenientes de hospitais exclusivamente pediátricos o que pode ter causado uma seleção nas idades nas faixas etárias em doenças invasivas por NT também.

Em doenças não invasivas a presença quase que total de HiNT foi um resultado esperado, na medida em que as cepas desse tipo de Hi fazem, em muitos casos, parte da microbiota normal do trato respiratório superior, e além disso, são grandes causadores de pneumonia. Estes resultados são fortalecidos com as publicações de muitos autores (SAITO, UMEDA, YOSHIDA, 1999; LOUNG, et al., 2004; LANCELLOTTI, et al., 2008; MOGANI, et al., 2010; QIN, et al., 2012).

Os biotipos encontrados em maioria nas cepas não-tipáveis foram os biotipos II e III, o que está de acordo com o que Saito, Umeda, Yoshida (1999) afirmaram sobre isolados NT. Além disso, nossos resultados também concordam com Tsang e colaboradores (2007) em um estudo em Manitoba e Shuel e colaboradores (2011) com cepas de British Columbia, ambos do Canadá, os quais acharam os biotipos II e III os prevalentes para as cepas HiNT. Ao contrário, Lancellotti e colaboradores (2008), mesmo trabalhando com cepas do Brasil, encontraram entre os isolados de HiNT os biotipos I, III, IV, VI e VIII, sendo o biotipo III,

entre esses, o em menor número, estando em desacordo mais uma vez, com os nossos resultados.

Em relação aos testes de sensibilidade, entre antibióticos utilizados (ampicilina, amoxicilina/ac.clavulânico, cloranfenicol, ceftriaxona, meropenem, sulfametoxazol – trimetoprim, ciprofloxacina, rifampicina e azitromicina), houve resistência somente a dois desses fármacos: ampicilina (AMP) e sulfametoxazol – trimetoprim (SUT). De acordo com Mohdzain e colaboradores (2012), em muitas partes do mundo, isolados de *Hi* resistentes a antibióticos β -lactâmicos são os mais relatados, seguidos por sulfametoxazol – trimetoprim, o que está de acordo com esse estudo.

Os resultados para os testes de sensibilidade apresentaram diferença quando se comparou as cepas isoladas de doenças invasivas com as isoladas de doenças não invasivas. No total, oito cepas invasivas apresentaram resistência pelo método da Concentração Inibitória Mínima (duas à AMP, duas à AMP e SUT e quatro ao SUT). As cepas não invasivas, pelo mesmo método, apresentaram um total de resistência de 22 cepas (três à AMP, 17 ao SUT e duas à AMP e SUT). Nos dois casos (invasivas, e não invasivas) houve um predomínio de resistência ao SUT e os resultados relacionados à ampicilina foram semelhantes.

Nenhum dos isolados encapsulados apresentou resistência para os antibióticos supracitados, o que não está em concordância com os resultados de Luong e colaboradores (2004) e Shuel e colaboradores (2010). Os primeiros autores encontraram entre quatro cepas encapsuladas, três do sorotipo b, as quais todas foram resistentes à AMP. Enquanto que os últimos autores encontraram resistência em duas cepas encapsuladas (uma b e uma f) à SUT. Ao contrário desses pesquisadores nós tivemos resistência apenas entre os isolados NT. O maior número de isolados não tipáveis resistentes pode ser explicada, segundo Mohd-Zain e colaboradores (2012), não só pela capacidade dessas cepas aderirem e invadirem as células epiteliais respiratórias, como também pela capacidade das mesmas formarem biofilmes, o que reduz a eficácia de uma antibioticoterapia.

Muitos trabalhos têm mostrado que o principal mecanismo de resistência à AMP é a produção de β -lactamase (LUONG, et al., 2004; KASTRIN, et al., 2010; GIUFRÈ, et al., 2011; QIN, et al., 2012; PARK, et al., 2013). Nossos resultados também mostraram o predomínio da produção de β -lactamase em cepas resistentes à ampicilina, pois oito das nove cepas que apresentaram resistência a este antibiótico pela CIM foram positivas para o teste desta enzima.

Em relação ao SUT, este estudo mostrou a maior prevalência de resistência a este antibiótico tanto em doenças invasivas, como não invasivas. Trabalhos citam a resistência a este antibiótico como a segunda resistência mais frequente (MOHD-ZAIN, et al., 2012), porém nossos resultados concordam com de Almeida e colaboradores (2006), os quais encontraram para o período pós-vacinal (2000-2003), entre 76 isolados, o maior número deles (65,8%) resistentes para o SUT. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a OMS e o Ministério da Saúde brasileiro recomendaram, na década de 1990, este antibiótico como droga de primeira escolha para tratamento empírico de muitos casos de doenças do trato respiratório, inclusive pneumonia, fazendo com que o SUT fosse extremamente utilizado no Brasil, proporcionando, dessa forma, uma alta taxa de resistência bacteriana a esta droga (DE ALMEIDA, et al., 2006).

