

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Cepas de *Haemophilus influenzae* circulantes, antes e após a utilização da vacina contra o sorotipo b, e o contexto epidemiológico das doenças por *Haemophilus* no Brasil.

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida.

Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado:

Prof. \_\_\_\_\_ (USP/FIOCRUZ)

Dr. José da Rocha Carvalheiro

Prof. \_\_\_\_\_ (IMPPG/UFRJ)

Dr. Milton de Uzeda

Prof. \_\_\_\_\_ (IMPPG/UFRJ)

Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Prof. \_\_\_\_\_ (IPEC/FIOCRUZ)

Dra. Keyla Belízia Feldman Marzochi

Prof. \_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)

Dra.. Maria Helena Simões Villas-Bôas

Orientadores: \_\_\_\_\_

Dra. Keyla Belízia Feldman Marzochi  
IPEC/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
Dr. André Luís Gemal.  
INCQS/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2005

## FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Antonio Eugenio Castro Cardoso

Cepas de *Haemophilus influenzae* circulantes, antes e após a utilização da vacina contra o sorotipo b, e o contexto epidemiológico das doenças por *Haemophilus* no Brasil./ Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2005.

xviii, 144p. il., tab

Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2005.

Orientadores: Keyla Belízia Feldman Marzochi e André Luís Gemal.

1. *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus influenzae* b (Hib).
2. *Haemophilus influenzae* não b.
3. Meningite por Hib.
4. Vacinas conjugadas.
5. Caracterização molecular: Identificação e Tipagem.
6. Vigilância epidemiológica.

I. Título

*.....O melhor disso tudo foi descobrir que pude ir mais longe, depois de pensar que não podia mais.... e, que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!  
... e jamais devemos deixar que nossas dúvidas traidoras nos façam perder o bem que poderíamos conquistar e fazer se não fosse o medo de tentar.....*

(adaptado da obra " beijos não são contratos" de William Shakeaspeare)

## CAMINHO DA PERFEIÇÃO

*Nada te perturbe, nada te espante, tudo passa. Deus não muda, a paciência tudo alcança;  
Quem a Deus tem nada lhe falta, só Deus basta. Eleva o pensamento, ao céu sobe, por nada te angusties, nada te perturbe.  
A Jesus Cristo segue com peito grande e, venha o que vier, nada te espante.  
Vês a glória do mundo? É glória vã; Nada de estável, tudo passa;  
Aspira às coisas celestes que sempre duram: Fiel e rico em promessas, Deus não muda.  
Ama-o como merece, bondade imensa; Mas não há amor fino sem a paciência.  
Confiança e fé viva mantenha a alma, que quem crê e espera, tudo alcança.  
Do inferno acoitado muito embora se veja, burlará os furores quem a Deus tem.  
Advenham-lhe desamparos, cruces, desgraças; Sendo Deus o seu tesouro, nada lhe falta.  
Ide, pois, bens do mundo. Ide, ditas vãs; Ainda que tudo perca, só Deus basta.*

*Santa Teresa de Ávila*

*À Irmã Dulce "o anjo bom da Bahia", de quem pude presenciar exemplos de caridades e amor ao próximo.*

*A Oswaldo Cruz, o fundador dessa casa que tenho a honra de pertencer e que sempre esteve presente com o seu lema "Não esmorecer para não desmerecer".*

*Aos meus pais, pelos seus exemplos, lições de força e de sempre ir em frente.....  
A minha mãe por ter me ensinado que os seres humanos são iguais e somente  
as oportunidades os tornam diferentes....*

*Às Marias, do Céu e da Terra, que sempre estiveram presentes em minha vida.*

*Especialmente as três:*

*Isabel, Elisa e Fernanda.*

*Obrigado pela paciência e as provas de amor diário.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Dra. Suraia Hagge Barreto, da Faculdade de Farmácia da UFBA, pelos primeiros ensinamentos e a empolgação do amor pela Bacteriologia.

Ao Instituto de Microbiologia da UFRJ, hoje honrando o nome do Professor Paulo de Góes, pela acolhida e em especial ao Depto. de Microbiologia Médica onde conheci os Drs. Wilson Chagas de Araújo, Milton de Uzeda e Maria Cândida de Souza Ferreira que fazem parte da nossa caminhada. Não poderia esquecer Fernando pela sua alegria e amizade principalmente nos anos de mestrado.

Aos Drs. José da Rocha Carneiro e Sérgio Henrique Ferreira que, nas suas passagens pelo INCQS, me ensinaram a confiar no futuro e não temer aos obstáculos. Hoje estou concluindo um compromisso do passado. Obrigado pelo desafio!.....

À Dra. Keyla Belizia Feldman Marzochi devo e dedico este trabalho. Obrigado pela sua acolhida naquela manhã de julho de 2001. Hoje tomo “emprestado” suas palavras e digo que foi uma honra ser seu orientando. Como Deus foi bom em ter me conduzido à sua presença!

Ao Dr. André Luis Gemal, Diretor do INCQS, incentivador deste trabalho. Obrigado pela sua presença, seus incentivos em meu trabalho e sua orientação.

À Dra. Maria Regina Branquinho ex-Chefe do Depto de Microbiologia, pela confiança no meu trabalho ao iniciar a área de *H. influenzae* no INCQS e aos incentivos constantes.

Às amigas do Setor de Saneantes Célia, Neide e Maria Helena sempre com paciência, estímulo e apoio nesses longos anos. À Célia, em especial, pelas palavras e a presença amiga sempre constante e principalmente nos momentos difíceis, que nós cinqüentões estamos vivendo!.... Sabemos quantas montanhas tivemos de atravessar nesses últimos anos!

À Lucia C. Werneck, obrigado pela sua amizade e sua presença de irmã em muitos momentos em todos esses anos!.....

À Marisa C. Adati, amiga e companheira desses anos. Obrigado por dividir as alegrias e as tristezas!



Aos colegas e amigos do Departamento de Imunologia, em especial ao Alexandre Alves Dias, e ao GT-VAC pela ajuda em muitos momentos.

Ao Laboratório de Substância de Referência, Setor de Coleções de Culturas, primeiramente ao Ivano R. V. de Filippis: amigo, irmão, filho e professor. Obrigado por fazer parte de minha história....À Maysa Mandetta Clementino, amiga, “tia” e professora. Nesse setor comecei a entender a Biologia Molecular e aprendi o melhor de tudo: que estamos sempre numa fila e há sempre alguém na sua frente..... e atrás de você.....Obrigado pela paciência e amizade em muitos momentos. Não posso jamais esquecer outros grandes amigos: Cátia Chaia, Nilson Peclly Ribeiro, Ana Paula Alves do Nascimento e Cláudia Andrade que foram fundamentais com a paciência e generosidade nesses anos de convivência.

Às estagiárias Alessandra, Diana e Letícia. Vocês marcaram minha existência! Agradeço porque aprendi mais com vocês do que pude ensinar. Cada uma surgiu em seu momento mostrando-me o porquê de cada dia, de cada página da nossa vida.....

À Marise Magalhães, Chefe do Departamento de Microbiologia do INCQS, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia do INCQS, que direta ou indiretamente, colaboraram com palavras, trabalho e força para a realização dessa tese.

À Dra. Cristina Rebelo, Chefe do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião, pelo apoio através do fornecimento de cepas clínicas, indispensáveis na realização desse trabalho.

À Dra. Cléia Maria Monteiro da Cunha, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Fernandes Figueira –IFF/FIOCRUZ, pela acolhida e fornecimento de isolados clínicos para a realização desse trabalho.

Às Dras. Nadjla N. F. Souza do LACEN-PE e Rita de Cássia Campos Bertoncini do LACEN-SC, pela colaboração na doação de cepas clínicas viabilizando nosso projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, sob a Coordenação da Dra. Maria Helena S. Villas-Bôas, pela sua atenção e gentileza sempre presente, não esquecendo a paciência de Simone, Gisele e Pedro.

Aos pacientes e seus familiares, que a despeito das circunstâncias adversas, contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

As bactérias do gênero *Haemophilus*, família *Pasteurellaceae* têm na espécie *influenzae* a mais importante nas infecções humanas. O Hi, que inclui os sorotipos capsulares a-f e os NT, é responsável por diversos quadros infecciosos, predominando em crianças, destacando-se a patogenicidade para o SNC e o trato respiratório associada principalmente ao Hib. Desde 1988 as doenças associadas ao Hib são preveníveis pela vacina conjugada formada do PRP e uma proteína carreadora, incluída no PNI/MS em agosto de 1999. Foi então criada uma linha de pesquisa sobre o Hi no INCQS-FIOCRUZ com ênfase no estudo de cepas isoladas antes e após a implantação da vacina, que reduziu mas não impediu a ocorrência da doença. O presente estudo incluiu 235 cepas, procedentes dos estados de Santa Catarina (SC), Rio de Janeiro (RJ) e Pernambuco (PE). Verificamos que o Hib antes da vacinação predominava em mais de 90% dos casos, sendo os outros tipos sorológicos raros. Após a vacinação, cai o tipo b, crescem os tipos não b, em meningites, septicemias e infecções respiratórias. Os biotipos I e II foram os mais isolados. Houve variação da sensibilidade aos antimicrobianos testados (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftriaxona, rifampicina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim), sobretudo na associação SMX-TMP cuja resistência dos Hi aumentou de 32,6% para 65,8% entre os dois períodos; enquanto se mantiveram taxas semelhantes de resistência para a ampicilina (17,5% e 15,8%) e a presença de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase; a sensibilidade à amoxicilina-ácido clavulânico e ceftriaxona foi de 100%. Alteração na resistência ao cloranfenicol de 19,4 para 12,5% e da rifampicina de 8,2 para 9,7%. A tipagem sorológica realizada pelo método da SAL, teve bons resultados (96,2%) e a molecular, pela PCR, diferenciou as cepas NT das capsuladas b. Embora a estrutura populacional dos Hi tenha sido inicialmente descrita como clonal, os resultados obtidos através da técnica de ERIC-PCR, revelaram diversidade genética nas cepas estudadas. As do sorotipo b, revelaram 4 clones com diferentes características epidemiológicas. A diversidade genética foi maior nas Hib e HiNT. Dos estados estudados, PE teve a mais alta diversidade genética (6 clones em 15 cepas) seguido do RJ (3 clones em 23 cepas) e SC (2 clones em 13 cepas). Concluímos, portanto, que há necessidade do monitoramento das cepas circulantes de Hi no país observando as possíveis alterações na prevalência dos sorotipos atuais e a real estimativa do impacto da vacina contra o Hib atualmente utilizada no Brasil.

## ABSTRACT

The bacterial genus *Haemophilus* is included in the family *Pasteurellaceae* and the most important specie causing infectious diseases in humans is the Hi. It shows capsular serotypes (a-f) as well as NT strains. A great number of different acute infectious diseases are caused by this organism, especially affecting the CNS, as well as RD, occurring frequently in children, especially with the Hib. Since 1988 disease associated with Hib has been vaccine-preventable, by means of the first conjugate vaccine showing great efficacy. The vaccine is composed by the PRP and a carrier protein. However, the Hib is still considered one of the most important human pathogens, which led us to develop different research lines, with isolates from different source of infections, after the introduction of the conjugate vaccine against Hib by PNI/MS in 1999. We used in our study 235 Hi isolates, from the brazilian states of Santa Catarina, Rio de Janeiro and Pernambuco. Our results, show that the rate of type b infections before vaccination was more than 90%, whereas other serological types were rare. After the advent of the vaccine, we observe a decrease of type b and an increase of non-b isolation. Biotypes I and II are still the most frequently isolated. The antimicrobial susceptibility found against ampicillin, amoxicillin-clavulanate, ceftriaxone, rifampicin, chloranphenicol and TMP-SMX, showed a recent increasing resistance against antibiotics commonly used to treat RD, especially among the ones administrated by oral route, showing a resistance rate from 32.6% to 65.8% between the two periods studied. Ampicillin, showed resistance rates of 17.5% and 15.8% in the two periods studied and the presence of  $\beta$ -lactamase producing strains. Strains evaluated against amoxicillin/clavulanate and ceftriaxone, were 100% sensible. Chloranphenicol showed a decrease in the resistance rates of the strains isolated during the post-vaccination period, while rifampicin, showed an increase in the resistance rate from 8.2 to 9.7%. The seroagglutination method used for capsular typing, showed good results, however, mutant b capsulated strains (b<sup>-</sup>), were only detected by the PCR, using specific primers for the capsule region. The population structure of Hi which has been described as clonal, revealed a great genetic diversity by ERIC-PCR. Therefore we can conclude that there is a need of systematic tracking of circulating Hi strains in the country, continuously watching possible epidemiological changes and the evaluation of the impact of the vaccine against Hib used in Brazil to date.

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Center for Disease Center
CDI	Centro de Doenças Infecciosas
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CNS	Central Nervous System
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COVER	Coordenação de Vigilância Sanitária das Doenças de Transmissão Respiratórias e Imunopreveníveis.
DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
DNA	Deoxyribonucleic acid
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EUA	Estados Unidos da América
FUNASA/ FNS	Fundação Nacional de Saúde
Hi	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
Hinb	<i>Haemophilus influenzae</i> não b
HiNT	<i>Haemophilus influenzae</i> não tipável
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IS 1016	Insertion Sequence
ITR	Infecção do Trato Respiratório
MS	Ministério da Saúde
NT	Não Tipável
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PRP	Polirribosil-Ribitol-Phosphate
RD	Respiratory disease
SAL	Soro Aglutinação em Lâmina

SES	Secretaria Estadual de Saúde
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único em Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE	Tris – Borato-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)
TMP-SMX	trimethoprim/sulfamethoxazole
WHO	World Health Organization

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Esfregaço de cultura do <i>H. influenzae</i> (Coloração pelo método de Gram).....	1
FIGURA 2 - Modelo simplificado da organização do locus <i>cap</i> no genoma do <i>H. influenzae</i> .....	6
QUADRO 1 - Fisiopatologia das infecções por <i>Haemophilus influenzae</i> de tipo b.....	7
FIGURA 3 - Criança com um ano de idade com infecção no membro inferior (púrpura fulminante) por <i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo a ocasionando amputação de dois dedos (ADDERSON et al., 2001).....	9
FIGURA 4 - Esfregaço de líquido cefalorraquidiano (LCR) com <i>Haemophilus influenzae</i> (coloração pelo método de Gram).....	10
QUADRO 2 - Tipos de vacina conjugada contra o <i>H. influenzae</i> tipo b (Hib).....	17
FIGURA 5 - Estrutura da vacina conjugada contra o <i>H. influenzae</i> tipo b (Hib).....	20
QUADRO 3 - Calendário Básico de Vacinação contra o <i>H. influenzae</i> tipo b (Hib)-PNI/MS.....	21
GRÁFICO 1- Meningite p/ <i>Haemophilus</i> – Série histórica de casos e óbitos. Brasil, 1980 – 2003.....	63
GRÁFICO 2 – Incidência de meningite por diversas causas em crianças menores de 4 anos, Brasil, 1987 a 1991.....	66
GRÁFICO 3 – Evolução dos casos de meningite bacteriana não especificada no município do Rio de Janeiro.....	66

GRÁFICO 4 - Taxa de incidência de meningites no município do Rio de Janeiro – 1997 a 2002.....	67
GRÁFICO 5 - Evolução dos casos de meningite por <i>H. influenzae</i> no município do Rio de Janeiro (1997-2002).....	68
TABELA 1 - N° de cepas de <i>H. influenzae</i> tipo b (Hib) e Hi não b utilizadas em cada manuscrito.....	71
TABELA 2 - Iniciadores (primers) para as regiões cápsula-específico e tipo - específico do genoma do <i>H. influenzae</i> .....	73
FIGURA 6 - Eletroforese em gel 1 % (1xTBE) com produto da reação da PCR de cepas de isolados clínicos de Hi onde estão representados todos os tipos sorológicos encontrados em nosso estudo pelo método da tipagem molecular por PCR.....	74
FIGURA 7 - Modelo simplificado de funcionamento da técnica de ERIC-PCR em parte do genoma do <i>H. influenzae</i> .....	82

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xv
SUMÁRIO.....	xvii
1- Introdução.....	1
1.1- Considerações gerais.....	1
1.2- Histórico.....	4
1.3- Patogenia: A cápsula.....	5
1.4- A infecção e a doença.....	6
1.4.1- Quadro clínico.....	8
1.5- O diagnóstico confirmatório.....	11
1.5.1- Isolamento e Identificação do Microrganismo.....	11
1.5.2- Sorotipagem.....	12
1.6- Caracterização molecular do <i>H. influenzae</i> : Identificação e Tipagem.....	13
1.7- Profilaxia: A vacina.....	14
1.8- Mecanismo imune envolvido.....	16
1.9- Tipos de vacina.....	16
1.10- Epidemiologia.....	18
2- Objetivos.....	23
2.1- Objetivo geral.....	23
2.2- Objetivos específicos.....	23



3- Resultados.....	24
3.1 - MANUSCRITO 1 – Occurrence of <i>Haemophilus influenzae</i> strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate <i>Haemophilus influenzae</i> type b vaccine (publicado em <i>Brazilian Journal of Medical Biological Research</i> , 38 (5):777-781, 2005).....	25
3.2 - MANUSCRITO 2 – Antimicrobial susceptibility of <i>Haemophilus influenzae</i> isolates collected from four centers in Brazil (1990-2003). (publicado em <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> , 54 (1):57-62, 2006).....	31
3.1- MANUSCRITO 3 – Molecular and phenotypic characterization of <i>Haemophilus influenzae</i> strains isolated from Brazilian patients before and after vaccination against <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib). (submetido para publicação na <i>Journal of Medical Microbiology</i> em setembro de 2005).....	38
4- Discussão.....	62
5- Conclusões e Perspectivas.....	84
5.1- Conclusões.....	84
5.2- Perspectivas.....	85
6- Referência Bibliográfica.....	87
7- Anexos.....	105
7.1- Anexo 1.....	105
7.2- Anexo 2.....	106
7.3- Anexo 3.....	109
7.4- Anexo 4.....	112
7.5- Anexo 5.....	115

## 1. INTRODUÇÃO

A proposta dessa pesquisa, abrindo uma linha de investigação no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), está associada à necessidade de, sob diferentes aspectos, monitorar o comportamento dos processos infecciosos por *Haemophilus influenzae* (Hi) em todo o país, tomando por marco divisório a inclusão da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b (Hib) no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS), a partir de agosto de 1999.

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As bactérias do gênero *Haemophilus* pertencem à família *Pasteurellaceae* e são microrganismos aeróbios, imóveis, não-hemolíticos (com exceção das espécies *hemolyticus* e *parahemolyticus*). São também Gram-negativos, pleomórficos e não esporulados, conforme mostrado na figura 1. Existem dezenove espécies, sendo dez parasitas obrigatórios do homem e nove encontradas em outros animais. As espécies isoladas de humanos fazem parte da microbiota dos tratos respiratório, geniturinário e da cavidade oral de indivíduos saudáveis (MENDELMAN, 1987).

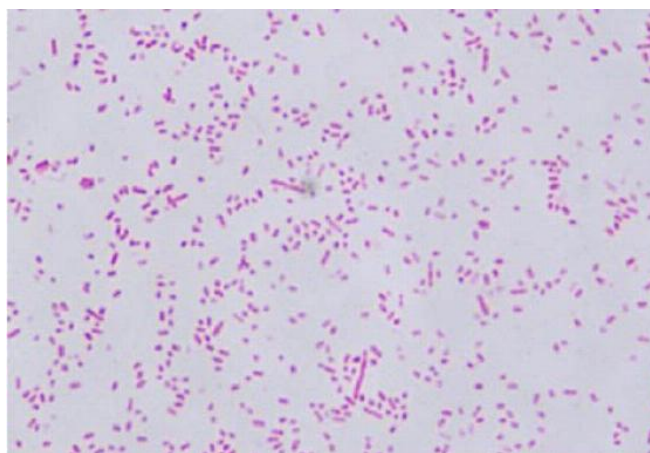


FIGURA 1 - Esmregaço de cultura do *H. influenzae* (Coloração pelo método de Gram).

A espécie *Haemophilus influenzae* é a mais importante e inclui diversos sorotipos capsulares (a-f) bem como espécies não tipáveis. As doenças causadas por esse microrganismo compõem um leque de infecções, de caráter agudo, com maior patogenicidade para o Sistema Nervoso Central (SNC) e o trato respiratório alto e baixo, francamente predominante em crianças e associadas principalmente ao *Haemophilus influenzae* do tipo sorológico b ou Hib.

Desde 1988 os processos infecciosos associados ao Hib são preveníveis por vacinação. Contudo, anos depois, o Hib ainda é descrito como importante patógeno humano, responsável por diversas infecções invasivas e graves, principalmente em crianças menores de 5 anos (MURPHU et al., 1993; IWARSON, 1993). A partir de 1997, a Organização Panamericana da Saúde (OPAS) recomendou a aplicação da vacina contra o Hib em toda América Latina, sendo o Uruguai (1994) e Chile (1996) os pioneiros com redução importante na incidência da meningite (BEP, 2004).

No Brasil poucos estudos foram feitos sobre a frequência do Hib nas infecções. Em 2002, Zanella e colaboradores analisaram 3204 cepas do Centro de Referência do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, isoladas no período de 1990-1999, revelando o Hib na quase totalidade (97,8%) seguido, muito distante, pelos *H. influenzae* não tipáveis (1,5%) e pelo sorotipo a (0,5%). Dados recentes mostraram que, de 229 cepas coletadas no período de 1990-2003, originárias de três estados brasileiros, 81,7% eram *H. influenzae* do tipo sorológico b sendo todas procedentes de pacientes com meningite (DE ALMEIDA et al., 2005). Este microrganismo tem sido, classicamente, incluído entre os três principais causadores de meningite /meningoencefalite bacteriana, ao lado da *Neisseria meningitidis* e do *Streptococcus pneumoniae* (FREIRE, 1987; JOKLIK et al., 1992; BARQUET et al., 1996). Outras enfermidades causadas pelo Hib, de considerável frequência e gravidade, envolvem epiglote, pneumonia, otite média aguda, celulite, abscessos, artrite séptica e conjuntivite (GRANOFF & CATES, 1985; ANDERSON et al., 1989; LIPUMA, RICHMAN & TERRENCE, 1990; IWARSON, 1993; BARQUET et al., 1996; KONEMAN et al., 1997). A infecção do SNC é a forma mais séria das doenças invasivas causadas por *Haemophilus influenzae*, principalmente pelo tipo b, podendo ser letal ou deixar seqüelas neurológicas permanentes como perda da audição, retardo mental e convulsões (GRANOFF & CATES, 1985; BARQUET et al., 1996).