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das 96 cepas por PFGE evidenciou uma grande diversidade genética. Foram obtidos 41 genótipos ou *clusters*, cujos pulsotipos foram nomeados de A1 a T2 (genótipo com duas ou mais cepas) e AA1 a AX1 (genótipo individual), considerando-se uma similaridade superior a 80%. Os genótipos prevalentes foram: A (11 cepas), B (10 cepas), C (sete cepas), D (cinco cepas), E (cinco cepas) e F (cinco cepas). Porém, os genótipos compostos por duas ou uma cepa foram os mais frequentes. Muitos trabalhos com diferentes técnicas de tipificação, inclusive PFGE, têm mostrado essa diversidade em *Haemophilus influenzae*, principalmente no que se diz respeito às cepas NTs (SAITO, UMEDA, YOSHIDA, 1999; KASTRIN, et al., 2010; LIMA, et al., 2010; SHUEL, et al., 2010 a; PARK, et al., 2013).

O genótipo A teve tanto cepas invasivas como não invasivas, cuja quase totalidade delas apresentou biotipo II. Todas essas cepas foram não tipáveis. Porém, este não foi o único agrupamento que apresentou cepas invasivas e não invasivas. Essa relação de similaridade entre as cepas invasivas e não invasivas é relatada em alguns trabalhos. Saito, Umeda, Yoshida (1999) encontraram cepas com o mesmo perfil sendo isoladas do líquido, sangue e nasofaringe do mesmo paciente. Lancellotti e colaboradores (2008) afirmam que independente do método utilizado para diferenciar cepas não invasivas de invasivas, eles mostram uma identidade genética entre esses dois tipos de cepas, o que sugere um ancestral comum entre eles. Além disso, é sabidamente conhecido que infecções invasivas causadas por Hi, incluindo meningite, geralmente são causadas pela disseminação da bactéria, quase sempre da nasofaringe para a corrente sanguínea e subsequentemente para os outros sítios do corpo (SAITO, UMEDA, YOSHIDA, 1999).

O genótipo supracitado também apresentou oito cepas com o mesmo pulsotipo (A1), sendo sete invasivas, provenientes do mesmo hospital, com o mesmo biotipo (II), isoladas em 2000 e 2001, e uma cepa não invasiva, também com o biotipo II e isolada em 2006. A presença da cepa não invasiva entre as demais invasivas reforça o que foi citado anteriormente, e o fato desta ter sido isolada em 2006, quatro a cinco anos após as outras semelhantes, demonstra que este clone possivelmente continuou circulando na população, pelo menos até esse ano (2006).

Nós sugerimos que as sete cepas com o pulsotipo A1 possam ter sido originárias de um pequeno surto. Segundo Tenover e colaboradores (1995), os micro-organismos envolvidos em um surto e/ou epidemia devem apresentar padrões indistinguíveis, o que está de acordo com os nossos resultados. Porém, nossos dados não foram suficientes para confirmação dessa informação.

Ao compararmos o genótipo A (biotipo II predominante) com o B, D e F, os quais também apresentaram somente cepas não tipáveis, observou-se uma diferença nos biotipos prevalentes. O genótipo B apresentou uma diversidade maior, com cepas HiNT dos biotipos II e III. No genótipo D todas as cepas pertenceram ao biotipo III, e no genótipo F todas as cepas foram pertencentes ao biotipo I. Esses resultados sugerem uma possível separação entre os biotipos, o que está de acordo com Lancellotii e colaboradores (2008) que encontraram uma separação semelhante entre os biotipos, utilizando ribotipagem.

A maioria das cepas encapsuladas, pertencentes ao mesmo sorotipo, ficou agrupada em um mesmo *cluster* (genótipos C, E e T). Porém, três cepas do sorotipo b e uma do sorotipo a, apresentaram-se fora de seus *clusters*. Este resultado está de acordo com Kastrin e colaboradores (2010), os quais encontraram alta homogeneidade genética entre as cepas encapsuladas.

As cepas Hia formaram o genótipo E, junto com uma cepa HiNT. Três das quatro cepas do sorotipo a apresentaram perfis idênticos (pulsotipo E1) e a outra cepa do mesmo sorotipo incluída neste *cluster* (apresentou a ausência da primeira banda e o aparecimento de duas bandas abaixo. Nós sugerimos que a cepa com alteração tenha sofrido alguma mutação, a qual ocasionou o corte deste fragmento pela enzima *SmaI*, o que levou ao aparecimento dos dois fragmentos de menor tamanho, visto que Tenover e colaboradores (1995) e Magalhães e colaboradores (2005) afirmam que se um novo sítio é criado por uma mutação, o novo perfil apresentará uma banda a menos em relação à cepa epidêmica e duas bandas menores surgirão.

Todas as quatro cepas Hia pertenceram ao biotipo II e foram isoladas em diferentes hospitais do Rio de Janeiro e em diferentes anos, do período que vai de 2006 a 2010, o que

sugere que possivelmente um mesmo clone circulante foi o causador das doenças desse estudo.

As cepas encapsuladas do sorotipo b (genótipo C) apresentaram-se mais heterogêneas do que as do sorotipo a, incluindo cinco pulsotipos (C1 a C5). Vale ressaltar, que o pulsotipo (C1) das duas cepas de Pernambuco, Hib e Hib⁻ foi o mesmo que de uma cepa originária do Rio de Janeiro, o que sugere que a circulação das cepas não é restrita à cidade do Rio de Janeiro. Ribeiro e colaboradores (2003), também encontraram cepas de outras regiões brasileiras com os perfis idênticos aos isolados de Salvador, o que reforça que a disseminação desses grupos clonais não é um fenômeno restrito a uma região.

O perfil de PFGE das cepas que produziram β -lactamase foi bem variado, apresentando somente um genótipo com duas cepas (W). Na Eslovênia, Kastrin e colaboradores (2010) ao analisarem 11 cepas resistentes à ampicilina produtoras de β -lactamase por este método, concluíram que suas cepas também não eram geneticamente relacionadas.

7 CONCLUSÃO

A identificação das cepas realizada previamente nos hospitais de origem foi confirmada nesse estudo, o que mostrou uma boa execução das técnicas laboratoriais hospitalares frente dificuldade de isolamento de Hi, pela exigência nutricional deste agente.

Apesar dos dados incompletos concluímos que: o sexo masculino predominou, as crianças menores que cinco anos foram a maioria em doenças invasivas; e nas doenças não invasivas, a maior porcentagem dos pacientes tinham idade maior que 70 anos, o que mostra a vulnerabilidade dos idosos em relação a infecções do trato respiratório por HiNT.

O material clínico mais frequente nas doenças invasivas foi o sangue.

Quanto à biotipificação, tanto ao relacionarmos as cepas invasivas e não invasivas com os biotipos, quanto os sorotipos com os biotipos, observamos que os resultados foram, em sua maioria, condizentes com a literatura atual.

A maioria das cepas encapsuladas foi isolada de doenças invasivas, cujo LCR foi o material clínico de onde a maior parte dessas cepas foi obtida. O sorotipo b foi o mais prevalente, seguido do sorotipo a, f e c, sendo a maior parte das cepas Hib proveniente de LCR.

As cepas sorotipo b foram isoladas no começo do período pós-vacinal, enquanto que os outros sorotipos tiveram um aumento em seus números no final do período de estudo. Essa situação nos mostra que no Rio de Janeiro há, como em outras partes do mundo, um aumento dos Hi não b e NT.

As cepas não tipáveis, constituíram a grande maioria desse estudo, sendo isoladas de todas as idades, e de materiais clínicos como LCR, sangue, lavado broncoalveolar e líquido pleural.

No presente trabalho, não encontramos cepas mutantes deficientes de cápsula tanto Hib⁻, quanto Hia⁻ entre as cepas do Rio de Janeiro.

Houve resistência somente a dois fármacos: ampicilina (AMP) e sulfametoxazol – trimetoprim (SUT), sendo a resistência à ampicilina basicamente pela produção de β -lactamase, mostrando que este é ainda o principal mecanismo de resistência a esse antibiótico.

Os padrões de PFGE para as 96 cepas utilizadas no estudo evidenciou uma grande diversidade genética, porém oito cepas HiNT de um mesmo genótipo apresentaram o mesmo pulsotipo, das quais sugerimos que sete sejam provenientes de um pequeno surto, pois foram isoladas no mesmo hospital e em um período próximo. O fato de encontrarmos uma cepa não

invasiva com o mesmo pulsotipo nos faz concluir que as cepas NT devem ser vistas como patógenos capazes de causar doenças invasivas graves e que, portanto, devem ser investigadas.

Três cepas Hia apresentaram o mesmo pulsotipo, as quais foram isoladas em anos diferentes do período de estudo, o que nos sugere que um mesmo clone de Hia possivelmente circula no Rio de Janeiro causando doenças invasivas.

As cepas do sorotipo b apresentaram-se mais heterogêneas, porém uma cepa do Rio de Janeiro apresentou o mesmo pulsotipo que duas cepas de Pernambuco, mostrando que um mesmo clone pode estar circulando no Brasil.