A letalidade em crianças infectadas já alcançou a faixa de 5 a 10%, em países desenvolvidos, e 30% em países em desenvolvimento (MMWR, 1991; BIJLMER, 1991; JENNINGS & PON, 1991; IWARSON, 1993; ADAMS et al., 1993; BARQUET et al., 1996).

Com a utilização da vacina conjugada contra o Hib houve acentuada diminuição em berçários e creches de surtos pelo Hib, antes freqüentes, como os ocorridos nos anos 70 e 80 na Europa. Casos relatados por McVernon et al. (2004), de infecção por Hib com crianças vacinadas, numa creche na Inglaterra, mostram a necessidade do controle dos portadores bem como, profilaticamente, da administração de antibióticos nos comunicantes crianças e adultos.

O ser humano é o único hospedeiro natural do *Haemophilus influenzae*. Esta bactéria é encontrada na microbiota da nasofaringe de 60 a 90% das crianças sendo a presença do *H. influenzae* tipo b nas narinas e faringe de cerca de 5% de crianças normais (MENDELMAN & SMITH, 1987). A transmissão do *Haemophilus influenzae* dá-se através de gotículas nasofaríngeas, de pessoa a pessoa, procedentes de portadores sãos, principalmente, ou doentes.

A microbiota da nasofaringe humana é estabelecida gradualmente durante o primeiro ano de vida. Os microrganismos adquiridos nos primeiros dias após o nascimento provêm da mãe e de outros familiares, dos profissionais de saúde envolvidos no momento do parto e até dos microrganismos do ambiente. Outros microrganismos patogênicos, precocemente, podem ser encontrados na microbiota do trato respiratório, a partir do primeiro dia de vida. Também o Hib foi detectado na nasofaringe de recém-nascidos, em 0,7% deles (ANIANSSON et al., 1992; CAMPOS, 1999). Porém estudo bem anterior na Nova Guiné mostrou que a maioria das crianças estavam colonizadas por *H. influenzae* e *S. pneumoniae* já no primeiro mês de idade (ROUNTREE et al., 1967).

Aproximadamente 80% das doenças por *H. influenzae* do tipo b ocorrem entre o terceiro mês e o terceiro ano de vida, sendo a maior incidência observada em lactentes com idade entre seis meses e um ano; 35 a 40% dos casos observam-se em crianças com mais de 18 meses de vida (AMATO NETO et al., 1991). Essa bactéria foi responsável até final da década de 90 por cerca de 95 % das meningites bacterianas infantis (MURPHU et al., 1993; BARQUET et al., 1996; ZANELLA et al., 2002; HEATH et al., 2001; BEPA, 2004; DE ALMEIDA et al., 2005).

Com a introdução da vacina conjugada específica contra o Hib houve não somente uma redução dramática nas doenças por Hib como também diminuição desse microrganismo nos portadores, tanto nas crianças vacinadas como não vacinadas (MEATS et al., 2003). Por outro lado, entretanto, após a política mundial de imunização com a referida vacina pouco se conhece sobre a nova epidemiologia associada aos sorotipos circulantes e a expressão clínica de infecções localizadas ou invasivas pelo *H. influenzae* (CAMPOS et al., 2003).

Assim, torna-se necessário avaliar as possibilidades de um novo papel eco-epidemiológico e clínico dos sorotipos não b do *H. Influenzae*.

## 1.2. HISTÓRICO

Em 1882, Robert Koch foi quem primeiro descreveu um microrganismo semelhante ao *Haemophilus* encontrado em exsudato conjuntival. Entretanto, considera-se Richard Pfeiffer como o primeiro que identificou o patógeno designando-o de *Influenza bacillus* em 1892. O isolamento desta bactéria no esputo e em tecido de pulmão de indivíduos que morreram na pandemia de gripe, naquele mesmo ano, contribuiu para que fosse considerado como o agente etiológico tomando-se responsável pela denominação gripe conhecida como influenza (KILIAN, 1986). Ainda em 1892, Pfuhl fez o primeiro relato de meningite pelo *Influenza bacillus*, tendo sido o organismo identificado após a morte dos pacientes. Em 1898, Slawyk relatou o isolamento do *Influenza bacillus* de um líquido purulento de um paciente ainda em vida (FREIRE, 1987).

Winslow e colaboradores em 1917 sugeriram a denominação de *Haemophilus* para este grupo de microrganismo por apresentar crescimento significativo quando cultivado em meio sintético contendo sangue ou hemácias lisadas. O reconhecimento desta denominação ocorreu bem mais tarde quando o Comitê de Nomenclatura da Associação Americana de Bacteriologistas denominou-o de *Haemophilus influenzae* (PITTMAN, 1931). Neste mesmo trabalho a autora revelou que o *H. influenzae* poderia ser encontrado sob duas formas: encapsulado e não encapsulado. Foi também capaz de identificar seis tipos de cápsulas antigênicas, que caracterizou de a até f. Dando continuidade a esta linha de trabalho, Pittman (1935) demonstrou que, dessas seis cápsulas sorotipadas, o sorotipo b era o responsável por quase todas as infecções graves causadas por *H. influenzae*, o que tem sido até hoje verificado por outros autores (FREIRE, 1987; JOKLIK et al., 1992; ELLIS & GRANOFF, 1994).

Pensava-se então que as linhagens não capsuladas, encontradas em 50-80% do trato respiratório de pessoas saudáveis como microbiota natural, não estariam relacionadas a doenças invasivas (KILIAN & BIBERSTEIN, 1984; FREIRE, 1987; JOKLIK et al., 1992).

Em continuação a caracterização fenotípica, Kilian (1986) subdividiu o *Haemophilus influenzae* em quatro biotipos (I a IV). Esta classificação baseou-se em ensaios bioquímicos, portanto em caracteres fenotípicos, associados às características de produzir enzimas como: urease, ornitina-descarboxilase e triptofanase. Atualmente são oito biotipos (I a VIII), e não têm relação com os sorotipos (KONEMAN et al., 1997). Existe, porém uma associação entre a cápsula do tipo b e o biotipo I, que é o mais freqüente, inclusive nos estudos pioneiros realizados com cepas isoladas em São Paulo (LANDGRAF & VIEIRA, 1993).

### 1.3. PATOGENIA: A CÁPSULA

A patogenicidade de *H. influenzae* está relacionada à cápsula, como principal fator de virulência (ROBBINS, SCHJEERSON & PITTMAN, 1984; GRANOFF & CATES, 1985; JOKLIK et al., 1992; KONEMAN et al., 1997). Na célula bacteriana esta estrutura, formada de monômeros contendo unidades de ribose, ribitol e fosfato, que constituem o polissacarídeo poliribosil-ribitol-fosfato (PRP), está firmemente aderida à parede celular (CRISEL et al., 1975).

A síntese e o transporte do polissacarídeo para a cápsula do *H. influenzae* são regulados por um complexo de genes, denominado de locus *cap*, contidos em uma unidade funcional chamada cassete. O locus *cap* tem uma organização comum para todos os seis tipos capsulados e é formado por três regiões: I, II e III. As regiões I e III contêm os genes necessários para o processamento e exportação do polissacarídeo, que são comuns para todos os sorotipos. Estas regiões flanqueiam a região II, onde se encontram os genes responsáveis pela síntese dos dissacarídeos sendo, portanto, a região capsular sorotipo-específica. Na maioria das cepas invasivas do tipo b, o *cap* é flanqueado por seqüência de inserção (IS 1016). Estes podem estar inseridos entre as regiões I e II, interferindo na funcionalidade do *cap*, originando assim as cepas não tipáveis (NT). Esta região pode ser também flanqueada por seqüências repetitivas (KROLL et al., 1989; FALLA et al., 1994).

A organização do *cap* predispõe à duplicação ou perda do cassete capsular, podendo faltar a região I ou III. A maioria das cepas isoladas de Hib contém uma duplicação parcial do *cap*, que consiste de uma cópia intacta e uma segunda cópia que carrega uma deleção parcial

do *bexA* estando localizado na região I do *cap* que participa na exportação do material capsular e se apresenta conservada em todos os seis tipos capsulados (KROLL, HOPKINS & MOXON, 1988; KROLL et al., 1989, 1990). A reação em cadeia da polimerase – *bexA* (Polymerase Chain Reaction-*bexA*) visa, portanto, distinguir as cepas capsuladas das não capsuladas. Portanto, a detecção da cápsula tipo-específico é de fundamental importância quando se deseja identificar as cepas invasivas de *H. influenzae* (VAN KETEL, DE WEVER & VAN ALPHEN, 1990; KROLL, LOYNDS & MOXON, 1991). A figura 2 mostra o modelo simplificado da organização do locus *cap* no genoma do *H. influenzae*.

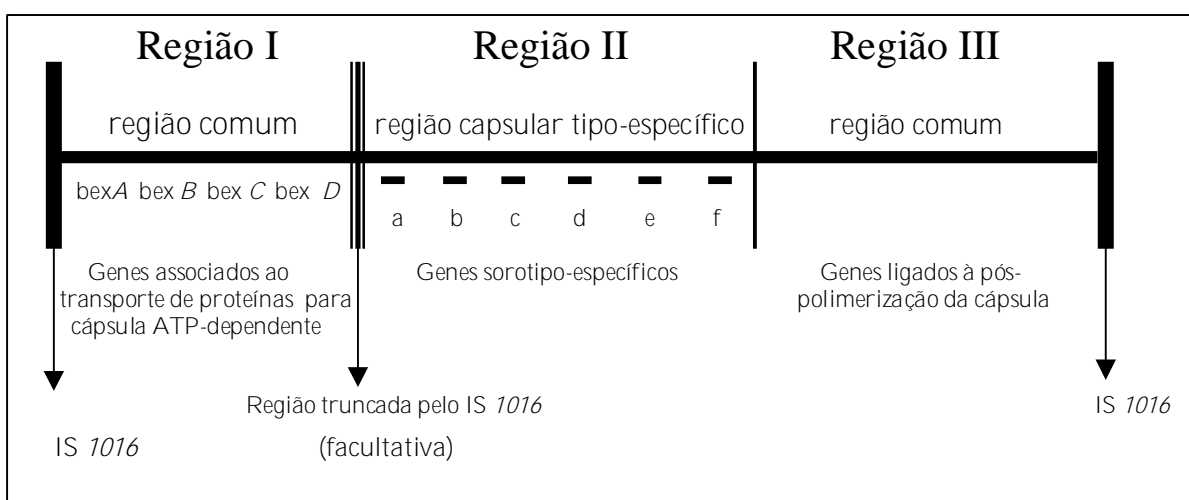


FIGURA 2 – Modelo simplificado da organização do locus *cap* no genoma do *H. influenzae*.

#### 1.4. A INFECÇÃO E A DOENÇA

A aderência e colonização do epitélio da nasofaringe é o primeiro passo para o desenvolvimento da infecção (subclínica) ou da doença sistêmica pelo *Haemophilus influenzae*, sobretudo pelo Hib. Foi demonstrado que os contatos de pacientes com doença sistêmica por Hib, como familiares e freqüentadores de creches e orfanatos, apresentavam maior intensidade de colonização. Nestas famílias foram encontradas taxas de 60 a 70% de colonização entre irmãos e 20% entre pais, concluindo-se que, pela maior exposição, os contatos citados estariam mais vulneráveis à doença.

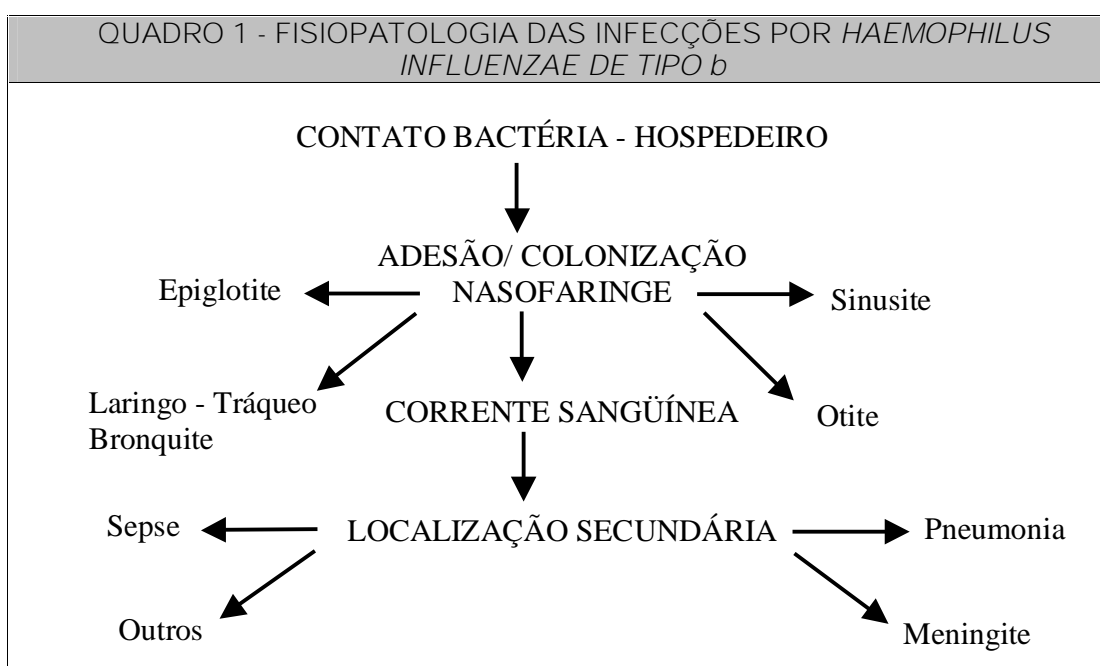
Certamente a diferença entre a taxa dos colonizados e os que adoecem deve corresponder à proporção de infectados que desenvolverão imunidade contra essa bactéria.

Isso justificaria a raridade da doença a partir dos sete anos de idade, a qual pode eventualmente reaparecer nos grupos etários avançados associando-se à queda da imunidade.

A colonização pode persistir na nasofaringe durante meses e seu sucesso depende da cepa do *Haemophilus influenzae* e das defesas locais do hospedeiro. Existem evidências de que a infecção viral concomitante pode potencializar a colonização e a doença invasiva. O desenvolvimento da infecção sistêmica exigiria uma grande quantidade de bastonetes (BOUSKELA et al., 2000).

A patogenia da doença por *H. influenzae* não está compreendida inteiramente, embora a presença da cápsula do polissacarídeo seja considerada como o fator principal de virulência. A invasão sistêmica pode se dar através do epitélio da nasofaringe, penetrando diretamente os capilares sanguíneos. A cápsula bacteriana dificulta a fagocitose e a lise, mediada pelo complemento. Por isso considerava-se que as espécies não capsuladas ou não tipáveis fossem menos invasivas, podendo aparentemente induzir uma resposta inflamatória que levasse a um quadro patológico. Em 2003, Murphy chamou atenção para outras estruturas antigênicas, além da cápsula, que fazem parte do mecanismo de patogenia dos Hi. O lipopolissacarídeo (LPS) e as proteínas de membrana externa (OMP) são fatores de virulência importantes, sobretudo para se entender o isolamento do HiNT em processos infecciosos.

O *H. influenzae*, a partir da porta de entrada na nasofaringe, pode causar diversas manifestações clínicas localizadas e sistêmicas como faringite, sinusite, otite, laringite, pneumonia, meningite, septicemia, e outras possivelmente mais raras como: celulite, osteomielite e artrite, como sintetizado no quadro 1.





Os *H. influenzae* não tipáveis (HiNT) são agentes freqüentes e comuns de otites e sinusites infantis sendo por vezes associados também a pneumonias em adultos. O Hib, que sempre se destacou como agente infeccioso, aparece somente em 20% das otites infantis (AMATO NETO et al., 1991). Após a utilização da vacina conjugada essa taxa caiu para 5-10% (CDC, 2004).

Apresentamos, a seguir, a conduta e suas bases, a serem consideradas diante de pacientes com suspeita de doença por *H. influenzae* (DE ALMEIDA & MARZOCHI, no prelo). Justifica-se não só pela relevância do diagnóstico clínico e laboratorial ao tratamento precoce, capaz de evitar óbitos e seqüelas, mas como subsídio ao monitoramento dos casos suspeitos no período pré-vacinal.

#### 1.4.1 Quadro clínico

A meningite purulenta é ainda considerada a forma mais séria das doenças invasivas causadas por Hib, que persiste como o terceiro principal agente de meningite bacteriana purulenta aguda seguido de *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* (JOKLIK, WILLETT & AMOS, 1980; FREIRE, 1987; BARQUET et al., 1996). Embora o óbito ocorra em menos de 10% dos casos, pode evoluir com manifestações graves ou complicações e deixar seqüelas neurológicas permanentes (GRANOFF & CATES, 1985; BARQUET et al., 1996). Outras enfermidades graves, além da infecção do SNC, podem ser causadas por esta bactéria incluem, ainda hoje, infecções do trato respiratório, articulações e pele (ANDERSON et al., 1989; IWARSON, 1993). Entre as formas clínicas freqüentes estão a epiglote, pneumonia, otite média aguda, celulite, artrite séptica e conjuntivite (GRANOFF & CATES 1985; LIPUMA, RICHMAN & TERRENCE., 1990; MURPHU et al., 1993; KONEMAN et al., 1997).

A meningite por *H. influenzae*, clinicamente indistinguível das demais meningites purulentas agudas, tem instalação rápida com febre alta, cefaléia, vômitos, comprometimento do estado geral e sinais de irritação meníngea. Pode acompanhar-se de sepse; porém, mais raramente, nos casos de sepse grave, pode ocorrer choque e até mesmo púrpuras nas primeiras 48 horas.

Na evolução da meningite, pode haver comprometimento sensorial e observar-se progressivamente sonolência, desorientação, torpor e coma. Nas crianças menores, recém-nascidos e lactentes, o diagnóstico é mais difícil, pois a cefaléia não é caracterizada e os sinais

meníngeos e outros podem faltar, mas chamam a atenção a irritabilidade, recusa alimentar, abaulamento da fontanela, apatia, crise convulsiva, apnéia e instabilidade térmica. Essas manifestações em geral denotam a presença maior ou menor de edema cerebral. Sobretudo em lactentes, pode ocorrer coleção subdural, capaz de evoluir a empiema subdural, e abscesso cerebral. Nestes casos observam-se manutenção ou retorno da febre e aparecimento de sinais neurológicos focais e/ou convulsões. A coleção, de patogênese desconhecida, é freqüentemente bilateral, contém líquido xantocrômico e estéril com volume variável (de 4 a 100 ml) e com alta concentração de proteínas; quando, excepcionalmente, esse líquido é purulento e contém o agente etiológico caracteriza o empiema. Diferentemente da efusão subdural que não costuma agravar o diagnóstico, o empiema e o abscesso por seu efeito de massa podem não ter boa evolução, requerendo de regra intervenção cirúrgica.

Seqüelas permanentes das meningites como surdez, comprometimento cognitivo de diferentes níveis, epilepsia, hidrocefalia, cegueira, diabete insípido são referidas (GRANOFF & CATES 1985; BARQUET et al., 1996). As baixas faixas etárias acometidas são em si importantes fatores de risco. Há registros de casos de púrpura grave também ocasionando seqüelas como amputações de membros, ou fulminantes, figura 3 (ADDERSON et al., 2001).



FIGURA 3 - Criança com um ano de idade com infecção no membro inferior (púrpura fulminante) por *Haemophilus influenzae* sorotipo a ocasionando amputação de dois dedos (ADDERSON et al., 2001).

Apresentações clínicas mais raras, isoladas ou acompanhando outros quadros, podem ocorrer, como artrite, pericardite e endocardite.

É fundamental uma suspeita clínica etiológica para o tratamento precoce, capaz de levar mais provavelmente a evolução favorável, sobretudo nas formas clínicas graves do acometimento associável ao *H. influenzae*. A história clínica completa e acurada, com exame clínico minucioso, incluindo a busca de infecções consideradas como porta de entrada, como otite, sinusite e pneumonia, são essenciais, principalmente nos casos de meningites.

Exames laboratoriais inespecíficos, inclusive de imagem, são indicados na dependência da orientação clínica.

No caso da suspeita de meningite, deve-se sempre proceder a punção do líquido cefalorraquidiano, salvo raras contra-indicações. O líquido característico das meningites purulentas mostra celularidade acima de 500, predomínio acentuado de neutrófilos, aumento de proteínas e redução de glicorraquia. O exame citológico e bioquímico do líquido, e séricos como proteína C reativa (PCR) e dosagem de procalcitonina (VIALON, 1999; TUNKEL et al., 2004) contribuem para diferenciar as meningites bacterianas das linfomonocitárias – viral e tuberculosa ou fúngica, entre os principais agentes.

A bacterioscopia, no caso do líquido ou eventualmente de outras espécimes, permite evidenciar, na dependência da concentração bacteriana, formas de cocobacilos Gram negativos, como mostra a figura 4. Entretanto, a diferenciação devida entre as bactérias requer, obrigatoriamente, a busca de identificação do agente biológico.