Concluimos, portanto, que é necessário o monitoramento das cepas de Hi circulantes no Rio de Janeiro, pela importância geográfica e econômica deste município. Tal conduta deve ser estendida para todo país visando à compreensão das possíveis alterações dos sorotipos prevalentes na atualidade, que certamente orientará em condutas epidemiológicas, na produção de novas vacinas, aprimoramento das existentes e no uso de antibióticos, o que resultará em impacto na saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ADAM, H. J., et al. Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontário, Canada: Evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. **Vaccine**. v. 28, p. 4073-4078, 2010.
- AGRAWAL, A.; MURPHY, T. F. *Haemophilus influenzae* Infections in the *H. influenzae* Type b Conjugate Vaccine Era. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n.11, p. 3728-3732, 2011.
- ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Versão Preliminar. 1 ed. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 381p.
- ANVISA. Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico [2007]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas5.htm Acesso em 16 de abril de 2013.
- ARACIL, B., et al. Molecular Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Type b Causing Vaccine Failures in the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 5, p. 1645-1649, 2006.
- BARBOSA, A. R., et al. Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, p. 788-796, 2011.
- BARRETO, M. L. Epidemiologia. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 111-116.
- BATALHA, A., et al. Changes in *Haemophilus influenzae* capsule locus: possible emergence of novel variants in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 68, n. 2, p. 97– 102. 2010.
- BAUER, A. W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BENDER, J. M., et al. Invasive *Haemophilus* Disease in Utah Children: An 11–Year Population-Based Study in the Era of Conjugate Vaccine. **Clinical Infectious Diseases**. v. 50, p. 41-46, 2010.

BERENSON, C. S., et al. Outer Membrane Protein P6 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Is a Potent and Selective Inducer of Human Macrophage Proinflammatory Cytokines. **Infection and Immunity**. v. 73, n. 5, p. 2728-2735, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Meningite. Documentos “on line” [2006]. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm>. Acesso em 15 de junho de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8ª ed. 2010a. 448p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Proposta para Introdução da Vacina Pneumocócica 10-Valente (Conjugada) No Calendário Básico de Vacinação da Criança**. Brasília 2010b. 18p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Técnico da Introdução da Vacina Pentavalente**. Brasília, 2012. 16p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Meningite: Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação- Sinan Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/meningite/bases/meninbrnet.def> Acesso em: 20 de fevereiro 2013.

BINKS, M. J., et al. Molecular Surveillance of True Nontypeable *Haemophilus influenzae*: An Evaluation of PCR Screening Assays. **PLoS ONE**. v. 7, n. 3. p.1-8, 2012.

BRICKS, L.F, et al. Há necessidade de reforço da vacina contra *Haemophilus influenzae* no Brasil? **Pediatria**. v. 25, n. 1/2. p. 71-72, 2003.

CALDEIRA, N. G. S., et al. *Haemophilus influenzae* serotype b and a capsule-deficient type mutant (b⁻) invasive disease in a partially vaccinated child in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, p. 655-657, 2013.

CAMPOS, J. M. *Haemophilus*. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p.604 - 613.

CERQUETTI, M. Molecular Typing Bacterial Infections *Haemophilus* spp. In: DE FILIPPIS, I.; MCKEE, M. L. **Molecular Typing in Bacterial Infections**. New York: Springer Science + Business Media, 2013. p. 193-210.

CLSI M100S18: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, Pennsylvania. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

CURRAN, R.; HARDIE, K. R.; TOWNER, K. J. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of insertion mutations in the transferring-binding system of *Haemophilus influenzae* type b. **Journal of Medical Microbiology**. v. 41, p. 120-126, 1994.

DAVIS, G. S., et al. Use of *bexB* To Detect the Capsule Locus in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 7, p. 2594-2601, 2011.

DE ALMEIDA, A. E. C. C., et al. Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, p. 777-781, 2005.

DE ALMEIDA, A. E. C. C., et al. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 54, p. 57-62, 2006.

DE ALMEIDA A.E.C.C.; MARZOCHI, K.B.F. Infecção por *Haemophilus*. In: LOPES, A.C. **Tratado de Clínica Médica**. São Paulo: Rocca, p. 4024 -4030, 2006.

DWORKIN, M. S.; PARK, L.; BORCHARDT, S. The Changing Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Especially in Persons ≥ 65 Years Old. **Clinical Infectious Disease**. v. 44, p. 810-816, 2007.

ERWIN, A. L., et al. Characterization of Genetic and Phenotypic Diversity of Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**. v. 73, n. 9, p. 5853-5863, 2005.

FALLA, T. J., et al. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2382-2386, 1994.

GIUFRÈ, M., et al. Ten years of Hib vaccination in Italy: Prevalence of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* among invasive isolates and the possible impact on antibiotic resistance. **Vaccine**. v. 29, n. 22, p. 3857-3862, 2011.

GREENBERG-KUSHNIR, N., et al. *Haemophilus influenzae* Type b Meningitis in the Short Period after Vaccination: A Reminder of the Phenomenon of Apparent Vaccine Failure. **Hindawi Publishing Corporation**. p. 1-3, 2012.

- HARGREAVES, R.M.M.P.E., et al. Changing patterns of invasive *Haemophilus influenzae* disease following introduction of the Hib vaccination programme. **British Medical Journal**. v. 312, p. 160-161, 1996.
- HARPER, J. J.; TILSE, M. H. Biotypes of *Haemophilus influenzae* that are associated with noninvasive infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, n. 11, p. 2539-2542, 1991.
- HEALTH PROTECTION AGENCY . Identification of *Haemophilus* species and the HACEK group of organisms. UK **Standards for Microbiology Investigations**. ID 12, n. 2.2, [2011]. Disponível em: <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.
- HEDEGAARD, J., et al. Phylogeny of the genus *Haemophilus* as determined by comparison of partial *infB* sequences. **Microbiology**. v. 147, p. 2599-2609, 2001.
- JACUPS, S. P. The continuing role of *Haemophilus influenzae* type b carriage surveillance as a mechanism for early detection of invasive disease activity. **Human Vaccines**. v. 7, n. 12, p. 1254-1260, 2011.
- KAPOGIANNIS, B. G., et al. Invasive Infections with *Haemophilus influenzae* Serotype a Containing an *IS1016-bexA* Partial Deletion: Possible Association with Virulence. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 97-103, 2005.
- KASTRIN, T., et al. Characterization of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Slovenia, 1993-2008. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 29, p. 661-668, 2010.
- KILIAN, M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. **Journal of General Microbiology**. v. 93, n. 1, p. 9-62, 1976.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 290, n. 1, p. 27-35. 2000.
- KONEMAN, E.W. et al. *Haemophilus*. In: **Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI. p. 373-396, 2001.
- KONEMAN, E. W. et al. Bacilos Gram- Negativos Exigentes *Haemophilus*. **Koneman Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 423-446, 2008.

KROLL J.S.; MOXON E.R. Capsulation and gene copy member at the *cap* locus of *Haemophilus influenzae* type b. **Journal of Bacteriology**. v. 170, n. 2, p. 859-864, 1988.

KROLL, J. S., et al. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. **Molecular Microbiology**. v. 4, p. 1853-1862, 1990.

LACHTERMACHER, A. P., et al. Notificações de Meningite no Hospital Federal dos Servidores do Estado em um Contexto de Integração com o Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião. Hospital dos Servidores do Estado/Boletim Epidemiológico 44[2013]. Disponível em: <http://www.hse.rj.saude.gov.br/profissional/boletim/bol44/meningi.asp> Acesso em: 15 de março de 2013.

LADHANI, S. N. Two Decades of Experience With the *Haemophilus influenzae* Serotype b Conjugate Vaccine in the United Kingdom. **Clinical Therapeutics**. v. 34, n. 2, p. 385-399, 2012.

LANCELLOTTI, M., et al. Ribotyping, Biotyping and Capsular Typing of *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Patients in Campinas, Southeast Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 12, n. 5, p. 430 – 437, 2008.

LEDEBOER, N.A.; DOERN, G.V. *Haemophilus*. In: VERSALOVIC, J., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. Washington: ASM Press, 2011. v. 1, p. 588-600.

LIMA, J. B. T., et al. Poor Clinical for Meningitis Caused by *Haemophilus influenzae* Serotype A Strains Containing the IS1016-*bexA* Deletion. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 202, n. 10, p. 1577-1584, 2010.

LIVORSI, D. J., et al. Invasive *Haemophilus influenzae* in the United States, 1999-2008: Epidemiology and outcomes. **Journal of Infection**. v. 65, n. 6, p. 496-504, 2012.

LOUNG, D. C., et al. Serotypes of *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Pediatric Patients with Respiratory Tract Infections. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 202, p. 245-254, 2004.

LOWTHER, S. A., et al. *Haemophilus influenzae* type b infection, vaccination, and *H. influenzae* carriage in children in Minnesota, 2008-2009. **Epidemiology and Infection**. v. 140, n. 3, p. 566-574, 2012.

LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [2013]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/h/haemophilus.html>. Acesso em: 10 de abril de 2013.

MAGALHÃES, V. D., et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v. 64,. n. 2, p. 155-161, 2005.

MARIN, J. M.; SILVA, M. E. N. B. Ocorrência de *Haemophilus influenza* em crianças atendidas em creches. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 26, n. 3, p. 167-174, 2005.

MARRS, C. F., et al. *Haemophilus influenza* – Human Specific Bacteria. **Frontiers in Bioscience**. v. 6, p. 41-60, 2001.

MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. *Haemophilus influenzae* e outras espécies do gênero. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 251-256.

MICROBIOLOGY IN PICTURES [2013]. Disponível em: <http://www.microbiologyinpictures.com/haemophilus%20influenzae.html> Acesso em: 13 de março de 2013.

MIRANZI, S., et al. Impact of the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program on HiB meningitis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 23, n. 7, p. 1689-1695, 2007.