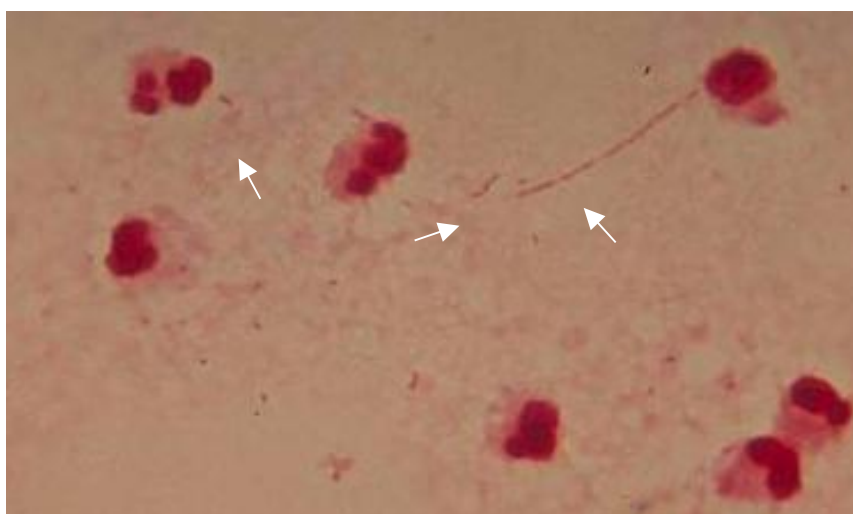


FIGURA 4– Esfregaço de líquido cefalorraquidiano (LCR) com *Haemophilus influenzae* (coloração pelo método de Gram)

## 1.5-O DIAGNOSTICO CONFIRMATÓRIO

### 1.5.1 - Isolamento e Identificação do Microrganismo

A cultura da amostra de líquido, de sangue e/ou de outros materiais – secreções de ouvidos, seios da face, celulites, abscessos e outras – é de fundamental importância visando ao isolamento do *H. influenzae* bem como a sua identificação, incluindo a determinação do tipo sorológico. Essas bactérias são oxidase positiva, porém a reação da catalase é variável. Possuindo um sistema enzimático inadequado para crescimento em meios de cultura não-enriquecidos, torna-se necessária a adição de nutrientes especiais como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e/ou a hematina, chamados de fator V e fator X, respectivamente, os quais estão presentes no sangue de alguns mamíferos. A exigência destes fatores serve para definir o gênero *Haemophilus* e também distinguir as diferentes espécies do gênero.

Os meios de cultura convencionalmente utilizados em Bacteriologia, na sua maioria, utilizam o sangue de carneiro para confecção do clássico ágar sangue. Como a maioria das espécies do gênero *Haemophilus* necessita dos fatores V e X, que estão nas hemácias utilizadas, não é indicado o uso do sangue desse animal. Isso porque o fator V, requerido para o crescimento é inativado em um processo natural de lise, pela enzima NADase que é liberada das próprias células durante o armazenamento. Em contraste, o sangue de coelhos e cavalos não libera NADase. Desta forma os meios de cultura ideais devem se constituídos de uma base de nutrientes, esterilizada e posteriormente resfriada à 80°C, adicionando-se então o sangue de um desses animais. O aspecto do meio de cultura torna-se escurecido sendo por isso chamado de “ágar chocolate” favorecendo o crescimento da maioria das espécies de *Haemophilus*. Certamente este é um dos pontos limitantes para o isolamento destas bactérias em material clínico suspeito e, muitas vezes, com quadro clínico sugestivo, de infecção por *Haemophilus* (KILLIAN & BIBERSTEIN, 1984; LIPUMA, RICHMAN & TERRENCE, 1990; CAMPOS, 1999). Alguns microrganismos, incluindo espécies de *Staphylococcus*, *Neisseria* e certas espécies de fungos podem sintetizar NAD ou fator V. Quando esses microrganismos estão presentes nas culturas mistas, espécies de *Haemophilus*, que requerem o fator V podem aparecer como pequenas colônias, na área de produção do NAD, próxima da colônia da bactéria produtora. Este fenômeno chama-se de *satelitismo*, podendo desta forma colaborar na identificação desses microrganismos (KONEMAN et al., 1989; CAMPOS, 1999).

### 1.5.2 - Sorotipagem

Todos os isolados de *H. influenzae* devem ser sorotipados. Este procedimento deve ser solicitado especialmente tratando-se de pacientes menores de 15 anos, faixa etária na qual está sendo freqüente o aparecimento de infecção pelo *H. influenzae* após a introdução da vacinação de rotina contra o Hib. Este ensaio determina se um isolado é do tipo b, portanto, de fundamental importância considerando-se a especificidade da vacina. A sorotipagem é usualmente feita pelos Laboratórios Centrais Estaduais de Saúde Pública (LACEN). Outros laboratórios podem também realizá-la com anti-soros disponíveis no mercado (Marcas Difco, BBL, Oxoid).

A detecção do antígeno deve sempre ser feita, porém apresenta dificuldades em relação aos resultados, sobretudo quando o paciente já está em uso de antimicrobianos e o microrganismo podendo não estar viável nas culturas. Entre os métodos indicados, destacam-se (LIPUMA et al., 1990; CAMPOS, 1999):

- a) Aglutinação em látex: rápido, sensível, específico para detecção do antígeno capsular do Hib no líquido, soro, urina, fluido pleural e fluido de articulações. Há disponibilidade no mercado de Kits para este ensaio. Além disso, permite o diagnóstico diferencial com outras bactérias como *Neisseria meningitidis* (menos sorogrupo W135), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* grupo B e *Escherichia coli* K<sub>1</sub>.
- b) Contraímunoeletroforese (CIE): similar a aglutinação em látex, porém é um método menos sensível, mais demorado e exige equipamento específico.
- c) Identificação molecular pela PCR: é uma reação mais rápida e sensível por ser capaz de detectar a presença de fragmentos de DNA da bactéria mesmo na ausência do crescimento bacteriano em cultura. Pode ser realizada diretamente do fluido biológico suspeito ganhando-se tempo. A desvantagem é o custo do equipamento e os reagentes específicos, porém o investimento inicial pode compensar a rapidez do diagnóstico.

## 1.6 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *H. influenzae*: IDENTIFICAÇÃO E TIPAGEM

É de extrema necessidade que se tenha um método de tipagem capsular eficaz para a caracterização das cepas de *H. influenzae*, principalmente as do tipo b, neste período de pós-vacinação com a vacina conjugada contra o Hib. Portanto, sorologicamente, as cepas de *H. influenzae* podem ser visualizadas como capsuladas (a-f) e não capsuladas (NC), onde se inclui as b<sup>-</sup> genotipo capsular. A incidência de infecções invasivas por Hib com cepas mutantes, deficientes de cápsula do tipo b (cepas b<sup>-</sup>) tem sido relatada. Na era das vacinas conjugadas este tipo de *H. influenzae* é particularmente importante, porque poderá ser considerado como uma das causas de falha vacinal. Podem-se ter situações em que cepas do tipo b perdem temporariamente a cápsula, porém são capazes de recuperá-la ao invadir o organismo. O papel das cepas b<sup>-</sup> no período pós-vacinal não está claro. Quando são detectadas associadamente a uma infecção invasiva, elas podem ser classificadas como resultado de falha vacinal. Entretanto, quando aparecem em portadores, considera-se uma fonte significativa de cepas NC invasivas (FALLA et al., 1994). Assim, cepas mutantes não encapsuladas de *H. influenzae* têm sido reportadas em diferentes estudos como variantes desse microrganismo podendo reverter para a forma capsulada. Portanto, deve ser visto com cautela a possibilidade da doença com o Hib invasivo em vacinado pois este poderá ter sido um Hib que sofreu mutação em um indivíduo previamente imunizado contra o Hib. Nesta situação o uso de um método eficaz de tipagem é importante para detectar e determinar a origem da doença causada por estas cepas. Por conseguinte, as cepas mutantes b<sup>-</sup> podem ser confundidas com cepas NC pelos métodos sorológicos tradicionais (LUONG et al., 2004).

A classificação tradicional das cepas de *H. influenzae* pela determinação do biotipo e do sorotipo, ou seja, pelas variações fenotípicas não fornece informações sobre sua origem clonal. Para isso é necessária a avaliação de variações no genoma do *H. influenzae* através de técnicas de biologia molecular.

Muitos autores descreveram a existência de seqüências genômicas repetidas em diversas bactérias e sua utilização para determinar a relação genética entre diferentes cepas da mesma espécie. Um tipo de seqüência repetida foi inicialmente descrito em espécies pertencentes às famílias Enterobacteriaceae e Vibrionaceae e foi chamada de ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (VERSALOVIC, KOEUTH. & LUPSKI,

1991; DE BRUIJN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994; VAN BELKUM et al., 1998). Baseia-se, portanto, no pareamento de iniciadores com seqüências repetitivas, distribuídas no genoma. Neste caso, os iniciadores ou “primers” promovem a amplificação do DNA presente entre duas seqüências ERIC próximas. Essas seqüências não codificantes se repetem ao longo do genoma em intervalos de tamanhos diferentes, sendo as mesmas repetidas como ponto para o anelamento dos “primers” ou iniciadores. Muitos estudos reportam a utilização da tipagem molecular para determinar a variabilidade genética em cepas de *H. influenzae* utilizando a técnica da ERIC-PCR (GÓMEZ-DE- LEON et al., 2000; PETTIGREW et al., 2002).

## 1.7- PROFILAXIA: A VACINA

Os primeiros trabalhos com polissacarídeos como antígenos e imunógenos partiram da utilização da cápsula do *Streptococcus pneumoniae*. Na era pré-antibiótico, a pneumonia pelo pneumococo foi a doença mais freqüente e a que mais causou mortes. Em 1923, Heidelberger & Avery demonstraram que polissacarídeos eram o antígeno-tipo para imunização. Em 1929, os trabalhos de Avery & Goebel mostraram que os polissacarídeos do pneumococo, quando quimicamente conjugados a proteínas, aumentavam a imunogenicidade bem como as respostas de reforço. Em 1945, foi demonstrado que os polissacarídeos purificados de pneumococo, se utilizados como vacina parenteral, poderiam prevenir a pneumonia por pneumococo.

As vacinas bacterianas tradicionais são feitas com células inteiras ou mortas de bactérias como a do Bacilo Calmette-Guérin (BCG) ou a *Bordetella pertussis*, e toxóides (toxinas bacterianas quimicamente inativadas) como as vacinas contra tétano e difteria. Expectativas de grandes descobertas e avanços tecnológicos foram ampliadas com a possibilidade de vacinas conjugadas. Estas incluem veículos protéicos, mais imunogênicos, acoplados a polissacarídeos específicos formando o terceiro grupo de vacinas bacterianas. As tradicionais, no entanto, são produzidas em alta escala e a custo não elevado tendo sua produção difundida em todo o mundo, enquanto as conjugadas ainda são restritas a poucos pelo alto custo tecnológico. O custo por dose é de US\$ 2.50 (três doses US\$ 7.50), o que compensa grandemente visto que o custo de um paciente com meningite por Hib pode variar de US\$ 1000 a 10.000 para livrá-lo da morte, em casos extremos (RUSSELL et al., 2003) ou como já mencionado nesse trabalho, minimizar as seqüelas, muitas vezes graves, deixadas com essa doença.

O desenvolvimento das vacinas polissacarídicas conjugadas foi um marco na produção de imunobiológicos após a disponibilidade da clássica tríplice bacteriana (contra a difteria, tétano e coqueluche /DTP). Neste novo grupo, a primeira vacina conjugada apresentada foi contra o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), destinada a prevenir, principalmente, a meningite por Hib. Previu-se, então, que o sucesso desse imunógeno traria novas vacinas conjugadas de polissacarídeos contra doenças causadas por outras bactérias patogênicas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* (POOLMAN, 1990).

A primeira vacina disponível para prevenção de doenças provocadas por *Haemophilus influenzae* tipo b foi desenvolvida no início dos anos 70, composta basicamente de cápsula polissacarídica purificada de Hib (RODRIGUES et al., 1971; ANDERSON et al., 1972; ADAMS et al., 1993). O polissacarídeo purificado demonstrou uma eficiência satisfatória em crianças acima de 18 meses (GRANOFF & CATES, 1985; WHO, 1991; MMWR, 1991; ADAMS et al., 1993). Estudos realizados na Finlândia, a partir de 1974, demonstraram a capacidade imunogênica da vacina constituída pelo polissacarídeo capsular do *Haemophilus influenzae*, o polirribosil-ribitol-fosfato ou PRP (MÄKELÄ et al., 1977, 1988; PELTOLA et al., 1977, 1984). Os autores concluíram que o PRP era capaz de conferir proteção a 90% das crianças vacinadas com 18 a 71 meses de idade contra todas as formas de doença invasivas causada por *H. influenzae* tipo b. Observaram também que a vacina não conferia imunidade a crianças menores e que a resposta imunogênica tornava-se mais intensa e duradoura com o aumento da idade, passando a ser semelhante entre adultos e crianças a partir do sexto ano de vida. A persistência de nível protetor de anticorpos, nos vacinados entre 18 e 35 meses de idade, variou de um ano e meio a três anos e meio. A eficácia protetora dessa vacina, em 90% das crianças entre 24 e 59 meses de idade, foi também comprovada (HARRISON, BROOME & HIGHTOWER, 1989). Em outros estudos realizados nos EUA, a vacina utilizando o PRP sozinho protegeu 41 a 88% das crianças estudadas com idade igual ou superior a 18 meses.(MMWR, 1991).



## 1.8 - MECANISMO IMUNE ENVOLVIDO

A resposta imunitária ao polissacarídeo desenvolve-se pela presença do antígeno e ativação do linfócito B, sem intervenção dos linfócitos T. Isto provoca uma resposta primária do tipo IgM, sem grande amplitude e que não permite estimular a memória imunitária duradoura.

O PRP, como todo polissacarídeo, é um antígeno timo-independente. Até a idade de 18 meses os linfócitos B do lactente se encontram em estado de maturação, insuficiente para permitirem resposta sem ajuda do linfócito T. Foi necessário acoplar ao PRP uma proteína carreadora para se obter uma resposta timo dependente, eficaz em crianças com idade abaixo dos 18 meses. Desta forma, a resposta imunitária passa então pela estimulação dos linfócitos T, que ativam os linfócitos B por intermédio de fatores solúveis. Isto permite uma produção precoce, a partir do segundo mês, de anticorpos anti-PRP nos quais a IgG predomina, e doses subsequentes estimulam a memória imunitária. É esta a base da vacinação atual.

Em 1980, a partir deste conhecimento, Schneerson e colaboradores fizeram modificações que tornaram o polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b mais imunogênico, ligando-o quimicamente a uma proteína carreadora. A vacina constituída por este composto foi testada em crianças de diferentes faixas etárias e o resultado foi bastante satisfatório para crianças menores de 18 meses.

Em 1987, a vacina PRP foi substituída, nos EUA, por vacinas conjugadas mais eficazes dotadas de capacidade imunogênica em crianças menores (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1988, 1989, 1990; MMWR, 1988, 1991).

## 1.9 - TIPOS DE VACINA

Atualmente, quatro tipos de vacinas conjugadas contra Hib são licenciadas para crianças a partir de seis semanas, adotando-se, de regra, o critério da primeira dose com 2 meses de idade . Todas elas utilizam o mesmo princípio imunogênico variando apenas quanto ao tipo de carreador protéico, como sintetizamos a seguir no quadro 2:

QUADRO 2 - Tipos de vacina conjugada contra o *H. influenzae* tipo b (Hib)

Vacina	Proteína Carreadora	Produtor
PRP-D	toxóide diftérico	Connaught Labs.
HbOC	proteína de mutante de <i>C. diphtheriae</i>	Lederle/Praxis
PRP-T	toxóide tetânico	Pasteur Merieux SmithKline Bio-Manguinhos
PRP-OMP	proteína de membrana externa de <i>N. meningitidis</i> B	Merck S. Dhome

- a) PRP-D: o PRP é conjugado com o toxóide diftérico.
- b) HbOC: utiliza oligossacarídeos da cápsula (segmentos curtos de PRP) são conjugados com a proteína de uma cepa mutante de *Corynebacterium diphtheriae*, a CRM 197.
- c) PRP-T: possui o PRP conjugado com o toxóide tetânico.
- d) PRP – OMP: neste tipo o PRP está conjugado com as proteínas da membrana externa do meningococo do grupo B.

Adaptado de WHO (1991)

## 1.10 - EPIDEMIOLOGIA

Antes da implementação de vacinas conjugadas contra *H. influenzae* tipo b nos Estados Unidos ao final da década de 1980, o índice anual de incidência de infecções causadas por esta bactéria estava na faixa de 67 a 129 casos / 100.000 crianças de até 5 anos de idade, sendo que 50% dos casos ocorriam em crianças com idade inferior a 2 anos. Com a generalização do uso das vacinas conjugadas para Hib nos países industrializados, as infecções clássicas invasoras produzidas por este microrganismo têm diminuído drasticamente (LÓPEZ et al., 2000).

Após o início da vacinação em 1988, houve um declínio de 80 a 85% dos casos totais de meningite por *H. influenzae* tipo b em crianças, não somente nos EUA, mas também em países da Europa (ADAMS et al., 1993; BROADHURST et al., 1993; MURPHU et al., 1993; BARQUET et al., 1996; MENDELMAN et al., 1997). Em 1998, Foxwell e colaboradores, em uma avaliação da vacinação iniciada nos Estados Unidos e na Europa, descreveram e reforçaram os esforços empreendidos para o desenvolvimento da vacina conjugada contra o Hib mostrando sua eficácia, mas consideraram também que o foco nesta área da saúde humana tem revelado uma mudança para os *H. influenzae* não tipáveis (HiNT), explicado pelo fato da vacina conjugada anti-Hib, ao agir diretamente contra a cápsula do polissacarídeo tipo específico, não tem, portanto, capacidade de prevenir infecções causadas pelos HiNT, bem como pelos outros tipos capsulares.

De fato, com a redução das doenças invasivas na Europa e Estados Unidos pelo decréscimo do Hib, os problemas de Saúde Pública apontam para a observação dos outros tipos capsulares (a,c e f) e das cepas não capsuladas (GÓMEZ-DE-LEON et al., 2000).

Estudos recentes realizados no Reino Unido e República da Irlanda (HEATH et al., 2001) mostraram que, com o declínio das doenças causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b devido a ampla utilização das vacinas conjugadas, o *Haemophilus influenzae* não b (Hinb) aparece em muitos processos infecciosos como agente principal, o que poderá torná-lo a mais importante causa da doença por *Haemophilus influenzae*. Os *H. influenzae* não b constituem, atualmente, um campo de investigações em diversas regiões do mundo.

Nas crianças vacinadas com a vacina conjugada contra o Hib, os Hi não b poderão ser expressivos agentes infecciosos de doença (HEATH et al., 2001). Reforçando este pensamento, Adderson et al., 2001 consideram que, com a drástica diminuição e a hipotética eliminação do *Haemophilus influenzae* tipo b, outros sorotipos podem adquirir forte virulência e emergir como importantes patógenos em crianças (REIS et al., 2002; DE ALMEIDA et al., 2005), como foi mostrado na figura 3.

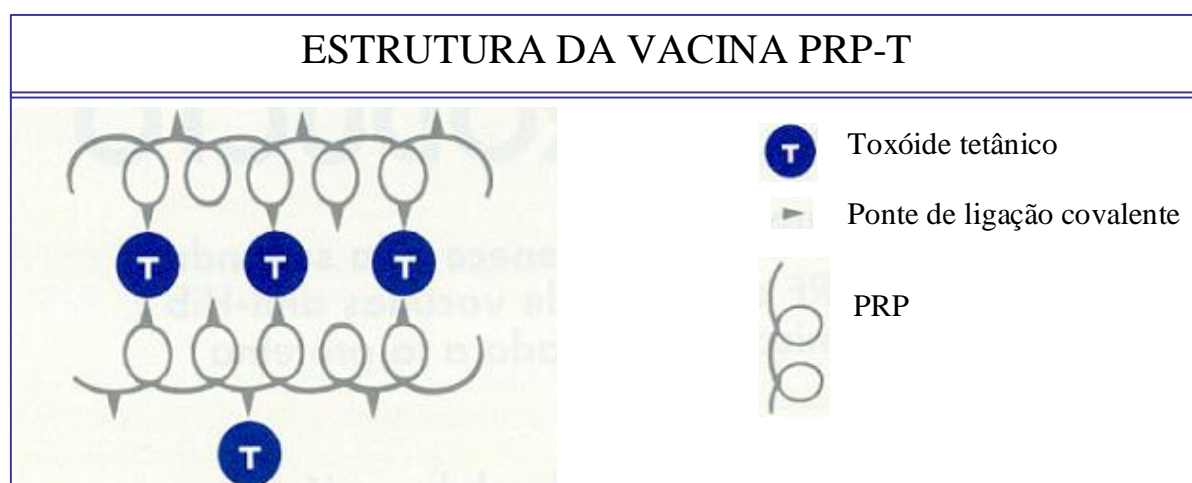
Em países desenvolvidos, onde o uso da vacina conjugada contra o Hib teve eficácia de 95-98% e os sistemas de vigilância epidemiológica são ativos e rastreadores facilitando o início imediato das ações necessárias para o controle da situação, têm-se relatado casos por HiNT (FALLA et al., 1993).

Já nos países pobres ou em desenvolvimento os sistemas de saúde existentes são muitas vezes limitados nas ações pertinentes para a situação emergencial requerida. Ali, muitos recém-nascidos prematuros, com tempo de gestação de 28-30 semanas, nascem com complicações respiratórias, e dificilmente sobrevivem, tendo-se em 90% desses óbitos o isolamento do HiNT em hemoculturas (FRIESEN, C. A & CHO C. T., 1986; GARCIA et al., 1985). Estudos recentes em Israel relataram, pela primeira vez, 9 casos de recém-nascidos prematuros, que desenvolveram septicemia e pneumonia tendo em 8 deles o isolamento do HiNT e um Hid no período de 2000 a 2004 (HERSHCKOWITZ et al., 2004).