MOHD-ZAIN, Z., et al. Antibiotic susceptibility profile of *Haemophilus influenza* and transfer of co-trimoxazole resistance determinants. **Tropical Biomedicine**. v. 29, n. 3, p. 372-380, 2012.

MOJGANI, N., et al. Biotyping, Capsular Typing, and Antibiotic Resistance Pattern of *Haemophilus influenza* Strains in Iran. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v.64, p. 66-68, 2011.

MUNKUNDAN, D., et al. Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 3207-3217, 2007.

MURPHY, T. F., et al. A Clonal Group of Nontypeable *Haemophilus influenzae* with Two IgA Proteases Is Adapted to Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Plos One**. v. 6, n. 10, p. 1-9, 2011.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON IMMUNIZATION (NACI). **Canadian Immunization Guide**. 7.ed. [S.l.], 2006.

NORONHA, C. P., et al. Epidemiologia da doença meningocócica na cidade do Rio de Janeiro: modificações após vacinação contra os sorogrupos B e C. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 13, n. 2, p. 295-303, 1997.

NORSKOV-LAURITSEN, N., et al. Multilocus sequence phylogenetic study of the genus *Haemophilus* with description of *Haemophilus pittmaniae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 449-456, 2005.

NORSKOV-LAURITSEN, N., et al. Identification of haemolytic *Haemophilus* species isolated from human clinical specimens and description of *Haemophilus sputorum* sp. Nov. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 302, n. 2, p. 78-83, 2012.

O` CALLACHAN, C. H., et al. Novel Method for Detection of β -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate. **Antimicrobial Agents Chemother**. v. 1, n. 4, p. 283-288, 1972.

OHKUSU, K.; NASH, K. A.; INDERLIED, C. B. Molecular characterization of *Haemophilus influenzae* type a and untypeable strains isolated simultaneously from cerebrospinal fluid and blood: novel use of quantitative real-time PCR based on the *cap* copy number to determine virulence. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 11, p. 637-643, 2005.

PARK, C., et al. Genetic Diversity of the *ftsI* Gene in β -Lactamase-Nonproducing Ampicillin-Resistant and β -Lactamase-Producing Amoxicillin-/Clavulanic Acid-Resistant Nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Children in South Korea. **Microbial Drug Resistance**. v. 19, p. 1-7, 2013.

PELTOLA, H., et al. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21 st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use polysaccharide vaccine and decade after the advent of conjugates. **Clinical Microbiology Review**. v. 13, n. 2, p. 302-317, 2000.

PELTON, S. I., et al. Panel 6: Vaccines. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**. v. 148, n. 4s, p. 90-101, 2013.

PEREIRA, G. A. **Boletim Informativo do Diagnóstico Laboratorial das Meningites Bacterianas**. p. 11, Brasil, 2010.

PERIC, M., et al. Effect of an Efflux Mechanism and Ribosomal Mutations on Macrolide Susceptibility of *Haemophilus influenzae* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 3, p. 1017-1022, 2003.

PETTIGREW, M. M., et al. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Typing, and Automated Ribotyping To Assess Genomic Variability among Strains of Nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 2, p. 660-662, 2002.

PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 53, n. 4, p. 471-492, 1931.

PRESTON, A., et al. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. **Criticals Reviews in Microbiology**. v.22, n. 3, p.139-180, 1996.

QIN, L., et al. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from community-acquired respiratory tract infection patients in Shanghai City, China. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 18, n. 4, p. 508-514, 2012.

RESMAN, F., et al. Invasive disease caused by *Haemophilus influenzae* in Sweden 1997-2009; evidence of increasing incidence and clinical burden of non-type b. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, p. 1638-1645, 2011.

RIBEIRO, G. S., et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) Meningitis and Emergence of Serotype Replacement with Type a Strains after Introduction of Hib Immunization in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 187, p. 109-116, 2003.

RIBEIRO, G. S., et al. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**. v. 25, p. 4420-4428, 2007.

ROSSI, F. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo. Ed. Atheneu. 2005.

RUBACH, M. P., et al. Increasing Incidence of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Adults, Utah, USA. **Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid**. v. 17, n. 9, p. 1645-1650, 2011.

SAITO, M., et al. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal Clinical Microbiology**. v. 37, p. 2142-2147, 1999.

SATOLA, S. W.; SCHIRMER P. L.; FARLEY, M. M. Complete sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. **Infection and Immunity**. v. 71, n. 6, p. 3639-3644, 2003.

SATOLA, S. W., et al. Capsule Gene Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae*: Accuracy of Serotyping and Prevalence of IS1016 among Nontypeable Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 10, p. 3230-3238, 2007.

SATOLA, S. W.; NAPIER, B.; FARLEY, M. M. Association of IS1016 with the *hia* Adhesin Gene and Biotypes V and I in Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 11, p. 5221-5227, 2008.