Pequisas realizadas (GRANOFF & CATES, 1985; BIJLMER, 1991; JENNINGS & PON, 1991; MMWR, 1991; WHO, 1991; ADAMS et al., 1993; IWARSON, 1993; BARQUET et al., 1996; MURPHY, 2003) reforçam claramente que as infecções do trato respiratório associadas aos HiNT ainda são freqüentes, como na década de 80, em muitos países em desenvolvimento ou não industrializados como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, ou ambas, em crianças, onde o Hib já alcançou até 30% de letalidade como citado anteriormente (item 1.1).

Em nosso país onde a vacinação só teve início, na segunda metade de 1999, atingindo então a maioria dos municípios, seu impacto na diminuição dos casos de meningite por Hib é conhecido parcialmente, havendo carências de publicações. Dados do CDI/ CENEPI/ FNS, atualizados em 11/02/03, mostram que em 1999 foram notificados 1616 casos, enquanto 2003 houve 111 casos confirmados de meningite por *H. influenzae* tipo b, uma redução de 93,3% em relação a 1999, ano do início da vacinação no Brasil.

A figura 5 ilustra a estrutura da vacina brasileira cuja fração imunogênica é o PRP-T.



· FIGURA 5 - Estrutura da vacina conjugada contra o *H. influenzae* tipo b (Hib). Composta de polissacarídeo capsular poliribosil-ribitol-fosfato (PRP) purificado de Hib, covalentemente ligado ao toxóide tetânico.

A apresentação desse imunobiológico na forma de lífilo, facilitou sua combinação à vacina DTP (Difteria, Tétano e Pertussis) que, por sua vez, sendo apresentada na forma líquida, funcionou também como “diluyente“. Constituiu-se assim a vacina tetravalente que permite reduzir o número de injeções, evasão de retorno para doses subseqüentes e custos por utilizar apenas uma seringa. Ambos os produtos, PRP-T e DPT, são produzidos no Brasil pelos Institutos Bio-Manguinhos / FIOCRUZ e Butantan, respectivamente. O esquema de vacinação atualmente utilizado no país pelo PNI/MS, é apresentado no quadro 3.

QUADRO 3 - Calendário Básico de Vacinação contra o *H. influenzae* tipo b (Hib)-PNI/MS

IDADE	VACINAS	DOSES	DOENÇAS EVITADAS
2 meses	Vacina Tetravalente (DTP + Hib)	1º Dose	Difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo <i>H. influenzae</i> tipo b.
4 meses	Vacina Tetravalente (DTP + Hib)	2º Dose	idem
6 meses	Vacina Tetravalente (DTP + Hib)	3º Dose	idem
12 a 23 meses com esquema incompleto e não vacinados	Hib	1 dose	Meningite e outras infecções causadas pelo <i>H. influenzae</i> tipo b.

Como existem diferentes esquemas vacinais, utilizando três ou quatro doses, o Ministério da Saúde optou pelo esquema de três doses no primeiro ano de vida, dispensando o reforço aos quinze meses. Crianças de 12 a 23 meses que não completaram o esquema de três doses ou não se vacinaram no primeiro ano de vida, deverão fazer apenas uma dose. Se a imunização primária for feita com vacina conjugada com proteína da membrana externa da *N. meningitidis* B (PRP-OMP), recomenda-se à aplicação de somente duas doses no primeiro ano de vida, sendo necessário o reforço (Capacitação de Pessoal em Sala de Vacinação – Manual do Monitor-FUNASA, 2001; ANFARMAG, 2005). Alguns países como os da península Escandinávia, onde se deu início a vacinação contra o Hib houve uma redução da incidência da meningite pelo Hib em quase 100%. Na Dinamarca,

segundo Hviid & Melbye (2004), a eficácia com 3 doses foi de 99,29%. Na Finlândia o uso de 3 doses, iniciado desde 1988, é até hoje utilizado com sucesso (4, 6 e 14 – 18 meses), embora três casos de meningite por Hib em vacinados tenham sido descritos nos últimos dez anos, um em 1995, de uma menina de 6 anos de idade, vacinada com as três doses de PRP-D; um em 1999, um menino de 4 anos de idade, vacinado com três doses de HbOC; e um em 2000, um menino de 4 meses de idade, este vacinado somente com uma dose da vacina HbOC. Outros três casos de meningites, porém, por Hib, foram encontrados nesse período: dois pelo Hib e um pelo Hib, de pacientes sem problemas imunológicos (PELTOLA, SALO & SEXÉN, 2005). Anteriormente, Campos Marques & Aracil Garcia (2003) já relatavam o aparecimento de falhas vacinais na Europa, sobretudo após o uso das vacinas combinadas. O Reino Unido passou a administrar uma dose de reforço, em 2003, recomendada a todas as crianças de 6 meses a 4 anos; ali são usadas rotineiramente vacinas combinadas de Hib com: poliovírus inativado (IPV), tríplice bacteriana tradicional, a célula inteira da *B. pertussis* (DTP), DTP com o componente pertussis acelular e com a anti-hepatite B. A Holanda que não faz uso da DTP com o componente acelular e sim a DTP tradicional combinada com a vacina contra o Hib, também teve casos de falha vacinal. O significado clínico ainda não foi esclarecido. A Espanha que usa Hib+DTP acelular adotou uma dose de reforço da vacina conjugada contra o Hib aos 18 meses. Dessa forma os autores concluíram que o uso da dose de reforço tornou-se importante quando se observou o declínio de anticorpos específicos (anti-PRP). Este cenário nos leva a prever estudos futuros da permanência dos anticorpos em níveis protetores, já que em nosso país, desde 2002, é utilizada pelo PNI/MS no calendário de vacinação, a vacina combinada Hib+DTP, como citada anteriormente.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1- OBJETIVO GERAL

Ampliar os conhecimentos epidemiológicos sobre o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e o não b (Hinb), através da caracterização de cepas isoladas de material clínico por marcadores fenotípicos e moleculares, visando ao monitoramento das cepas circulantes em diferentes áreas geográficas e à detecção de possíveis clones relacionados filogeneticamente, em períodos pré e pós - vacinação contra Hib no Brasil.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização dos sorotipos e biotipos de isolados clínicos de *Haemophilus influenzae* por metodologias sorológicas e bioquímicas (Manuscrito 1).
- Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por *Haemophilus influenzae*, bem como a detecção de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase (Manuscrito 2).
- Determinação da variação genética pela técnica "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR)" e observação da relação genética entre as diferentes cepas da espécie *H. influenzae* utilizadas (Manuscrito 3).
- Caracterização e tipagem molecular por amplificação dos genes da região capsular *cap* das cepas isoladas de *H. influenzae* (Manuscrito 3).



### 3 - RESULTADOS

Optamos por apresentar os resultados obtidos nessa tese no formato de coletânea de artigos científicos, com a apresentação de três manuscritos. O primeiro publicado em maio de 2005 (Manuscrito1), o segundo recentemente (Manuscrito 2) e o terceiro já submetido (Manuscrito 3).

3.1 - MANUSCRITO 1 – Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine (publicado em *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 38 (5):777-781, 2005).











3.2- MANUSCRITO 2 – Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from four centers in Brazil (1990-2003).(publicado em *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54 (1):57-62, 2006).















3.3 - MANUSCRITO 3 – Molecular and phenotypic characterization of *Haemophilus influenzae* strains isolated from Brazilian patients before and after vaccination against *Haemophilus influenzae* type b (Hib). (submetido para publicação na *Journal of Medical Microbiology* em setembro de 2005).





















































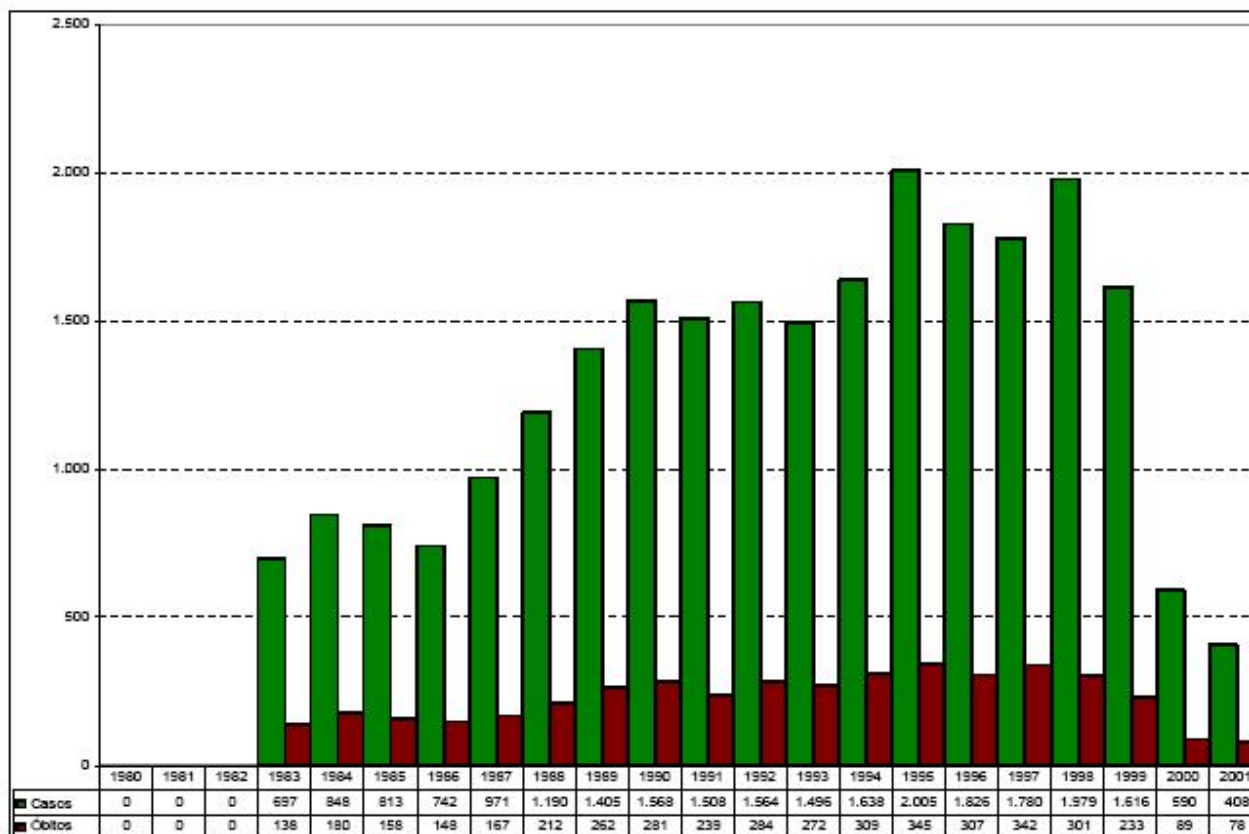
#### 4 - DISCUSSÃO

O Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ no Rio de Janeiro – RJ, tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária.

Assim, se justifica possuir coleções de microrganismos de referência a serem utilizadas nos ensaios oficiais. Neste sentido, a partir de 1990 criou-se uma nova coleção de isolados bacterianos de processos infecciosos humanos por *Haemophilus*, considerando-se o interesse em projetos de pesquisa de relevância ou programas de monitoramento de diagnóstico e controle para a saúde pública, na área da Microbiologia.

A iniciativa do INCQS de obtenção de isolados de casos clínicos com suspeita de meningites bacterianas, começou no período de 1989-1990 quando foram implementadas campanhas de vacinação com a vacina produzida em Cuba, em São Paulo e Rio de Janeiro, visando o controle da meningite causada pela *N. meningitidis* sorogrupo B, que já apresentava uma taxa de ocorrência elevada na população (DE FILIPPIS, 2005). A partir de então passou-se a preservar as cepas isoladas, iniciando-se com aquelas procedentes do estado do Rio de Janeiro, através do Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IESS)/ SES. Este integrava, juntamente com o INCQS e outros participantes, o grupo técnico de Meningites do Rio de Janeiro - RJ. Observou-se desde aí que, uma parte considerável dos isolados clínicos enviados ao INCQS era de *Haemophilus influenzae* b (Hib). Ao mesmo tempo, acompanhávamos a persistência ou o avanço das meningites bacterianas em todo o mundo, inclusive a causada pelo Hib em nosso país, conforme mostrado no gráfico 1. A partir de 2003, constatava-se o sucesso da primeira vacina conjugada contra o Hib, aplicada na população brasileira desde 1999, apesar de disponível em outros países desde 1988, capaz de proteger crianças menores de 2 anos, como se observava na Finlândia e nos EUA, e a seguir na Dinamarca, Reino Unido e Canadá (HVIID & MELBYE, 2004; McVERNON et al., 2004; PELTOLA, SALO & SEXÉN, 2005; SCHEIFELE et al., 2005).

GRÁFICO 1 - MENINGITE PI *HAEMOPHILUS* – Série histórica de casos e óbitos no Brasil, 1980 – 2003.



Fonte: COVER / SINAN / DEVEP / SVS / MS  
 Dados atualizados em 11/02/04



Esse fato fez com que o PNI/MS se decidisse por sua inclusão no calendário das vacinas infantis. Preocupava-nos o fato de que, no Brasil, raras pesquisas haviam sido publicadas sobre o *H. influenzae* b (ou outros sorotipos) seja como agente de meningite ou de outros quadros clínicos. A necessidade de possíveis análises desses aspectos nos motivou a realizar o presente estudo dentro dos objetivos considerados nesse projeto.

A proposta inicial, mais abrangente, envolvia todas as regiões brasileiras, pela inclusão de cepas de *H. influenzae* de pelo menos um estado de cada região. Pretendia também estabelecer correlação entre as cepas isoladas e os aspectos clínicos da infecção incluindo forma clínica, resposta terapêutica, letalidade e história vacinal dos pacientes. Entretanto, a heterogeneidade no preenchimento das fichas obtidas trazendo informações muitas vezes incompletas, levaria a uma redução da inclusão de casos e, portanto, de isolados, que porém poderiam ser aproveitados sob outros aspectos considerados no estudo. Contudo, as análises não realizadas nesta oportunidade, deverão ser feitas posteriormente, com a continuação dessa linha de pesquisa.

Como o Instituto Adolpho Lutz de S. Paulo-SP (IAL-SP) inclui o Centro Nacional de Meningites, planejamos inicialmente a realização da pesquisa em parceria. Porém (em que pese a concordância da Diretoria, o envio do projeto e a visita pessoal para acertos entre as partes envolvidas), não obtivemos colaboração, o que foi então justificado por estar sendo ali desenvolvido projeto semelhante ao proposto. Diante disso, admitimos que uma possível dupla abordagem poderia ser interessante para comparação. Assim, optamos por desenvolver nosso estudo com as cepas que dispúnhamos, procedentes das três maiores regiões populacionais do Brasil, Sul, Sudeste e Nordeste, através dos estados de Santa Catarina, Rio de Janeiro e Pernambuco, respectivamente, os quais, por vínculos prévios, nos enviavam cepas desde o período pré-vacinação contra o Hib.

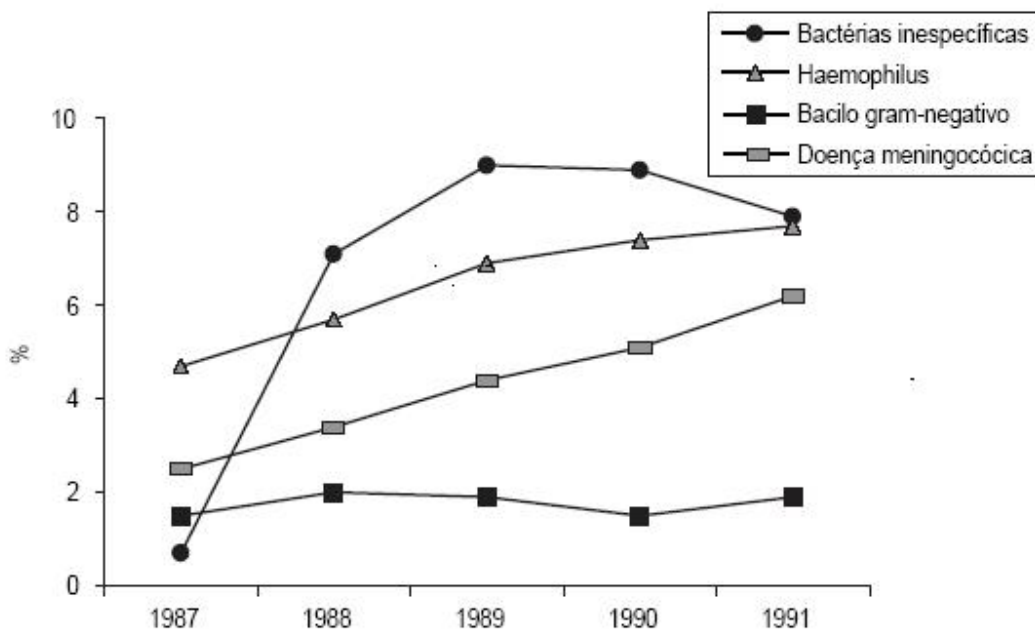
Justamente a região norte ficou sem material representativo em nosso projeto, como também ocorreu no estudo de Zanella et al. (2002) que utilizaram a coleção do IAL-SP, porém com a ausência de cepas representantes de nove estados brasileiros. Esses autores propuseram a princípio, fazer uma análise retrospectiva dos sorotipos, biotipos e da resistência aos antimicrobianos nas 3204 cepas de Hi isoladas de 1990-1999, antes da vacinação. Os resultados apresentados foram de 97,8% para o tipo sorológico b e também para os biotipos I e II. A frequência do tipo a foi de 0,5% e somente 1,5% dos NT.

A importância de estudos colaborativos envolvendo a região norte do país, nessa linha de pesquisa, se reforça pelas observações de Bouskela et al. (2000), que demonstraram nessa região que a letalidade pelo Hi alcançou 35% em 1987 contra 22% para o Brasil como um todo. Os autores, porém, apontam falhas nos dados nacionais que podem mascarar a incidência e a letalidade regionais pelo Hi. Comparam também a incidência no Brasil em 1991, que foi de 18,4 em 100.000 crianças menores de 1 ano, enquanto no Distrito Federal foi de 175 em 100.000 crianças entre 4 e 6 meses. Implementando essas observações, o estudo de Miranzi e colaboradores (2003) sobre a situação epidemiológica no Estado de Minas Gerais no período de 1987 a 1996, considera que as taxas nacionais encontradas poderiam estar subestimadas pelo fato de que, nesse período, as meningites sem especificação de etiologia corresponderam a um terço das meningites notificadas, e que vários estados brasileiros não enviaram dados. Esses pontos destacados nos mostram a necessidade de haver pessoal motivado e treinado em serviços de referência distribuídos por todo o país para o diagnóstico clínico e laboratorial, não somente das meningites mas de outros processos infecciosos cujas etiologias podem ser definidas.

O baixo número de isolados de Hib diante de suspeitas clínicas, portanto não confirmadas laboratorialmente, pode ser explicado por falta dos procedimentos mínimos de exigência técnica para o isolamento e identificação desse agente.

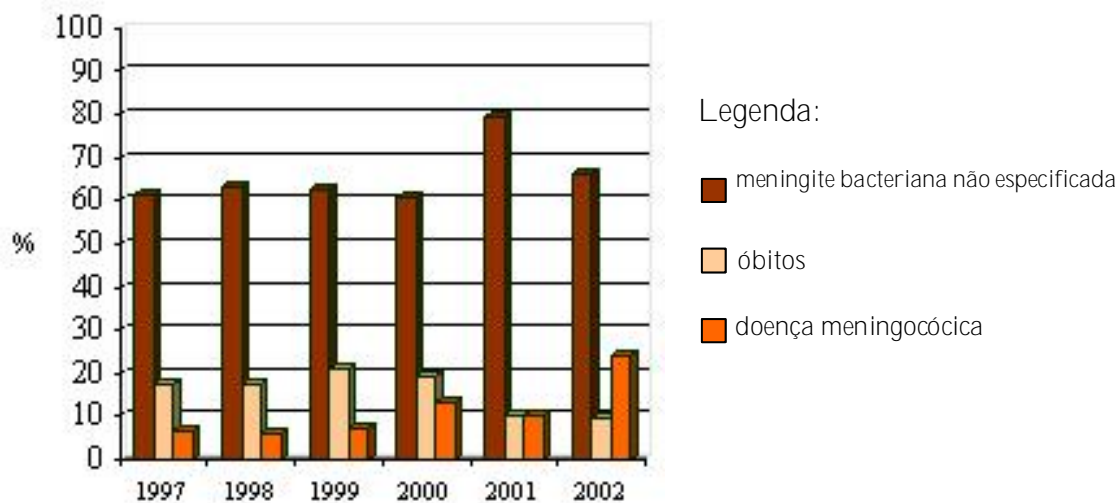
Devemos considerar que, ainda hoje, existe grande parte de meningites que não são diagnosticadas completamente, ficando apenas na bacterioscopia, tendo como resultado final a notificação de meningites bacterianas inespecíficas e por bastonetes Gram-negativos que em grande parte podem ser o Hib, como mostra o gráfico 2 da FNS/MS (BOUSKELA et al., 2000). Reforçando essas considerações, o gráfico 3 mostra que as meningites bacterianas não especificadas no Rio de Janeiro, no período de 1997-2002 mantêm números elevados (MARZOCHI et al., 2004).

GRÁFICO 2 - Incidência de meningite por diversas causas em crianças menores de 4 anos, Brasil, 1987 a 1991.



Fonte: Centro de Doenças Infecciosas (CDI) Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI)/ Fundação Nacional de Saúde (FNS), 1993.

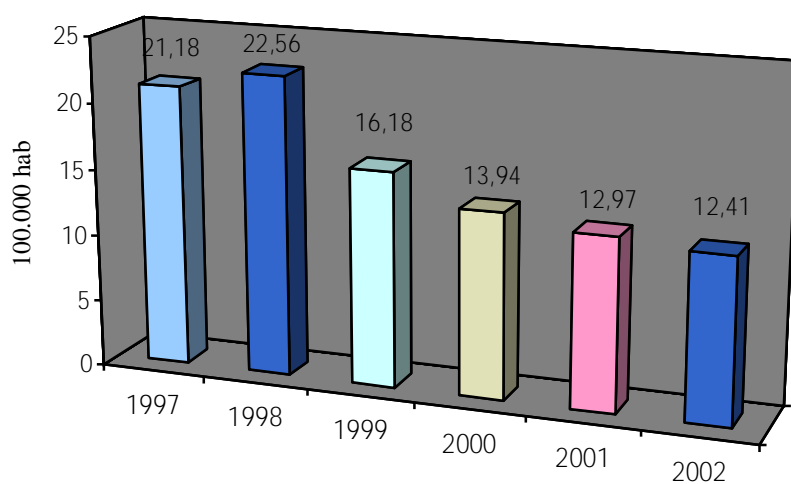
GRÁFICO 3 – Evolução dos casos de meningite bacteriana não especificada no município do Rio de Janeiro.



Fonte: MARZOCHI et al., 2004

O gráfico 4 mostra particularmente as meningites em geral no Rio de Janeiro. Em 1998 há um aumento da taxa de incidência chegando a 22,56 / 100.000 habitantes. Observa-se que desde 1999, ano de início da vacinação com a vacina conjugada contra o Hib, começa a diminuir essa incidência.

GRÁFICO 4 -Taxa de incidência de meningites no município do Rio de Janeiro – 1997 a 2002

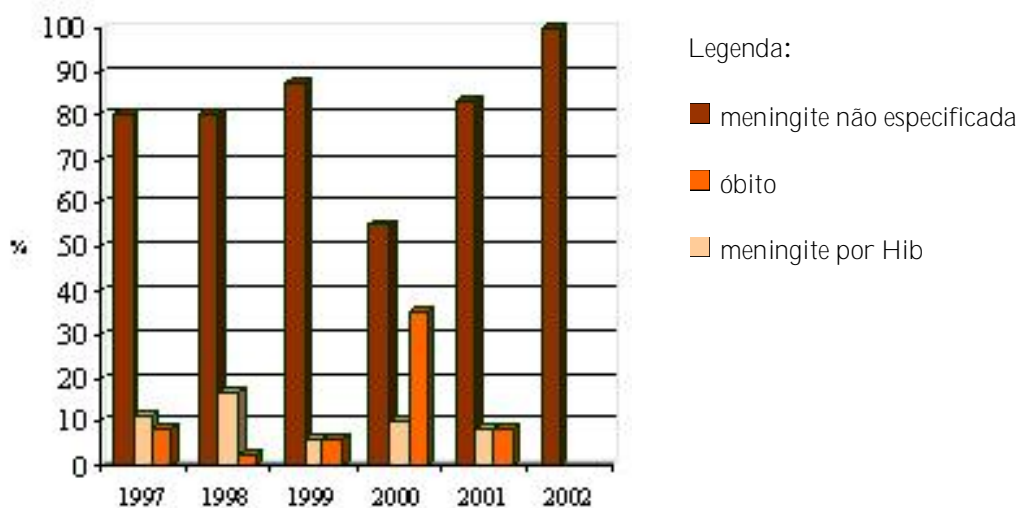


Fonte: MARZOCHI et al., 2004

Como esperávamos, no período pós-vacinação, o recebimento de cepas de isolados de *H. influenzae* foi baixo. Entretanto, fica difícil explicar o porquê de ter sido especialmente nos anos 2000 e 2001, período em que se restringiram a quatro e três isolados, respectivamente, tendo sido todos do sorotipo b e procedentes do Rio de Janeiro.

Nesse período chegamos a supor que a redução tão acentuada de isolados clínicos devia-se à incorporação da vacina conjugada contra o Hib que teria resolvido de imediato os problemas associados a essa doença. O gráfico 5 nos mostra a evolução de casos de meningite por Hi no município do Rio de Janeiro com ausência de notificação em 2002. Porém, dados do MS/SVS/SINAN (2003) relatam 11 notificações, em 2002, no Rio de Janeiro, o que vem reforçar as observações descritas de falhas nos dados de vigilância (BOUSKELLA et al., 2000; MIRANZI, CAMACHO & VALENTE, 2003).

GRÁFICO 5 – Evolução dos casos de meningite por *H. influenzae* no município do Rio de Janeiro (1997-2002)



Fonte: MARZOCHI et al., 2004

Como já foi citado anteriormente, trata-se de uma vacina altamente eficaz; mas a evolução no tempo apontou para a necessidade do acompanhamento da situação epidemiológica nacional. Assim, a tentativa de isolar o Hi de todos os processos infecciosos passíveis de serem causados por essa bactéria, mesmo após a vacinação com a vacina conjugada contra o Hib, deve ser incentivada, para se verificar o real decréscimo do tipo b nas meningites em crianças e seu eventual deslocamento de faixa etária, bem como o possível ressurgimento deste, de outros sorotipos e dos NT em outros quadros infecciosos antes raros (BOKERMANN et al., 2003; CERQUETTI et al., 2003; BRUUN et al., 2004; DE ALMEIDA et al., 2005; VEGA-BRICEÑO et al., 2005). Isso, porém, requereria um trabalho coordenado de diagnóstico hierarquizado, uma vez que, muito mais expressiva em todas as regiões do Brasil é a ausência de identificação da espécie e do tipo sorológico do Hi. Já o diagnóstico pelo menos da meningite por Hib pode ser obtido com mais facilidade: pela cultura do líquido, hemocultura, detecção do antígeno no LCR, soro ou na urina.

Contando com essas dificuldades é que, muitas vezes, o clínico inicia imediatamente o tratamento de meningites quando considera o Hi como agente suspeito mais provável, com base empírica, associando os dados clínicos de história, porta de entrada e idade com os resultados inespecíficos de laboratório. Disso, por sua vez, podem resultar insucessos quanto à resposta terapêutica, pela falta de apoio no antibiograma que também tem um papel a ser considerado. Apesar de tudo deve ser buscada, através de um diagnóstico acurado, a identificação do agente etiológico. E assim, em síntese, a relevância desse trabalho prende-se ao monitoramento do diagnóstico do *H. influenzae* requerido pela existência do programa de imunizações contra o Hib no Brasil, sobre o qual o INCQS também tem um devido papel a cumprir.

Poucas vacinas na história da humanidade levaram a uma queda na incidência, em curto espaço de tempo, como a vacina conjugada contra o Hib (PELTOLA, 2000; HEATH et al, 2001; HVIID & MELBYE, 2004; DE ALMEIDA et al., 2005). Em nosso país, antes da inclusão deste imunobiológico no calendário do Programa Nacional de Imunizações – PNI do Ministério da Saúde, em agosto de 1999, os casos das infecções graves, sobretudo das meningites bacterianas pelo Hib, representavam mais que 95% das infecções invasivas. Essas taxas elevadas, que também eram comuns em países como Estados Unidos, Reino Unido e outros países da Europa, diminuíram muito (SLACK et al. 1998; SANTOSHAN, M.2000; SATOLA, SCHIRMER & FARLEY, 2003; HVIID & MELBYE, 2004). No Brasil, as estatísticas mostraram que, em 1999, foram registrados 1368 casos, enquanto em 2001, notificaram-se somente 234 casos; uma redução de 83% em apenas dois anos, graças à introdução da vacina conjugada (FUNASA, 2003). Porém, o gráfico 1, apresentado anteriormente, mostra que esses dados estavam incompletos tendo seus valores alterados de 1616 em 1999 para 408 casos em 2001 (CDI/ CENEPI/ FNS 2003).

Dados do CENEPI/FUNASA/MS mostram que, no período entre 1990 e 1999, portanto correspondente ao período considerado de pré-vacinação em nosso estudo, a incidência da meningite por Hib em crianças de um a quatro anos variou entre 22,3 e 8,8% casos por 100.000 habitantes, em que pesem às dificuldades de isolamento do *H. influenzae* já consideradas. A letalidade nesta fase foi de 19,9 e 17,1 %, respectivamente. A vacinação, maior responsável pela mudança deste cenário nos anos de 2002 e 2003, conseguiu atingir 92,91 e 95,99 %, respectivamente, das crianças entre dois meses até cinco anos de idade.

No Brasil, são conhecidos poucos estudos sobre esse assunto anteriores a 1990. O trabalho de Landgraf & Vieira (1993), do Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP), revelou a situação na cidade de São Paulo. Outros estudos (CRITCHLEY et al., 2000; SADER et al. 2000) se voltam para isolados em infecções respiratórias frente ao uso de antimicrobianos. Publicações como a de Zanella et al.(2002), também do IAL, citadas anteriormente nesse trabalho, mostram o panorama nacional do Hib na fase pré-vacinação. O estudo contou com 3204 cepas de *H. influenzae*, das quais 1534 (47,8%) eram procedentes de S. Paulo, e as restantes representavam alguns dos estados brasileiros. O predomínio do tipo b foi elevado (97,8 %).

Sabe-se que a cultura deste microrganismo é difícil, exigindo procedimentos iniciais rápidos já nos primeiros repiques, o que, quando não seguidos pode tornar a cultura inviável gerando falsos negativos ou até, dependendo do sítio de obtenção do material, a presença de outros microrganismos contaminantes, como único crescimento obtido. Também o uso indiscriminado de antibióticos, sem a realização da cultura prévia, é freqüente, contribuindo para inviabilizar o crescimento do microrganismo, como comentado nos Manuscritos 1 e 2.

As cepas que fazem parte deste estudo foram isoladas de pacientes pediátricos de 0 a 10 anos de idade, com doenças como: meningite (185), septicemia (3), bronquite crônica (37), sinusite (2), escarro sanguinolento (7) e otite (1). Estes isolados clínicos fazem parte da Coleção de Pesquisa do INCQS, como já dito anteriormente. O Instituto recebeu os isolados de diferentes regiões do Brasil. Procederam do Nordeste (Pernambuco, n=54), do Sul (Santa Catarina, n=19), ambos enviados pelos Laboratórios de Saúde Pública estaduais (LACEN) e do Sudeste (Rio de Janeiro, n=162) fornecidos pelo Instituto Fernandes Figueira - IFF da FIOCRUZ e pelo IESS da Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro - RJ. O estudo destas 235 cepas, originárias de três regiões brasileiras, com a determinação de suas características fenotípicas e moleculares, bem como a determinação do perfil da sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados, pioneiro nessa área, contribuiu de alguma forma para o diagnóstico da situação epidemiológica do Brasil pós-vacinação.

Apresentamos na tabela 1 as peculiaridades de cada manuscrito, que compõem os resultados do nosso projeto:

TABELA 1 –Cepas de *H. influenzae* (Hi), tipo b (Hib) e Hi não b utilizadas em cada manuscrito.

	Manuscrito 1 Total = 229	Manuscrito 2 Total =174	Manuscrito 3 Total = 235
Pré-vacinação			
Total (Hi)	167	98	159
Hib	165	96	155
Hi não b	02	02	04
Pós-vacinação			
Total (Hi)	62	76	76
Hib	33	43	43
Hi não b	29	33	33
Origem por estado			
PE	54	49	54
Pré-vacinação	30	30	30
Pós-vacinação	24	19	24
RJ	156	106	162
Pré-vacinação	124	55	116
Pós-vacinação	32	51	46
SC	19	19	19
Pré-vacinação	13	13	13
Pós-vacinação	06	06	06

No Manuscrito 1 apresentamos a pesquisa realizada com parte desta coleção, utilizando 229 cepas de Hi isoladas de três estados brasileiros (PE, RJ e SC), em que associamos os achados das três regiões do país representadas. No período de 1990 a 2003, portanto incluindo as fases pré e pós-vacinação, observamos que todas as cepas coletadas até 1999 foram isoladas de casos de meningite (167) e destas, 98,8% (165) foram do tipo sorológico b, o que está de acordo com outros estudos anteriores (MURPHU et al., 1993; RIBEIRO et al., 2003; SIMÕES et al., 2004). Contudo, a presença do sorotipo b, na fase pós-vacinação (após 1999 no caso do Brasil), ainda é demonstrada em várias pesquisas (ADAMS et al., 1993; MURPHU et al., 1993; HARGREAVES et al., 1996; ADDERSON et al., 2001). Nas cepas estudadas deste período ocorreu uma queda acentuada de números absolutos dos isolados de Hib que, entretanto, representaram por 20% (33/165). Todos estes pacientes não receberam o esquema completo de vacinação, mas apenas uma dose. Isso pode explicar a redução acentuada de notificações (>80%), porém ainda a presença da infecção pelo Hib.



Observamos também que nesse período outros tipos de quadros infecciosos com localizações mais raras envolvendo o trato respiratório alto aparecem em crianças vacinadas; e ainda tendo o tipo sorológico b como principal agente infeccioso, que antes da vacinação era raro nesses processos patogênicos. Por outro lado, há uma diminuição drástica das formas classicamente chamadas de invasivas, o que está demonstrado no Manuscrito 1. Na tabela 1 desse manuscrito, vemos que nos anos de 2001 a 2003, 22 dos 25 isolados foram de líquor (meningite por Hib) e 3 casos em hemocultura (associados a septicemia) sendo 1 do sorotipo a, 1 do sorotipo c e 1 do sorotipo d. Os isolados no ano de 2000 não participaram deste manuscrito por terem apresentado problemas de contaminação (a conseqüente purificação permitiu sua utilização no Manuscrito 2).

Nossos resultados no Manuscrito 1 demonstram que a detecção dos outros sorotipos, que raramente apareciam em processos infecciosos antes da vacinação, como os outros tipos sorológicos não b, começam a aparecer mais freqüentemente a partir do ano de 2002. As amostras coletadas nesse ano mostram a presença de, praticamente, todos os sorotipos sorológicos, inclusive os não tipáveis (NT). Devemos ressaltar que os sorotipos a e c já faziam parte dos nossos isolados clínicos. Porém, por problemas de baixa viabilidade, a cepa de Hi sorotipo c, excepcionalmente, só participou nos Manuscritos 2 e 3. Deste modo a tabela 1 do Manuscrito 1 demonstra claramente a mudança quanto a quase totalidade de Hib nos isolados clínicos no período pré-vacinação, para os sorotipos não b após. A relação entre os sorotipos de Hi não b e o Hib era de 2/165 (1,2%) passando para 29/33 (88%) no período de pós-vacinação.

A presença nos nossos isolados dos sorotipos a e c, nas duas fases da vacinação merece comentários. Os estudos de grupos brasileiros (RIBEIRO et al., 2003 e SIMÕES et al., 2004) com o isolamento do sorotipo a mostram que houve alteração de sorotipos, que raramente eram encontrados no Brasil, em áreas como a região Nordeste (Bahia) e Centro-Oeste (Goiás). Este panorama também foi demonstrado após o uso da vacina conjugada contra o Hib, em países como Coréia e Argentina segundo Kwak et al. (2000) e Gatti et al. (2004), respectivamente.

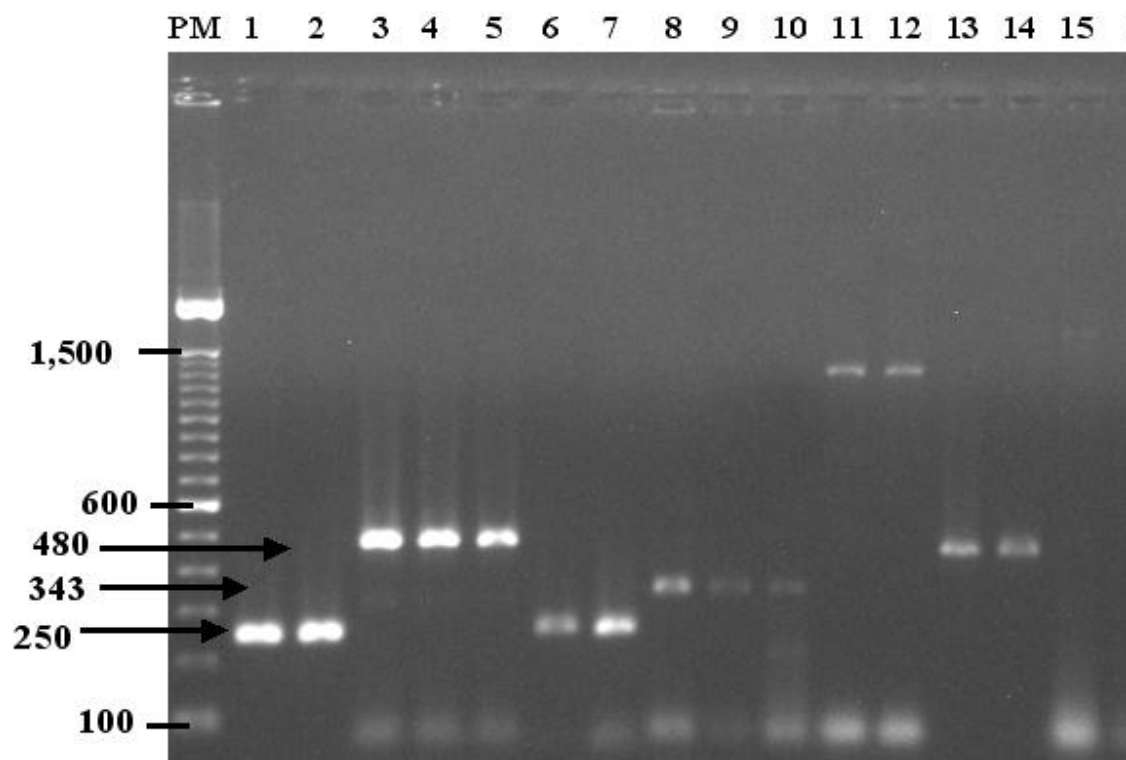
Outros isolados que nos levam a refletir correspondem aos tipos sorológicos d, e e f de casos clínicos como sinusite e secreção brônquica (Manuscritos 1 e 2). Waggoner-Fountain et al. (1995), Campos et al. (2003), Cerquetti et al. (2003) e Bruun et al. (2004) relataram casos de infecções invasivas como meningites e raras pneumonias, pelos tipos e e f, na Europa e EUA no período pós-vacinação.

O tipo d está também presente nos isolados desse nosso estudo. Relatos como de Dabernat et al.(2004) com estudo de 752 Hi coletados na França em 2001, mostram que 311 (41,3%) desses foram de secreção brônquica, onde estavam presentes os tipos sorológicos b, d, e e f. Na Argentina, no período de 1996-2002, Gatti et al. (2004) mostraram que, de 146 crianças estudadas com processos infecciosos sugestivos de Hi, 112 (77%) foram do tipo b e 33 (23%) de Hi não b (1c, 1d, 4e, 3f e 24 NT). Isso nos leva a ter mais atenção nesses sorotipos de Hi como potenciais agentes de casos graves, inclusive por serem capsulados, portanto facilmente invasivos. A tabela 2 mostra os primers ou iniciadores descritos por Falla et al.(1994) utilizados para a tipagem molecular dos Hi estudados em nossa tese; e na figura 6, a foto da eletroforese em gel 1 % (1xTBE) com o produto da reação da PCR com esses isolados.

Tabela 2- Iniciadores (primers) para as regiões cápsula - específico e tipo – específico do genoma do *H. influenzae*.

Nome dos iniciadores	Iniciadores (5'to 3')	Tipo capsular
a1	CTACTCATTGCAGCATTTGC	a
a2	GAATATGACCTGATCTTCTG	
b1	GCGAAAGTGAACCTTTATCTCTC	b
b2	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA	
c1	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	c
c2	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA	
d1	TGATGACCGATAACAACCTGT	d
d2	TCCACTCTTCAAACCATTCT	
e1	GGTAACGAATGTAGTGGTAG	e
e2	GCTTTACTGTATAAGTCTAG	
f1	GCTACTATCAAGTCCAAATC	f
f2	CGCAATTATGGAAGAAAGCT	
HI-1	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	a - f
HI-2	TGTCCATGTCTTCAAATGATG	

Fonte: Falla et al. (1994)



**FIGURA 6** - Eletroforese em gel de agarose a 1% (1X TBE) com produto da reação da PCR. As cepas de Hi sorotipo d só tiveram reações reveladas para o componente capsular com os HI-2 (linhas 8-10). Para os demais sorotipos houve também amplificações com os iniciadores respectivamente (linhas 1-7 e 11-16). Linhas 1 e 2 (cepa ATCC 9006 e cepa clínica P2628; soro ATCC 10211, cepas clínicas; P2527 sorotipos b e P2520 mutante b); linhas 6 e 7 (cepa ATCC sorotipos c); linhas 8-10 (cepa ATCC 9008 e cepas clínicas P2511 e P2662, sorotipos d); linha 11 e cepa clínica P2499, sorotipos e); linhas 13 e 14 (cepa ATCC 9833 e cepa clínica P2481, (cepa ATCC 49247 e cepa clínica P2619, não tipáveis - NT), linha 17 (controle negativo). P 100bp (à esquerda) e 1Kb plus (à direita).

É importante mencionar que obtivemos quatro isolados de material clínico de Hi que pela Sorologia de Aglutinação em Lâmina (SAL), realizada paralelamente com a referência ATCC 9008 (Hid), foram caracterizados como sorotipo d. Porém, ao serem submetidos a reação da PCR com os iniciadores descritos por Falla et al.(1994) para confirmação do componente capsular e do tipo-específico, só foram obtidas reações com os iniciadores (HI-1 e HI-2), isto é, para o componente capsular; não houve, portanto, amplificação com os iniciadores, descritos pelos autores para o componente tipo-específico. A seqüência dos iniciadores utilizados foi então submetida ao banco de seqüências gênicas (GenBank), para confirmação da especificidade para o sorotipo d. A única seqüência depositada com 100% de homologia usando os iniciadores descritos nesse projeto, foi a seqüência de 150 bp (pares de base) depositadas pelos autores, que corresponde ao fragmento de DNA, o qual se esperava amplificar após a reação da PCR utilizando os iniciadores em questão. Infelizmente não existe no GenBank nenhuma outra seqüência de Hi do sorotipo d, para que pudéssemos confirmar a especificidade dos iniciadores utilizados. Toma-se necessário ser descrito um par de iniciadores específicos para a amplificação da região do *cap* responsável pela identificação do componente tipo-específico do Hid incluindo a própria cepa de referência ATCC 9008.