SCHOOLS, L. M., et al. Two variants among *Haemophilus influenzae* 423 serotype b strains with distinct *bcs4*, *hcsA* and *hcsB* genes display 424 differences in expression of the polysaccharide capsule. **BMC Microbiol** v. 4258, p. 1-11, 2008.

SHIMOL, S. B.; DAGAN, R. *Haemophilus influenzae*: Still a Relevant Invasive Pathogen. **Pediatric Infectious Disease Unit**. v. 14, p.432-434, 2012.

SHUEL, M., et al. Invasive *Haemophilus influenzae* in British Columbia: non-Hib and nontypeable strains causing disease in children and adults. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 15, n. 3, p. 167-173, 2011.

SHUEL, M., et al. Characterization of nontypeable *Haemophilus influenzae* collected from respiratory infections and invasive disease cases in Manitoba, Canada. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v. 58, p. 277-284, 2010.

SILVEIRA, A. J. T. A medicina e a influenza espanhola de 1918. **Tempo**. n.19, p. 91-105, 2005.

SINUSITIS UNDERSTOOD: Infectious causes (viruses, bacteria, fungi) of sinusitis [2011]. Disponível em: <http://sinusitisunderstood.blogspot.com/p/infectious-causes-viruses-bacteria.html>. Acesso em 12 de junho de 2011.

SOARES, S., et al. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 168, p. 158-163, 1993.

TEIXEIRA, C. F.; COSTA, E. A. Vigilância da Saúde e Vigilância Sanitária: Concepções, estratégias e práticas. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2005-2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/seminario/semin_20.pdf. Acesso em 26 de outubro de 2011.

TENOVER, F. C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal Clinical Microbiology**. v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TOROPAINEN, M., et al. Pneumococcal *Haemophilus influenzae* Protein D Conjugate Vaccine Induces Antibodies That Inhibit Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Activity of Protein D. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 10, p. 4546-4553, 2008.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. DE *Haemophilus* In. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1991. p. 133-135.

TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. *Haemophilus influenzae* e Outras Espécies do Gênero In: **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 247-253.

TRISTAM, S.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 2, p. 368-389, 2007.

TSANG, R. S. W., et al. Characterization of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Manitoba, Canada, 2000 – 2006: Invasive Disease due to Non - Type b Strains. **Clinical Infectious Diseases**. v.44, p.1611-1614, 2007.

TSUJI, T., et al. Detection of IgA protease from *Haemophilus influenzae* by immunoblotting. **European Journal Epidemiology**. v.5, n. 2, p.199-201, 1989.

ULANOVA, M.; TSANG, R. S. W. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: Changing epidemiology and host–parasite interactions in the 21st century. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 9, p. 594-605, 2009.

VAN KETEL, R. J., et al. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. **Journal of Medical Microbiology**. v. 3, p. 271-276, 1990.

VAN WESSEL, K., et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* Invasive Disease in the Netherlands: A Retrospective Surveillance Study 2001-2008. **Clinical Infectious Diseases**. v. 53, n. 1, p. e1-e7, 2011.

VFDB: Virulence Factors Database [2003]. Disponível em: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?Keyword=Adherence&Species=&Genus=Haemophilus> Acesso em 06 de janeiro de 2012.

WALDMAN, E. A.; DE FREITAS, F. R. M. A Vigilância epidemiológica e sua interface com as práticas da vigilância sanitária. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2005-2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/seminario/Vig_Epi_Sanit_Eliseu.pdf Acessado em 26/10/2011.

WARD, J.L. Invasive infections due to *Haemophilus influenzae* serotype f (Hif) – is Hif an emerging pathogen? **Clinical Infectious Diseases**. v.22, n.6, p.1077-1081, 1996.

WASHINGTON, D. C. Dados por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* em processos invasores. **Informe Regional de SIREVA II, 2011**. 2012.

ZANELLA, R. C., et al. Changes in serotype distribution of *Haemophilus influenzae* meningitis isolates identified through laboratory-based surveillance following routine childhood vaccination against *H. influenzae* type b in Brazil. **Vaccine**. v. 29, p. 8937-8942, 2011.

ANEXO A – Características diferenciais de espécies de *Haemophilus*.

Espécies de <i>Haemophilus</i>	Requerimento para:		Fermentação de:					Hemólise
	Fator X	Fator V	Glicose	Sacarose	Lactose	Manose	Xilose	
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>H. aegyptius</i>	+	+	+ ^a	-	-	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	-	-	-	RV	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	RV	-	-	-	-	- ^b
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>H. pittmaniae</i>	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+

^a Uma reacção positiva ocorre retardada em mais de 90% das cepas; ^b O desenvolvimento de hemólise ocorre retardadamente em 11 a 89% das cepas; +, positivo; -, negativo; RV, reacção variável.

Fonte: adaptada de Ledebor, Doern (2011).