Outros estudos (HARGREAVES et al., 1996; SHARMA et al., 2002; STEINHOFF & GOLDBLATT 2003) mostram o retorno do Hib em diferentes países onde já se haviam iniciado estratégias vacinais com seus respectivos programas de vacinação. Estas observações devem servir de alerta para o Ministério da Saúde e o PNI visto que ainda encontramos entre as cepas estudadas, o sorotipo b em processos infecciosos. Os resultados obtidos com o trabalho da caracterização molecular (Manuscrito 3) revelaram que as cepas NT, classificadas inicialmente pelo método tradicional (da SAL), ao serem tipadas pelo método molecular, através da reação da PCR descrito por Falla et al. (1994), mostraram que dessas 15 cepas NT isoladas, ao serem caracterizadas pela PCR, 7 (47%) pertenciam aos sorotipos a (1), b (4) e b<sup>-</sup> (2).

Esta diferença encontrada em relação às cepas consideradas NT pelo SAL não invalida este método tradicional, mas deve servir como um alerta para que se tenha um controle maior da qualidade nas diversas fases do ensaio, incluindo os reagentes envolvidos. Se todas as fases do processo fossem realizadas dentro das exigências mínimas necessárias, certamente

dariam resultados mais confiáveis (CDC 2002 a, b). Assim, em países com laboratórios de saúde pública apresentando diferentes níveis de complexidade quanto as metodologias de diagnóstico empregadas na rotina, deve-se buscar uniformizar a qualidade em relação às técnicas básicas, e neste caso incluindo a SAL, através de investimento maciço em treinamento de pessoal.

A técnica da PCR fornece resultados seguros (CDC 2002 a,b; LA CLAIRE et al., 2003), porém exige reagentes caros, com características especiais de conservação e manuseio, muitos deles com prazos de validade curtos. Entretanto, estas cepas classificadas em nosso trabalho (Manuscrito1) inicialmente pela SAL como NT, foram identificadas pela PCR como sorotipos a, b e b<sup>-</sup> ( Manuscrito 3), o que nos leva a pensar na possibilidade de diagnósticos duvidosos e, conseqüentemente, em falhas na determinação da situação epidemiológica nacional atual. Assim, o ideal seria investir também na metodologia da PCR, pelo menos nos LACEN regionais, para torná-los auto-suficientes, propiciando rapidez e confiabilidade nos diagnósticos realizados.

Na época de pós-vacinação das vacinas conjugadas contra o Hib, a vigilância cuidadosa dos sorotipos de Hi, que causam doenças invasivas, é essencial para: a) avaliar a eficácia da vacinação na população em geral e detectar possíveis casos de falha vacinal; b) detectar possível mudança epidemiológica com substituição nas infecções invasivas por outros tipos capsulares, distintos do b, bem como das cepas não capsuladas. Sabe-se que crianças com esquema de vacinação completa podem apresentar enfermidades do tipo invasivas, incluindo meningite por Hib ou Hi não b. Esta situação pode ou não sugerir uma falha vacinal, e estar até associada a uma cepa capsulada distinta do b (sobretudo de a, e ou f) ou a cepas não capsuladas (NITTA et al,1996; URWIN et al., 1996). Daí a necessidade de cuidadoso estudo laboratorial no caso de isolamento de Hi, envolvendo a identificação da cepa por laboratório de referência com reconhecida competência específica.

Por outro lado, deve-se proceder a continuidade dos estudos com o uso das vacinas combinadas, como em nosso país, pelo PNI / MS, com as vacinas DTP+Hib. Clemens et al. (2003) realizaram estudos em 108 crianças brasileiras utilizando as vacinas produzidas pelos Institutos Butantan (S.Paulo) e Bio-Manguinhos (Fiocruz - Rio de Janeiro). Resultados favoráveis e promissores foram demonstrados. Sabe-se, porém, que em certos países da Europa, como a Holanda, houve administração simultânea da vacina conjugada

contra a *N. meningitidis* C, o que levou ao aumento dos casos da falha vacinal (RIJKERS et al., 2003), bem como no Reino Unido, onde a combinação com a vacina pertussis acelular pode ter comprometido o sistema imunitário das crianças vacinadas (MCVERNON et al., 2003). Portanto, nesta fase em que se avalia a eficácia da vacina conjugada contra Hib, com a consequente queda do tipo b, é fundamental que a determinação dos tipos sorológicos pós-vacinação de massa sejam monitorados e forneçam resultados seguros e confiáveis para avaliar os procedimentos atuais e nortear os próximos.

Nos nossos isolados (Manuscrito 3) o aparecimento de duas cepas mutantes (b<sup>-</sup>) originárias de material clínico (uma de secreção brônquica e outra de escarro), do período pós-vacinal, mostraram que não se deve desprezar isolados de infecções não invasivas.

Nos estudos recentes, La Claire et al. (2003) e Luong et al. (2004) embora não tenham encontrado cepas mutantes b<sup>-</sup>, incentivam a necessidade de pesquisas desta forma do sorotipo b. Estudos de Falla et al. (1994), Mühlemann et al. (1996) e Smith-Vaughan et al. (1998) sugerem a possibilidade de haver reversão nas cepas de Hi não capsuladas, mutantes de b<sup>-</sup>, para a forma capsulada, causando assim novos surtos por Hi invasivos, daí a necessidade do monitoramento da presença dos Hi em berçários, creches e outros ambientes coletivos infantis.

A questão do papel do portador em relação a cepas identificáveis nestes indivíduos assintomáticos deve ser tratada mais detidamente, pois implica muitas lacunas do conhecimento, mas não foi objeto da presente pesquisa (VILLASEÑOR-SIERRA et al., 1996; RAPOLA et al., 1997; BRICKS et al., 2004). Em muitos países que já têm incorporado nos programas de imunizações a vacinação contra o Hib, tiveram seu quadro epidemiológico alterado, com a diminuição dos casos clínicos pelo Hib, e levando inclusive a que taxas de colonização de nasofaringe diminuíssem mesmo nas crianças não vacinadas, protegendo parcialmente o portador, porém não eliminando o risco da infecção por este microrganismo (BOUSKELA et al., 2000; SANTOSHAN, M. 2000 BRICKS et al., 2004).

A biotipagem, utilizando métodos fenotípicos, constitui uma das ferramentas utilizadas para pesquisas epidemiológicas nos Hi conforme mostrado no Manuscrito 1. Os biotipos I e II são mais frequentes nas cepas de Hib, muitas vezes produzindo quadros graves (SHARMA et al., 2002; ZANELLA et al., 2002). Em nosso estudo observamos que, justamente no período 1990-1999 onde foram dominantes os casos de meningite,

prevaleceram estes dois biotipos: I e II. No período pós-vacinal, estes biotipos ainda predominam, mas percentualmente os outros biotipos identificados estão em ligeira elevação, merecendo um estudo com maior número de isolados clínicos. Moustououi et al. (2000) mostraram que se pode associar certos biotipos com o sítio da infecção. Em concordância, Zanella et al. (2002), utilizando cepas brasileiras, mostraram o aumento para 16,7% dos outros biotipos diferentes dos I e II em isolados de hemocultura, enquanto nos anos anteriores, à vacinação foi de somente 8,8%.

Visando analisar a evolução de padrões de sensibilidade aos antimicrobianos mais frequentemente usados nas infecções por *H. influenzae* (Manuscrito 2), avaliamos 174 cepas de Hi, sendo que 98 da fase pré e 76 da fase pós-vacinação. Uma adequada identificação do agente etiológico é fundamental, bem como a terapia específica para cada caso. O uso dos antibióticos deve ser cuidadoso, com base no monitoramento por antibiograma, evitando-se não só a resistência entre isolados clínicos, problema real e crescente em todo mundo (DOERN et al., 1986; ANDRADE et al., 2001), mas garantindo um melhor prognóstico. Porém, lamentavelmente, na prática clínica, mesmo diante de suspeita de meningite bacteriana, muitas vezes não se realiza a punção lombar por diversas razões, inclusive pela falta de preparo do clínico ou de acesso deste a exame laboratorial, como já considerado. E assim, boa parte da população incluindo crianças, não tem acesso às facilidades tecnológicas que a medicina oferece para um diagnóstico rápido e seguro (DOMINGUEZ & DAUM, 2003; RUSSEL et al., 2003). Também, de regra, mesmo com condições de punção e diagnóstico laboratorial, impõe-se a indicação imediata de antibioticoterapia pós-punção. Daí a necessidade do monitoramento permanente de padrões regionais /locais de resistência antimicrobiana para uma adequada orientação antecedendo os resultados de laboratório.

Um recente aumento da resistência aos antimicrobianos envolvidos nas infecções do trato respiratório (ITR) onde os agentes infecciosos são frequentemente *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, sobretudo nos de administração oral, mostra a necessidade de uma reavaliação no emprego dos mesmos. Esta observação ficou claramente confirmada após o emprego da vacina conjugada contra o Hib, com o aumento de infecções pelos sorotipos não b, incluindo os não tipáveis (NT), estes classicamente responsáveis pelas ITR (Manuscritos 1 e 2).

Quando avaliamos os padrões de resposta aos antimicrobianos comparando os anos de 1990-1999 e 2000-2003 (Manuscrito 2), observamos a mudança de resistência da associação sulfametoxazol-trimetoprim (SMX-TMP) de 32,6% para 65,8% dos isolados.

O trabalho de Andrade et al. (2001) cita que a OMS e os Ministérios da Saúde de países da América Latina ainda recomendam o SMX-TMP, como droga de primeira linha pelo baixo custo e fácil dosagem, o que favorece o tratamento empírico da maioria das ITR, incluindo pneumonia. No período de 2000-2003 nossos resultados mostraram também a presença dos *H. influenzae* não b causando infecções como bronquites, otites, sinusites e outras. A recente publicação de Hammitt et al. (2005) mostrou que, tradicionalmente, o Hi não b raramente é causador de infecções invasivas. Porém, este cenário sem dúvida sofreu alteração no Brasil. Nossos resultados demonstraram o incremento, com tendência crescente, dos outros tipos sorológicos, embora ainda a presença do tipo b seja predominante. Contudo, a incidência de 45% dos tipos a, b, d e NT é destacada nos isolados de secreções brônquicas, cabendo às amostras dos casos do estado do Rio de Janeiro a taxa de 19%. Andrade et al. (2001) enriqueceram os estudos feitos com SMX-TMP através de pesquisas com pacientes com infecção por HIV que fizeram uso rotineiro da associação SMX-TMP nessa endemia, o que pode ter potencialmente contribuído para a elevação no índice da resistência das cepas de Hi isoladas nas infecções respiratórias.

Outra observação que merece destaque (Manuscrito 2), tabela 1, é o número de isolados clínicos de Hib no período de 2000 – 2003. Apesar de estarem em queda acentuada, pelo início da vacinação em 1999, ainda aparecem 25 casos de meningites e 2 septicemias nas três regiões estudadas. Em 2003, houve dois isolados de meningite por Hi não b (1a e 1c), totalizando, portanto, 29 casos de isolados clínicos de Hi, no período pós-vacinação de sítios orgânicos chamados estéreis.

Pernambuco foi o estado que teve maior número de isolados clínicos de casos graves. Em 2002 obtivemos somente dois isolados do tipo b, um de hemocultura, de paciente com septicemia, e outro de cultura de LCR com meningite. Porém, em 2003 ocorreu alteração no quadro com o aumento de isolados de cepas de Hi (17 amostras), só recebidas no início de 2004. Portanto, do período de pós-vacinação obtivemos da região nordeste (Pernambuco) o total de 19 isolados de Hi sendo que 14 do tipo b: 10 de meningite, 1 de hemocultura com septicemia e 3 de área chamada não-estéril (secreção brônquica). Quanto aos Hi não b



foram 5: 1 de meningite, do tipo a, e 4 de áreas não estéreis sendo esses 1 de sinusite do tipo d e 3 de secreção brônquica, não tipável (NT).

Em relação à ampicilina, ainda é uma droga amplamente utilizada em muitos países, inclusive no nosso, como de escolha para tratamento das infecções por Hib e outros Hi (Guia de Vigilância Epidemiológica-FUNASA, 2002). Em 1980 foi documentada o aparecimento de cepas resistentes a este antibiótico (RUBIN et al., 1981). No presente estudo, verificamos taxas elevadas de resistência como as encontradas por Reis et al. (2002), em Salvador-Bahia. Estes autores estudaram 150 pacientes e encontraram a resistência presente em 10 cepas (6,7%) dos Hi estudados. Nossos isolados clínicos revelaram no período pré-vacinação um percentual de 17,3% das quais em 90% com a CIM de 32µg/ml. As cepas coletadas após 1999, portanto pós-vacinação, mostraram uma ligeira diminuição da resistência (15,8%), porém com a CIM de 8µg/ml em 90%, ainda considerado elevado. A presença de isolados com  $\beta$  - lactamase positiva confirma estas observações. Podemos supor que tal fato deveu-se a critérios mais rigorosos na utilização deste antimicrobiano, bem como o início da vacinação com a vacina conjugada contra o Hib mostrando também, assim, a queda das infecções pelo *H. influenzae* b. Entretanto, nos isolados clínicos de Pernambuco, nesse período, houve uma pequena elevação das cepas produtoras da enzima  $\beta$  - lactamase, conforme mostra a tabela 2 desse manuscrito.

Ainda o Manuscrito 2 mostra que o cloranfenicol atingiu valores elevados de resistência (CIM >16 µg/ml). Observamos também que 8 isolados clínicos de meningite, originários de Pernambuco, revelaram resistência simultânea a ampicilina e cloranfenicol com a CIM >64 µg/mL e >16 µg/mL, respectivamente, como descrito anteriormente (CASAGRANDE et al., 2002; ZANELLA et al., 2002). É provável que exista um mecanismo de resistência comum nessas cepas. Esta investigação constituirá um dos desdobramentos desse projeto. Como a maioria dessas cepas foi de isolados clínicos de meningites esse fato é preocupante por ser o cloranfenicol uma das drogas de escolha ainda muito utilizada. Torna-se, portanto, urgente o monitoramento das cepas resistentes a este antibiótico para verificar se está ocorrendo um processo de seleção de cepas resistentes (DOERN et al., 1988; DUKE et al., 2003; CERQUETTI et al., 2004).

No Brasil, como em outras partes do mundo, nos últimos anos, o aumento dos casos de tuberculose tem contribuído para o aumento do uso da rifampicina como droga profilática

conforme descrito no Guia de Vigilância epidemiológica / FUNASA, 2002. Os resultados apresentados no Manuscrito 2, mostram que este fato pode ter contribuído para o crescimento da resistência nas cepas isoladas do período (1990-2003). Os isolados clínicos de Hi estudados das três regiões brasileiras, revelaram um CIM com valores  $>8\mu\text{g/ml}$ , indicando assim a necessidade de contínua vigilância, visto ser uma das opções de tratamento para a tuberculose e prevenção de meningite por *H. influenzae*.

Das 174 cepas de Hi estudadas todas foram sensíveis à amoxicilina-ácido clavulânico e à ceftriaxona. Concluimos, portanto, que dos antimicrobianos testados estes podem ser uma boa opção para o tratamento dos pacientes suspeitos de infecções pelo Hi.

Medidas profiláticas como a vacina conjugada contra o Hib tem sido altamente efetiva, porém o Hi sorotipo b não foi totalmente eliminado e ainda não existem vacinas específicas contra os outros tipos sorológicos e os NT. Muitos pesquisadores consideram urgente o desenvolvimento de vacinas para prevenir as diversas patogenias que hoje são associadas aos *H. influenzae* não b (HOU & GU, 2002; CODY et al., 2003). Caso recente foi relatado no Chile, onde há um sistema de saúde pública modelo, por Vega-Briceño et al.(2005), de pneumonia com o HiNT, em lactente de 16 meses e esquema de vacinação completo com a vacina conjugada contra o Hib. Os autores sugerem fortemente o investimento em vacinas para os outros tipos de Hi incluindo os HiNT. Este fato também intensifica o uso da tipagem pela PCR, sobretudo para os NT como já mencionado neste trabalho. Desta forma, enquanto não dispomos destes imunopreveníveis é de fundamental importância a vigilância epidemiológica, a estudos sobre portadores e, sobretudo, rever a indicação da antibioticoterapia atualmente preconizada no Brasil contra essas infecções. Portanto, a orientação de clínicos quanto a possibilidade da etiologia por Hi associada a variadas formas clínicas, inclusive em vacinados contra o Hib, é relevante para desenvolver o monitoramento laboratorial, e conseqüentemente, epidemiológico.

Na continuidade dos nossos objetivos propostos, a caracterização molecular e fenotípica das cepas estudadas originou o Manuscrito 3. A caracterização fenotípica foi amplamente discutida quando se abordou o Manuscrito 1, bem como suas vantagens e desvantagens frente ao método de tipagem capsular utilizado por Falla et al. (1994). Este é considerado um clássico e dele originaram-se várias linhas que forneceram métodos para avaliar as variações do genoma do *H. influenzae*. Alguns estudos descreveram a existência

de seqüências genômicas repetidas em diversas bactérias e passaram a utilizar estas seqüências para determinar a relação genética entre diferentes cepas da mesma espécie. A técnica chamada de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-PCR tem sido utilizada para tipagem molecular de muitos patógenos conforme estudos anteriores (VERSALOVIC, KOEUTH. & LUPSKI, 1991; DE BRUIJIN et al., 1992; VERSALOVIC et al., 1994). A figura 7 mostra o modelo simplificado do funcionamento da técnica de ERIC-PCR em parte do genoma do *H. influenzae*.

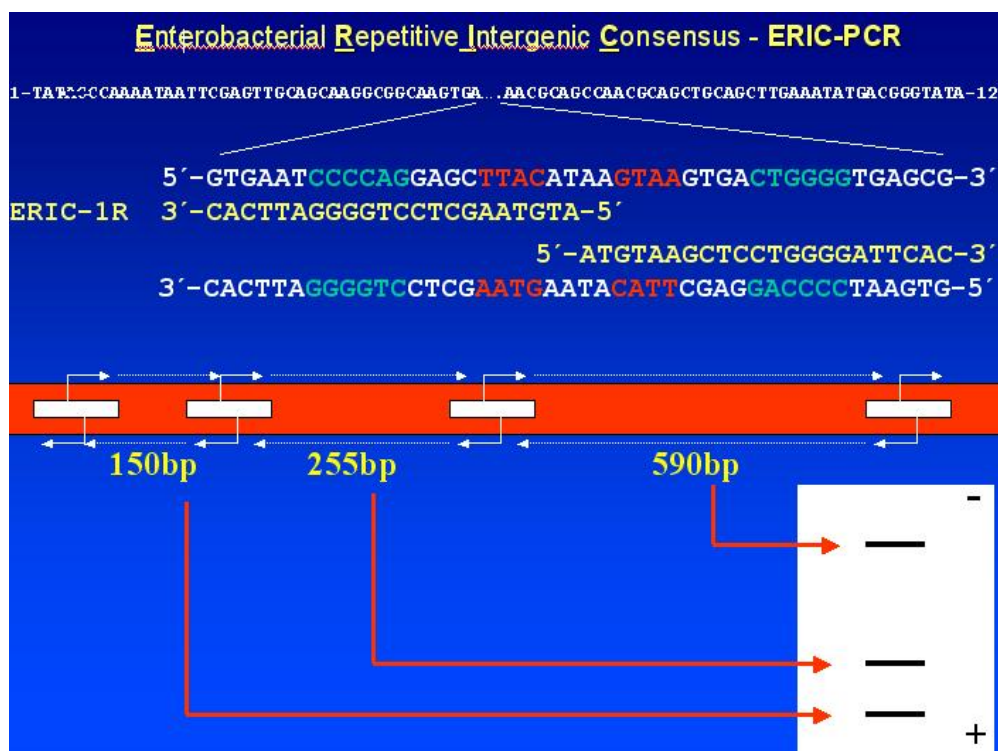


FIGURA 7- Modelo simplificado do funcionamento da técnica de ERIC - PCR em parte do genoma do *H. influenzae*.

Dando seguimento a esta linha observou-se que estes elementos se repetem de modo randômico ao longo do genoma bacteriano em intervalos semelhantes entre cepas geneticamente relacionadas. Esses elementos de repetição foram encontrados no genoma de outros microrganismos, além das enterobactérias, como o *H. influenzae* (HULTON, HIGGINS & SHARP, 1991; HOOD et al., 1996; van BELKUM et al., 1994, 1998). Desta forma escolhemos usar o ERIC-PCR para determinar a diversidade genética das cepas isoladas de alguns estados brasileiros e em períodos diferentes de tempo: antes e após a introdução da vacina conjugada contra o Hib. Na figura 2 do Manuscrito 3, o dendrograma

apresentado mostra a maioria das cepas de Hi estudadas neste objetivo proposto. Existem representantes dos três estados brasileiros estudados e dos dois períodos (pré e pós-vacinação) e também dos diversos tipos sorológicos encontrados. Com 70% de similaridade, observamos quatro clones reunindo cepas com diferentes características epidemiológicas. Cada clone tem pelo menos duas cepas de diferentes sorotipos, uma cepa de HiNT e isolados dos dois períodos estudados. Esta análise também mostrou uma população bastante variável quanto às cepas do sorotipo b que estavam presentes nos quatro clones agrupados, fato este confirmado na figura 3 do Manuscrito 3, onde todas as cepas são do sorotipo b.

A análise das cepas não b mostra maior diversidade genética que as cepas do tipo b. Na figura 4 do Manuscrito 3, o ponto de corte em 70% de similaridade, revela sete diferentes genótipos com 17 cepas analisadas. Ao analisarmos as cepas dos diferentes estados com o mesmo ponto de corte, observamos que Pernambuco foi o estado com a mais alta diversidade genética (15 cepas e 6 clones). O estado de Santa Catarina por sua vez, revelou apenas 2 clones em 13 cepas estudadas, enquanto os isolados do estado do Rio de Janeiro geraram 3 clones nas 23 cepas estudadas. Quando analisamos somente cepas Hi não tipáveis, a diversidade genética foi maior que a encontrada com as cepas de Hi não b (incluindo sorotipos a, c, d e NT) com menor evidência de clonalidade. Essa análise revelou que das 6 cepas de HiNT, isoladas no período pós-vacinal no estado do Rio de Janeiro, o ponto de corte de 70% mostrou 5 diferentes genótipos (figura 5 do Manuscrito 3).

Embora a estrutura populacional dos Hi tenha sido inicialmente descrita como clonal (MUSSER et al., 1988), nossos resultados estão em concordância com trabalhos mais recentes onde a diversidade genética encontrada entre isolados de Hi é bem mais alta (GÓMEZ-DE-LEON et al., 2000; PETTIGREW et al., 2002; FARJO et al., 2004; SACCHI et al., 2005). Os dados apresentados mostram que a contínua ocorrência de isolados dos sorotipos não b, geneticamente relacionados com cepas Hib, é um fator importante que deve ser monitorado para detectar um possível aumento de casos, devido à reversão de sorotipos. É importante observar a grande diversidade genética encontrada entre as cepas não tipáveis, o que pode ser um fato importante, pois levaria esses isolados a apresentarem a capacidade de expressar a cápsula polissacarídica, responsável pelo mais importante fator de virulência do Hib. Outra importante questão, já mencionada anteriormente, é que, após a sorotipagem pela PCR, a presença de cepas mutantes b<sup>-</sup> isoladas de pacientes com doenças não invasivas,

quando sorotipadas pelo método da SAL, resulta em cepas HiNT (figura 1 do Manuscrito 3). Dessa forma, cepas mutantes cápsula-deficiente podem rapidamente reverter para a forma Hi capsulada, por pressões imunológicas do organismo, levando ao aparecimento da doença invasiva. Queremos mais uma vez, ressaltar a grande sensibilidade e especificidade da sorotipagem pela PCR que certamente contribuirá para monitorar as possíveis alterações na prevalência os sorotipos de *H. influenzae*, bem como a real estimativa do impacto da vacina contra o Hib no Brasil.

## 5. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

### 5.1- CONCLUSÕES

No presente estudo podemos concluir que:

- As cepas estudadas do *Haemophilus influenzae* (período pré-vacinal) sustentam os dados epidemiológicos da literatura mundial do predomínio do sorotipo b (97%). O aparecimento de outros sorotipos (a e c) em meningites, neste período é considerado raro.
- Ocorreu uma seleção de cepas resistentes a antimicrobianos classicamente empregados contra o Hi, após o emprego da vacina conjugada contra o Hib nas amostras estudadas.
- Os isolados  $\beta$ -lactamase positiva das cepas Hib foram mais frequentes na fase de pré-vacinação. No período pós-vacinação, houve uma diminuição, porém a CIM em 90% das culturas ainda revelou-se elevada ao nível de 8 $\mu$ g/mL.
- Os resultados obtidos indicam que os antibióticos de escolha devem ser, preferencialmente, ceftriaxone e amoxicilina-ácido clavulânico, por terem apresentado 100% de sensibilidade.
- No dendrograma das cepas originadas dos três estados brasileiros estudados, Pernambuco, Rio de Janeiro e Santa Catarina, encontram-se 4 clones reunindo cepas com diferentes características epidemiológicas.

- As cepas do sorotipo b dos períodos pré e pós-vacinação mostraram uma população bastante variável e estão presentes nos 4 clones agrupados.
- As cepas não b apresentaram maior diversidade genética do que as do tipo b.
- O estado de Pernambuco teve a mais alta diversidade genética com 6 clones em 15 cepas, enquanto o de Santa Catarina revelou apenas 2 clones em 13 cepas estudadas e o estado do Rio de Janeiro apresentou 3 clones em 23 cepas estudadas.
- Na análise das cepas *H. influenzae* não tipável (HiNT) a diversidade genética foi maior que a encontrada no *H. influenzae* não b (Hib).
- Existe uma contínua ocorrência dos isolados não b geneticamente relacionados aos isolados de Hib, o que deve ser monitorado quanto a possibilidade de reversão dos sorotipos hoje encontrados ( não b para Hib).

## 5.2 -PERSPECTIVAS

- Devido à grande diversidade genética de HiNT encontrada nas cepas desse estudo, acreditamos que o mesmo deva ser ampliado, pois estes isolados podem apresentar cepas mutantes b<sup>-</sup> expressando-se mais tarde com o principal fator de virulência: a cápsula polissacarídica (NT<sup>-</sup>→ b<sup>-</sup>→ b<sup>+</sup>).
- No âmbito da Vigilância em Saúde, consideramos relevante a promoção de estudos amostrais de prováveis casos clínicos de Hi procedentes de todas as regiões do Brasil, para se definir a real situação epidemiológica do país, sua diversidade, e medidas de intervenção.
- Visando contribuir para o conhecimento da situação de portador de Hi em crianças vacinadas com a vacina combinada (Hib+DTP) utilizada desde 2002, consideramos de interesse o estudo de portadores em populações fechadas como de creches.
- Realização de estudos em neonatos, inclusive prematuros e em crianças vacinadas, para pesquisa da incidência dos HiNT (Hib<sup>-</sup>) diante da suspeita clínica de pneumonia e outras infecções respiratórias.

- Considerando os resultados obtidos neste estudo quanto a susceptibilidade do Hi aos antimicrobianos, está indicada sua avaliação incluindo outros antibióticos como quinolonas e novas cefalosporinas, visando o monitoramento no país.
- Fomento a projetos integrados aos LACENS de capacitação do SUS para isolamento e identificação de Hi abordando o uso de técnicas fenotípicas e moleculares para transferência dessas metodologias e sua aplicação à rotina, visando a promover a qualidade da vigilância das infecções por Hi com monitoramento das cepas.
- Dar continuidade ao presente estudo abrangendo todas as regiões brasileiras, visando a estabelecer correlações entre a distribuição geográfica e aspectos clínicos da infecção, incluindo forma clínica, resposta terapêutica, letalidade e história vacinal dos pacientes, com cepas isoladas e clones identificados por métodos moleculares utilizados para tipagem e monitoramento como PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis / Eletroforese em Campo Pulsado) e MLST (Multilocus Sequence Typing / Análise Multilocus de Sequências).

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. G. et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *Journal of American Medicine Association*, v. 269, n. 2, p. 221-226, 1993.

ADDERSON, E. E. et al. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *H. influenzae* type b: Emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics*, v.108 ,n.1, p.1-6, 2001.

AMATO NETO, V.; BALDY, J. L. S. ; SILVA, L. J. Imunização contra a infecção por *Haemophilus influenzae* do tipo b. In: *Imunizações*, 3.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. p 153-156.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Infectious Disease-*Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine. *Pediatrics*, v.76, p.322, 1985.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Infectious Diseases: Treatment of bacterial meningitis. *Pediatrics*, 81(6): 904-907, 1988.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Infectious Disease-*Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: update. *Pediatrics*, v.84, n.2, p.386-387, 1989.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Provisional Committee on International Child Health. Statement of principle. *Pediatrics*, v.85, n.2, p.226-227, 1990.

ANDERSON, P. et al. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b. *The Journal of Clinical Investigation*, v.51, p.39-44, 1972.



ANDERSON, P. W.; STEIN, E. C.; INSEL, R. A. Background and indications for *Haemophilus influenzae* type b vaccines consisting of capsular antigen coupled to protein carriers. In: CRUSE, J. M.; LEWIS, R. E. Jr. (eds). Contributions to Microbiology and Immunology, v. 10, p.115-124, 1989.

ANDRADE, A. L. S. S. et al. *Haemophilus influenzae* resistance in Latin America: systematic review of surveillance data. Microbial Drug of Resistance, v. 7, n.4, p.403-413, 2001.

ANFARMAG - Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais - Departamento de Infectologia da Sociedade Brasileira de Pediatria. Calendário vacinal. Disponível em : < <http://www.anfarmag.com.br/documentos/>>

Acesso em: 20 set. 2005.

ANIANSOON, G., et al. Nasopharyngeal colonization during the first year of life. The Journal of Infectious Diseases, v.165, suppl.1, p.S38-42, 1992.

AVERY, O. T.; GOEBEL, W. F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins II. Immunological specificity of synthetic sugarproteins. Journal of Experimental Medicine, v.50, p.521,1929.

BARQUET, N. et al. Hib - Euro Sud' 95: the South Exists. Vaccine, v.14, n.17. p.1569-1572, 1996.

BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista – Meningites na Regional de Saúde de Piracicaba- 1992 a 2001: Impacto da Introdução da Vacina contra o *Haemophilus influenzae* tipo b, n.5, 2004.

Disponível em:<[http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa5\\_pira.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa5_pira.htm)>

Acesso em: 03 dez. 2004.

BIJLMER, H.A. World-wide epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis: industrialized versus non-industrialized countries. *Vaccine*, Suppl: S5-9; discussion S25, 1991.

BOKERMANN, S. et al. Evaluation of methodology for serotypes invasive and nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* in the ongoing surveillance in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.12, p.5546-5550, 2003.

BOUSKELA, M. A. L. et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5 ed. New York: Lippincott-Raven, 1997. Cap. 7, p.373-396.

BOUSKELA, M. A. L.; GRISI, S.; ESCOBAR, A.M.U.- Aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v.7, n.5, p.332-339, 2000.

BRICKS, L.F. et al. Oropharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in healthy children from Taubaté (São Paulo), prior to the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program in Brazil. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v.59, n.5, p.236-243, 2004.

BROADHURST, L. E.; ERICKSON, R.L.; KELLEY, P. W. Decreases in invasive *Haemophilus influenzae* disease in US Army children, 1984 through 1991. *Journal of American Medicine Association*, v.269, n.2, p.227-230, 1993.

BRUUN, B et al. Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States. *Journal of Medical Microbiology*, v.53, p.1161-1165, 2004.

CAMPOS, J M. *Haemophilus*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999. Cap.39, p. 604-613.

CAMPOS, J. et al. Antibiotic resistance and clinical significance of *Haemophilus influenzae* type f. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.52, p.961-966, 2003.

CAMPOS MARQUÉS, J.; ARACIL GARCIA, B. Regreso de la infección por *Haemophilus influenzae* b? *Anales de Pediatría*, v.59, n.5, p.425-428, 2003.

CAPACITAÇÃO DE PESSOAL EM SALA DE VACINAÇÃO. In: MANUAL DO MONITOR. 2.ed. rev. ampl. Brasília: Ministério da Saúde. FUNASA, 2001. p. 223.

CASAGRANDE, S.T. et al. Antimicrobial resistance among invasive *Haemophilus* strains: results of a Brazilian study carried out from 1996 through 2000. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v.35, n.11, p. 1293-1300, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Polysaccharide vaccine for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.34, p.201, 1985.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. *Haemophilus influenzae* type b – Vaccination – Pink Book, Cap. 9, 2004. Disponível em:

<http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/hib.pdf>

Acesso em: 13 jul. 2005

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations of the immunization practices advisory committee (ACIP) - *Haemophilus* b conjugate vaccines for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children two months of age and older. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 40, n.1, 1991.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Progress towards elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children - United States, 1998 - 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.51, p.234-237, 2002, a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Serotyping discrepancies in *Haemophilus influenzae* type b disease - United States, 1998 -1999. Morbidity and Mortality Weekly Report, v.51, n.32, p.706-707, 2002, b.

CERQUETTI, M. et al. Presence of multiple copies of the capsulation b locus in invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) strains isolated from children with Hib conjugate vaccine failure. The Journal of Infectious Diseases, v.192, p. 819-823, 2003.

CLEMENS, S. C.; AZEVEDO, T.; HOMMA, A . Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw / Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.36, n.3, p. 321-330, 2003 .

CODY, A J. et al. High rates of recombination in otitis media isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae*. Infection, Genetics and Evolution v. 3, p.57-66, 2003.

CRISEL, R. M.; BAKER, R. S.; DORMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b. The Journal of Biological Chemistry, v. 250, n.13, p. 4926-4930, 1975.

CRITCHLEY I A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from five center in Brazil, 1997-98. Clinical Microbiology and Infection, v.6, p.178-184, 2000.

DABERNAT, H. et al. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* strains identified in 2001 in France, and assessment of their susceptibility to beta- lactams. Mèdecine and Maladies Infectieuses, v.34, n.2, p. 97-101, 2004.

DE ALMEIDA, A. E. C. C. de 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, n.5, p. 777-781, 2005.

DE ALMEIDA, A.E.C.C. de; MARZOCHI, K.B.F. Doenças por *Haemophilus*. In: LOPES, A. C., (Ed). Clínica Médica. São Paulo: Rocca, [s.d.]. No prelo.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterbacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacterial. Applied Environmental Microbiology, v 58, p.2180-2187, 1992.

DE FILIPPIS, I. *Neisseria meningitidis* no Brasil: implantação de novo método para diagnóstico molecular e caracterização genética por "Multilocus Sequence Typing – MLST". Rio de Janeiro: IOC / FIOCRUZ, 2005. 152p. Tese (Doutorado)-Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, 2005.

DOERN, G.V, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*: a collaborative study. Diagnostic Microbiologic Infectious Disease, v.4, n.2, p.95-107, 1986.

DOMINGUEZ, S.R ; DAUM, R.S. Toward global *Haemophilus influenzae* type b immunization. Clinical Infectious Disease, v.37, p.1600-1602, 2003.

DUKE, T. et al. Chloramphenicol or Ceftriaxone, or both, as treatment for meningitis in developing countries? Archives Disease Childhood, v.88, p.536-539, 2003.

ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. Development and Clinical uses of *Haemophilus b* Conjugate Vaccines. New York: Marcel Dekker, 1994.

FALLA, T. J. et al. Population - based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates Lancet, v.341, p.851-854, 1993.

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

FARJO, R. S. et al. Diversity and sharing of *Haemophilus influenzae* strains colonizing health children attending day-care centers. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v.23, p. 41-46, 2004.

FICKWEILER K. et al. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type f in an 8-year old girl with congenital humoral immunodeficiency. *Infection*, v.32, p.112-115, 2004.

FOXWELL, A R.; KYD, J. M. ; CRIPPS, A W. Nontypeable *Haemophilus influenzae* Pathogenesis and Prevention. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, n.2, p. 294-308.1998.

FREIRE, H. B. M. Infecções por *Haemophilus influenzae*. In: TONELLI, E. Doenças infecciosas na infância. São Paulo: Médica e Científica, 1987. v.1, cap 39, p.437-455.

FRIENSEN, C. A.; CHO, C.T. Characteristic features of neonatal sepsis due to *Haemophilus influenzae*. *Review Infectious Diseases*, v.8, n.5, p. 777-780, 1986.

FUNASA. Boletim Eletrônico Epidemiológico – 12/06/2003. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>

GARCIA, P. et al. Neonatal *Haemophilus influenzae* infection. Apropos of 4 cases. *Pediatric*, v.40, n.6, p. 451-459, 1985.

GATTI, B. M. et al. Isolation of *Haemophilus influenzae* serotypes from deep sites in sick children. *Revista Argentina del Microbiologia*, v.36, n.1, p.20-23, 2004.

GÓMEZ-DE-LEON, P. et al. Genmic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR – *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n. 7, p. 2504-2511, 2000.

GRANOFF, D. M. ; CATES, K.L. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. *The Journal of Pediatrics*, v. 107, n.3, p.330-336, 1985.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA . 5. ed. Brasília: FUNASA, 2002. v.2, p. 833.

HAMMITT, L.L. et al. Outbreak of invasive *Haemophilus influenzae* serotype a disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 24, n.5, p.453-456, 2005.

HARGREAVES, R. M. et al. Changing patterns of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales after introduction of the Hib vaccination programme. *British Medical Journal*,v.312, p. 160–161, 1996.

HARRISON, L. H.; BROOME, C. V.; HIGHTOWER, A.W. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine: an efficacy study. *Pediatrics*,v.84, n. 255, 1989.

HEATH, P. T. et al. Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatric Infectious Disease*, v.20, n.3, p. 300-305, 2001.

HEIDELBERGER, M. ; AVERY, O. T. The soluble specific substance of *pneumococcus*. *J. Journal of Experimental Medicine*, v.38, p. 73-79, 1923.

HERSHCKOWITZ et al. A cluster of early neonatal sepsis and pneumonia caused by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v.23, p.1061-1062, 2004.

HOOD, D. W. et al. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* v.93, p.11121-11125,1996.

HOU, Y; GU, X-X. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* as vaccine candidates. *The Journal of Immunology*, v.170, p.4373-4379, 2003.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC Sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, v.5, p. 525-834, 1991.

HVIID, A; MELBYE, M . Impact of routine vaccination with a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Vaccine*, v.22, p. 378-382, 2004.

IWARSON, S. World – wide strategies for immunization against invasive *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide – protein conjugates. *Vaccine*, v.11 ,Suppl. 1, p. S28-29, 1993.

JENNINGS, H. J. ; PON, R. A. Polysaccharides and glycoconjugates as human vaccines. In: *Polysaccharides in Medical Applications*, cap. 13, p.443-453, 1991.

JOKLIK, W. K.; WILLETT, H. P.; AMOS, D. B. *Haemophilus*. In: *Zinsser Microbiology*. 17. ed. New York: Appleton-Century-Crofts, 1980. Cap.30, p. 604-613.

JOKLIK, W.K. et al. *Haemophilus*. In: *Zinsser Microbiology*. 20.ed..California: Appleton, Lange, 1992.Cap. 27.

KILIAN, M.; BIBERSTEIN, E. L. In: *Haemophilus*. KRIEG, N. R., HOLT, J.G. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. London: Williams, Wilkins, 1984. v.1, p. 558-569.

KILIAN, M. A. Taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *Journal of General Microbiology*, v.93, p. 9-62, 1986.

KONEMAN, E. W. et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5. ed.. New York: Lippincott-Raven, 1997. Cap.7, p. 373-396.



KROLL, J. S.; HOPKINS, I.; MOXON, E. R. Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. *Cell*, v. 53, p. 347-356, 1988.

KROLL, J. S., et al. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, v.171, n.6, p.3343-3347, 1989.

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.

KROLL, J. S.; LOYNDS, B. M.; MOXON, E. R. The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon. *Molecular Microbiology*, v.5, n.6, p. 1549-1560, 1991.

KWAK, Y.H. et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *Haemophilus influenzae* from Korean children in prevaccination era. *Journal Korean Medical Science*, v. 15, p.616-22, 2000.

LA CLAIRE, L.L et al. Identification of *Haemophilus influenzae* by Standard slide Agglutination serotyping and PCR – based capsulated typing. *Journal Clinical Microbiology*, v. 41, n.1, p. 393 – 396, 2003.

LANDGRAF, I. M.; VIEIRA, M. P. Biotypes and serotypes of *H. influenzae* from patients with meningitis in the city of S. Paulo, Brazil. *Journal Clinical Microbiology*, v.31, n.3, p. 743-745, 1993.

LEVY, G. C. Meningites purulentas. In: AMATO NETO, V.; BALDY, J. L. S. Doenças Transmissíveis. 3.ed. rev. São Paulo: Sarvier, 1991, Cap.51, p.605-615.

LIPUMA, J. J.; RICHMAN, H. ; TERRENCE, L. S. Haemocin, the bacteriocin produced by *Haemophilus influenzae*: species distribution and role in colonization. *Infection and Immunity*, v.58, n.6, p.1600-1605, 1990.

LÓPEZ, M. G. et al. Meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo f. *Anales Españoles Pediatría*, v.53, n.4, p. 369-371, 2000.

LUONG, D. C. 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.

MACLEOD, C. M. et al. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *Journal of Experimental Medicine*, v.82, p. 445, 1945.

MÄKELÄ, P. H. et al. Polysaccharide vaccines of group A *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b: a field trial in Finland. *The Journal of Infectious Diseases*, v.136, suppl., p. S43, 1977.

MÄKELÄ, P.H. Unencapsulated *Haemophilus influenzae*—What kind of pathogen? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.7, n.5, p. 606-609, 1988.

MÄKELÄ, P. H et al. – Clinical experience with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Pediatrics*, v.85, suppl., p. 651, 1990.

MARZOCHI, K. B. F. et al. Avaliação das Meningites no Rio de Janeiro – Evolução, vigilância epidemiológica e seqüelas. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 15., 2004, Aracaju. Suplemento I. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (37).

McVERNON, J . et al. Outbreak of *Haemophilus influenzae* type b disease among fully vaccinated children in a day-care center. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v.23, n.1, p. 38-41, 2004.

MEATS, E. et al. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogetic relationships by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.4, p.1623-1636, 2003.

MENDELMAN, P. M. *Haemophilus* infections In: WENTWORTH, B.B. *Diagnostic Procedures for Bacterial Infections*. 7 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1987. Cap. 16, p.301-316.

MENDELMAN, P. M.; SMITH, A. L. *Haemophilus influenzae*. In: FEIGIN, R. D.; Cherry, J. D. *Textbook of Pediatric Infectious Disease*. 2nd ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1987. Vol. 1.

MENDELMAN, P. M. et al. Immunogenicity and safety of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide - *Neisseria meningitidis* conjugate vaccine in 7,5 µg liquid formulation: a comparison of three lots with the 15,0 µg lyophilized formulation. *Vaccine*, v.15, n. 6/7, p.775-781, 1997.