ANEXO B – Protocolo de confecção das placas com diferentes concentrações de ampicilina para determinação da Concentração Inibitória Mínima.

1 - Preparo da base HTM para o teste de CIM da ampicilina.

Preparou-se o meio HTM (base Mueller-Hinton (OXOID), suplementada com 15µg/mL de hemina (fator X), 15µg/mL de dinucleotídeo de nicotinamida adenina – NAD (fator V) e 5mg/mL de extrato de levedura) e envasou-se em 17,2 mL em tubos 20 x 150 com rosca.

2- Preparo das soluções de ampicilina (Tab.) :

Solução estoque (6400µg/mL)			
	Quantidade de Ampicilina (anidra) FB (pó) 0,0320 g	Quantidade de solvente (tampão fosfato pH 8,0) 5,0 mL	
Diluições seriadas	Quantidade de solução concentrada	Quantidade de diluente (tampão fosfato pH 6,0)	Concentração final
Solução 1	1,0 mL de solução estoque	9,0 mL	(640µg/mL)
Solução 2	5,0 mL de solução 1	5,0 mL	(320 µg/mL)
Solução 3	5,0 mL de solução 2	5,0 mL	(320 µg/mL)
Solução 4	5,0 mL de solução 3	5,0 mL	(80 µg/mL)
Solução 5	5,0 mL de solução 4	5,0 mL	(40 µg/mL)
Solução 6	5,0 mL de solução 5	5,0 mL	(20 µg/mL)
Solução 7	5,0 mL de solução 6	5,0 mL	(10 µg/mL)
Solução 8	5,0 mL de solução 7	5,0 mL	(5 µg/mL)

3- Preparo das placas de HTM com ampicilina:

Placas	Soluções	Concentração final de antibiótico
Placa Pré (controle de esterilidade inicial)	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de água estéril	-----
Placa 1	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 1	64 µg/mL
Placa 2	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 2	32µg/mL
Placa 3	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 3	16µg/mL
Placa 4	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 4	8,0µg/mL
Placa 5	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 5	4,0µg/mL
Placa 6	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 6	2,0µg/mL
Placa 7	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 7	1,0µg/mL
Placa 8	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de solução 8	0,5µg/mL
Placa Pós (controle de esterilidade final)	- 17,2 de HTM - 0,6 mL de solução de NAD - 0,2 mL de Suplemento VX (Laborclin – LB) - 2,0 ml de água estéril	-----

4- Inoculação das cepas:

As cepas foram inoculadas em todas as placas, através de uma suspensão bacteriana em caldo BHI suplementado com os fatores VX, ajustada à escala de 0.5 McFarland. Foram utilizados dois microlitros em cada placa, as quais então, foram incubadas a uma atmosfera de 5% de CO₂, a 35-37°C, por 20 a 24 horas.

ANEXO C– Iniciadores empregados na determinação de gênero, espécie e tipo capsular de
H. influenzae.

Nome dos iniciadores	Iniciadores (5' - 3')	Gene alvo	Produto (bp)	Referência
HI-1	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	<i>bexA</i>	343	Van Ketel et al., 1990.
HI-2	TGTCCATGTCTTCAAATGATG			
Hia-1	CTACTCATTGCAGCATTTGC	<i>acs</i>	250	
Hia-2	GAATATGACCTGATCTTCTG			
Hib-1	GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC	<i>bcs</i>	480	
Hib-2	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA			
Hic-1	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	<i>ccs</i>	250	
Hic-2	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA			
Hid-1	TGATGACCGATACAACCTGT	<i>dcs</i>	150	Falla et al., 1994.
Hid-2	TCCACTCTTCAAACCATTCT			
Hie-1	GGTAACGAATGTAGTGGTAG	<i>ecs</i>	1,350	
Hie-2	GCTTACTGTATAAGTCTAG			
Hif-1	GCTACTATCAAGTCCAAATC	<i>fes</i>	450	
Hif-2	CGCAATTATGGAAGAAAGCT			
Hip6-F	ACTTTTGGCGGTTACTCTGT	<i>p6</i>	273	Van Ketel et al., 1990.
Hip6-R	TGTGCCTAATTTACCAGCAT			

ANEXO D – Publicação referente à dissertação.

Nome do arquivo: NATHALIA-dissertação final 230813-CORRIGIDA
Pasta: C:\Documents and Settings\nathalia.caldeira\Desktop
Modelo: C:\Users\Hib\Downloads\correções dissertação final
100813.dot
Título: 1
Assunto:
Autor: Hib
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 23/8/2013 10:25
Número de alterações: 11
Última gravação: 23/8/2013 11:46
Gravado por: nathalia.caldeira
Tempo total de edição: 85 Minutos
Última impressão: 9/9/2013 15:00
Como a última impressão
Número de páginas: 105
Número de palavras: 92.220 (aprox.)
Número de caracteres: 525.656 (aprox.)