MIRANZI, S.S.C.; CAMACHO, L.A.B.; VALENTE, J.G. *Haemophilus influenzae* tipo b: situação epidemiológica no Estado de Minas Gerais, Brasil, 1993 a 1997. *Caderno de Saúde Pública*, v.19, n.5, p. 1267-1275, 2003.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. *Haemophilus* b conjugate vaccines for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children two months of age and older. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, v.40, RR-1, p.1-7, 1991.

MOUSTAOU, N. et al. Serotypes, biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Haemophilus influenzae* isolated from invasive disease in children in Casablanca. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 6, p. 48-49, 2000.

MOXON, E. R. et al. The Impact of hib conjugate vaccines in preventing invasive *H. influenzae* diseases in the UK. *Vaccine*, v.17, p. S11-S13, 1999.

MÜHLEMANN, K. et al. Molecular characteristics of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease during the period of vaccination in Switzerland: analysis of strains isolated between 1986 and 1993. *Journal Clinical Microbiology*, v.34, p. 560–563, 1996.

MURPHY T. V. et al. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Journal of Pediatrics*, v.122, n. 4, p. 517-523, 1993.

MURPHU, T. et al. Declining incidence of *Haemophilus influenzae* type b disease since introduction of vaccination. *Journal of American Medicine Association*, v. 269, n. 2, p. 246-248, 1993.

MURPHU, T. Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.16, p. 129-134, 2003.

MUSSER, J. M. et al. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, v. 56, p.1837-1845, 1988.

NITTA, D. M. et al. Invasive *Haemophilus influenzae* type f Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v.14, p.157-160, 1995.

PELTOLA, H. et al. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double blind field study of 100.000 vaccines 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics*, v.60, p. 730, 1977.

PELTOLA, H et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremia infections with the capsular polysaccharide vaccine. *New England Journal of Medicine*, v.310, p.561, 1984.

PELTOLA, H., *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Latin America and The Caribbean. Journal of Clinical Microbiology, 16:780-7. 1997.

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

PELTOLA, H.; SALO, E.; SEXÉN, H. Incidence of *Haemophilus influenzae* type b meningitis during 18 years of vaccine use: observational study using routine hospital data. British Medical Journal, v.330, p.18- 19, 2005.

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 nontypable *Haemophilus influenzae*. Journal of Clinical Microbiology, v. 40, p. 660-662, 2002.

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

PITTMAN, M. The Interrelation of the amount of V - factor and the amount of air necessary for growth of *Haemophilus influenzae* type b in certain media. Journal of Bacteriology, p.149-161, 1935.

POOLMAN, J. T. Polysaccharides and membrane vaccines. In: MIZRAHI, A.. Advances in Biotechnological Processes- Bacterial Vaccines. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 57-86.

RAPOLA, S. et al. Comparison of four different sampling methods for detecting pharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children. Journal of Clinical Microbiology, v.35, p.1077-1079, 1997.

REIS, J. N. et al. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* isolated during population-based surveillance for meningitis in Salvador, Brazil. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 46 (11): 3641-3643, 2002.

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. *Journal of Infectious Diseases*, v.187, p. 109-116, 2003.

RIJKERS, G.T. et al. Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. *Lancet*, v.361, p.1563, 2003.

ROBBINS, J. B.; SCHJEERSON, R.; PITTMAN, M. *Haemophilus influenzae* type b infections. In: *BACTERIAL Vaccines*, New York: Academic Press, 1984. cap 10.

ROCHE, J. R. AND MOXON, E. R. Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections. *Trends in Microbiology*, v.3, n.8, p. 304-309, 1995.

RODRIGUES, L.P.; SCHNEERSON, R. ; ROBBINS, J. B. Immunity to *Haemophilus Influenzae* type b. *The Journal of Immunology*, v. 107, n.4, p. 1071-1080, 1971.

RUSSEL, F. M. et al. High incidence of *Haemophilus influenzae* type b infection in children in Pacific Island countries. *Clinical Infectious Diseases*, v.37, p.1593-9, 2003.

ROUNTREE, P. M. et al. Further studies on the nasal flora of people of Papua New Guinea. *Medical Journal of Australia*, n.1, p. 967, 1967.

RUBIN ,L.G. et al. Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel beta-lactamase. *Lancet*, v.7, n.2, p. 1008-10,1981.

SACCHI, C. T. et al. High level of sequence diversity in the 16S rRNA genes of *Haemophilus influenzae* isolates is useful for molecular subtyping. *Journal Clinical Microbiology*, v.43, p. 3734-3742, 2005.

SADER, H.S. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates in Latin America. Results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-98). *Brazilian Journal of Infectious Disease*, v.4, p.245-254, 2000.

SANTOSAHAN, M. Can *Haemophilus influenzae* type b disease be eliminated from the United States? *The Journal of Pediatrics*, v.137, n.3 p. 295-298, 2000.

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*, p.3639-3644, 2003.

SCHEIFELE, D. et al. Invasive *Haemophilus influenzae* type b infections in vaccinated and unvaccinated children in Canada, 2001-2003. *Canadian Medical Association or its licensors*, v.172, n.1, p. 53-56, 2005

SCHNEERSON, R. et al. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide - protein conjugates. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 152, p. 361-376, 1980.

SHARMA, A. et al. Subtype distribution of *Haemophilus influenzae* isolates from North India. *Journal of Medical Microbiology*, v. 51, p. 399-404, 2002.

SIMÕES, L.L.P. et al. Impact of *Haemophilus influenzae* b (Hib) vaccination on meningitis in central Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v.38, p. 664-670, 2004.

SLACK, M.P. et al. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. *Pediatrics Infectious Disease Journal*, v. 17, p. S204-S207, 1998.

SMITH, V. H. et al. PCR – ribotyping of nontypeable *Haemophilus influenzae* Journal of Clinical Microbiology, v.33, p.1192-1195, 1995.

SMITH, V. H. et al. Carriage of multiple ribotypes of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* in aboriginal infants with otitis media. Epidemiology and Infection, v.116, p.177-183, 1996.

SMITH-VAUGHAN, H.C. et al. Low Genetic Diversity of *Haemophilus influenzae* type b compared to nonencapsulated *H. influenzae* in a population in which *H. influenzae* is highly endemic. Infection and Immunity, v.66, n.7, p. 3403-3409, 1998.

STEINHOFF, M.; GOLDBLATT, D. Conjugate Hib vaccines. Lancet, v.1, n.361(9355)p. 360-361, 2003.

TUNKEL, A.R. et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis Clinical Infectious Disease, v.39, n.9, p.1267-1284, 2004.

URWIN, G. et al. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. The *Haemophilus influenzae* Study Group. Clinical Infectious Diseases, v. 22, p.1069-1076, 1996.

VAN ALPHEN, L. et al. Differences in genetic diversity of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* from various diseases. Microbiology, n.143, p. 1423-1431, 1997.

VAN BELKUM, A. et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, p. 275-293, 1998.

VAN KETEL, R. J.; DE WEVER, B.; VAN ALPHEN, L., Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. Journal of Medical Microbiology, v.33, p.271-276. 1990.

VEGA-BRICENO, L E., et al. Non-typable *Haemophilus influenzae* severe pneumonia in an infant: case report. Revista Chilena de Infectologia v..22, n.1, p.89-92, 2005.



VERSALOVIC, J.; KOEUTH. T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 19, p. 406-409, 1991.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cellular Biology*, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIALON, A. et al. High sensitivity and specificity of serum procalcitonin levels in adults with bacterial meningitis. *Clinical Infectious Disease*, v.28, p. 1313-6, 1999.

VILLASEÑOR-SIERRA, A. et al. Prevalencia de estado de portador de *Haemophilus influenzae* in niños de Ciudad Nezahualcóyotl, estado de México, México. *Salud Publica de México*, v. 38, p. 87-93, 1996.

WAGGONER-FOUNTAIN, L.A. et al. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens . *Clinical Infectious Disease*, v. 21, p.1322-1324, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Biological Standardization: 41 report. Geneva,1991. p.15-37 (WHO-Technical Report Series, 814)

WINSLOW, C-E.A. et al. The Families and genera of the bacteria. Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *Journal of Bacteriology*, v.2, p. 506 – 566, 1917.

ZANELLA, R. C., et al. Characterization of *Haemophilus influenzae* isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 1999. *Microbial Drug Resistance*. v.8, p. 67-72, 2002.

ZHOU, F. et al. Impact of universal *Haemophilus influenzae* type b vaccination starting at 2 months of age in the United States: an economic analysis. *Pediatrics*, v.110, p.653-661, 2002.

## 7- ANEXOS

### 7.1- ANEXO 1:

DE ALMEIDA, A E. - Variações da Sensibilidade das Bactérias aos Antimicrobianos: O Comportamento de Cepas de *Haemophilus influenzae* – antes e após a vacinação com a vacina contra o Hib. (Palestrante) I Simpósio de Multirresistência Bacteriana, UFPE – dezembro 2002.



## 7.2 - ANEXO 2:

ALMEIDA, A. E.C.C. et al – Estudo das cepas de *Haemophilus influenzae* circulantes no Rio de Janeiro. Avaliação dos sorotipos mais frequentes após o emprego da vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). I SIMBRAVISA - Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária - Revista Brasileira de Epidemiologia, Brasil, p. 86, 2002.





### 7.3 – ANEXO 3:

ALMEIDA, A.E.C.C. et al – Controle de Qualidade da vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). Ensaio de identidade do polissacarídeo capsular b. Comparação de Métodos. I SIMBRAVISA - Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária - Revista Brasileira de Epidemiologia, Brasil, p.96, 2002.







#### 7.4- ANEXO 4:

ALMEIDA, A.E.C.C. et al – Estudo de cepas de *Haemophilus influenzae* isoladas no Brasil no período de 1990 a 2003. IV Bienal de Pesquisa da FIOCRUZ, Brasil , n.159, 2004.





7.5- ANEXO 5:

DE ALMEIDA, A.E.C.C. ; MARZOCHI, K.B.F. Doenças por *Haemophilus*. In: LOPES, A. C., (Ed). Clínica Médica. São Paulo: Rocca, [s.d.]. No prelo.

# Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine

A.E.C.C. de Almeida<sup>1</sup>,  
I. de Filippis<sup>1</sup>,  
A.O. de Abreu<sup>1</sup>,  
D.G. Ferreira<sup>1</sup>, A.L. Gemal<sup>1</sup>  
and K.B.F. Marzochi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde,  
Departamento de Microbiologia, <sup>2</sup>Instituto de Pesquisas Evandro Chagas,  
Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

## Abstract

### Correspondence

A.E.C.C. de Almeida  
Av. Brasil, 4365, Manguinhos  
21045-900 Rio de Janeiro, RJ  
Brasil  
Fax: +55-21-2290-0915  
E-mail: eugenio@incqs.fiocruz.br

Received September 28, 2004  
Accepted February 16, 2005

Few vaccines in history have induced such a dramatic decline in incidence over such a short period of time as the *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate. This vaccine was introduced in 1988 in the United States, but only in 1999 was Hib immunization introduced by the Brazilian Ministry of Health as part of the routine infant National Immunization Program. The authors analyzed 229 *H. influenzae* (Hi) isolates from Public Health Laboratories in three Brazilian states: Pernambuco (Northeast, N = 54), Santa Catarina (South, N = 19), and Rio de Janeiro (Southeast, N = 156). The isolates were collected from Brazilian children 0-10 years of age with meningitis and other infections from 1990 to 2003 and were part of the research collection of the National Institute of Quality Control in Health, FIOCRUZ. Bacterial strains were characterized by serotyping and biotyping. During the pre-vaccination period the prevalence infection due to Hib was of 165 isolates and only 2 non-b Hi among all the notified meningitis infections caused by Hi. Our results showed a significant decrease in the prevalence of Hib meningitis from 165 to 33 isolates after 1999. However, during the post-vaccination period of 2001-2003 we observed an increase in the number of non-b Hi isolates: only 2 non-b strains isolated from 1990 to 1999 and 29 from 1999 to 2003. Based on the present data, the authors emphasize the need for more sensitive epidemiological and bacteriological studies aiming the improvement of the available Hib vaccine, in order to protect the susceptible population to infections due to other serological types of Hi and the reevaluation of immunization schedules used by the National Immunization Program.

### Key words

- *Haemophilus influenzae*
- *Haemophilus influenzae* non-b
- Hib conjugate vaccine
- Immunization
- Hib meningitis

In Brazil, during the pre-vaccination period from 1990 to 1999, the coefficient of incidence (annual mean) of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis in children up to 1 year and up to 4 years of age was

22.3 and 8.8 cases per 100,000 inhabitants, respectively (CENEPI, FUNASA, Brazilian Ministry of Health). The lethality rates in these age groups were 19.9 and 17.1%, respectively. In August 1999, the Hib conju-

gate vaccine was introduced by the Brazilian Ministry of Health as part of the routine infant National Immunization Program. Children aged <1 year were scheduled to receive 3 vaccine doses given at 2-month intervals. The vaccination schedule followed in Brazil does not include the booster dose after 12 months. Children aged 12-23 months were scheduled to receive a single vaccine dose. Data from the Brazilian National Health Foundation/National Immunization Program (FUNASA/PNI/Ministry of Health) show that in 2002 and 2003, 92.91 and 95.99% of eligible children received the vaccine, respectively (1). Before the advent of Hib vaccination, pediatric invasive *H. influenzae* (Hi) disease was caused almost exclusively by Hib isolates. After the implementation of vaccination, serotype b disease decreased, and it has been predicted that after the eradication of Hib, other *Haemophilus* serotypes and non-typeable strains could become relatively more important (2,3).

The current study was based on a collection of 229 Hi strains isolated from Brazilian children from 1990 to 2003. We analyzed Hi strains (198 serotype b and 31 non-b strains) isolated from pediatric patients with meningitis (N = 189), septicemia (N = 3) and bronchial secretion (N = 37). Clinical isolates were part of the research collection of the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The Institute has monitored the evolution of phenotypic and genotypic characteristics of Hi strains before and after the introduction of the Hib vaccine by the National Immunization Program. The Institute receives clinical isolates from different regions of Brazil, mainly from the Regional Public Health Laboratories of Pernambuco (Northeast, N = 54) and Santa Catarina (South, N = 19) and from two other Public Health Laboratories in Rio de Janeiro (Southeast, N = 156), Fernandes Figueira Institute, FIOCRUZ (N = 46) and São Sebastião State Institute of

Infectology, State Secretary of Health (N = 110). Reference strains of Hi serotypes a to f were obtained from the Reference Culture Collection of the INCQS/FIOCRUZ. All reference strains were originally from the American Type Culture Collection (USA).

*H. influenzae* isolates were confirmed by Gram staining, recognition of typical morphology after growing for 24 h in 5% CO<sub>2</sub> on chocolate agar consisting of Mueller Hinton agar base (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) enriched with 10% defibrinated horse blood and 1% IsoVitaleX. The biotyping analysis scheme used was based on the production of indole, ornithine decarboxylase, and urease. Serotypes of Hi strains were identified by reaction with monovalent antisera (Difco) against the capsular antigens a, b, c, d, e, and f. Non-typeable Hi strains were determined by lack of agglutination against any of the above-mentioned antisera (4,5). Strains were stored at -70°C in supplemented brain heart infusion broth containing 20% glycerol.

The frequency of serotypes and source of isolates are shown in Table 1. We note that 165 of 167 strains maintained in our collection from the pre-vaccination period (1990-1999) are serotype b and only two are non-b strains (type a). These strains were isolated from children with meningitis aged one month to 10 years. Of these, 94% (N = 157) were from children under 5 years of age following the introduction of Hib conjugate vaccine in Brazil (1999). Thus, our findings show an expected and rapid reduction in the number of invasive Hib infections (from 165 to 33), but other Hi serotypes and non-typeable strains showed increased isolation rates compared to the pre-vaccination period (Table 1). Based on data from the Brazilian National Health Foundation (FUNASA/Ministry of Health), following the introduction of Hib conjugate vaccine, the incidence of Hib meningitis in Brazil decreased by 83% in 2 years, from 1368 cases in 1999 to 234 cases in 2001 (1).

During the period from 2001 to 2003, we observed the appearance of other serotypes (non-b Hi) as well as an upward trend in both type b and non-typeable Hi. In Brazil no epidemiological pattern has been determined for the country as a whole, suggesting differences in the quality of meningitis surveillance programs in each Brazilian geographic area (6). The Hib strains causing invasive disease during this period may be representative of the pool of strains circulating among carriers, or they may have been a subset of these carrier strains. It is also possible that the invasive strains were introduced from an unrecognized source. It is therefore of interest to determine differences between invasive and carrier Hib strains. Invasive Hi disease is now associated primarily with non-typeable Hi or with Hi of capsule types a, c, d, e, and especially f (4). An adequate epidemiological surveillance system would be helpful to evaluate the role of these non-b Hi and non-typeable Hi strains as significant pathogens showing an increase in isolation rates.

It is important to determine the potential pathogenicity of Hi strains by encouraging the use of molecular typing methods for molecular epidemiology studies based on geographic origin and isolation periods. It is also important to investigate associations between the types/biotypes and clinical manifestations and age groups during the post-vaccination versus the pre-vaccination period. We call attention to the fact that severe forms of disease are still present during the post-vaccination period. Table 1 shows that, despite the drastic decrease of reported cases between the pre-vaccination (1990-1999) and post-vaccination (2001-2003) periods, 22 out of 25 strains isolated from meningitis and septicemia were type b, 1 was type a, 1 type c, and 1 type d. There are few publications about Brazilian Hib strains, and one of the latest studies examining strains isolated in the Northeast region of Brazil showed an increase in type a isolates after vaccination

against Hib (7,8).

Recent studies show an increase of non-b Hi isolates, suggesting possible serotype replacement, a potential concern for public health surveillance, since so far there are no vaccines available against serotypes a, c, d, e, and f (4,5,9). Other studies show the re-emergence of Hib strains among vaccinated patients in different countries, despite the different vaccination strategies used in their respective Immunization Programs (10,11). Some reports have described increased rates of non-b Hi invasive disease in regions where Hib conjugate vaccines have been used (12,13) and outbreaks of Hib disease have been reported (14). Results reported by the Centers for Disease Control show that because Hib vaccines protect against type b and not against other Hi strains, serotyping of all Hi isolates from patients with invasive disease is necessary to monitor the effectiveness of the vaccination program and the national progress towards Hib elimination. Serotype information is needed to measure the sensitivity of the surveillance system and to detect the emergence of invasive disease from non-type b Hi strains (15).

Biotyping of Hi isolates can be used for epidemiological research purposes, but it is of minor value for patients. Likewise, biotypes I and II were the most prevalent among invasive strains. Biotype I, serotype b, for instance, is often associated with severe

Table 1. Frequency distribution of source of isolates and serotypes of 229 *Haemophilus influenzae* strains isolated from 1990 to 2003.

Year of isolation	Source			Serotypes						NT
	CFS	B	BS	a	b	c	d	e	f	
1990-1999	167	0	0	2	165	0	0	0	0	0
2001	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0
2002	9	2	16	0	14	0	1	1	1	10
2003	10	1	21	3	16	3	2	0	0	8
Total	189	3	37	5	198	3	3	1	1	18
	82.5%	1.3%	16.2%	2.2%	86.5%	1.3%	1.3%	0.4%	0.4%	7.9%

CFS = cerebrospinal fluid; B = blood; BS = bronchial secretion; NT = non-typeable.



Table 2. Frequency distribution of biotypes of 165 *Haemophilus influenzae* strains isolated from 1990 to 2003.

Year of isolation	Biotypes							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1990-1999	47	26	3	5	4	9	3	6
2001	1	1	0	1	0	0	0	0
2002	14	7	0	0	3	2	1	0
2003	10	9	5	3	0	0	1	4
Total	72	43	8	9	7	11	5	10
	43.6%	26.1%	4.9%	5.5%	4.2%	6.7%	3.0%	6.0%

meningitis in children (4,16). Worthy of note is the finding that in 1990-1999 the higher prevalence was of biotypes I and II. After the introduction of the conjugate vaccine (1999), a higher variability of biotypes was observed among Hi isolates, including biotypes III, IV and VIII (Table 2). The higher variability of biotypes and the various clinical manifestations caused by non-b Hi and non-typeable strains may reflect an apparent relationship between biotype and site of infection which should be evaluated by further epidemiological studies (17).

These considerations emphasize the need for close clinical, epidemiological, and laboratory surveillance using sensitive methods for determining the genetic patterns of circu-

lating strains and their temporal evolution. The continued monitoring of all invasive infections caused by Hi in Brazil is imperative in order to provide accurate epidemiological data that will permit more effective measures in immunization campaigns. It is also important to reevaluate the current immunization schedules or even to identify modifications in the conjugate Hib vaccine currently in use in order to also protect against invasive disease caused by *H. influenzae* strains of any serotype, as well as non-typeable Hi strains.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. C. Frasch, Division of Bacterial Products, Center for Biologic Evaluation and Research (CBER), Food and Drug Administration/FDA, Bethesda, MD, USA, for scientific suggestions, a critical review and helpful comments during the preparation of the manuscript. We also thank Nadjla F. de Souza and Rita Bertoncini, Public Health Laboratory/LACEN, Pernambuco and Santa Catarina States, and Cléia M.M. Cunha, Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, and the State Secretary of Health, Rio de Janeiro, for providing *H. influenzae* strains.

## References

1. FUNASA - Boletim Eletrônico Epidemiológico. <http://www.funasa.gov.br>. Accessed June 12, 2003.
2. Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, Slack MPE, Fogarty J, Moloney AC, Ramsay ME & Moxon ER (2001). Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatrics Infectious Disease Journal*, 20: 300-305.
3. Mühlemann K, Balz M, Aebi S & Schopfer K (1996). Molecular characteristics of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease during the period of vaccination in Switzerland: Analysis of strains isolated between 1986 and 1993. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 560-563.
4. Campos J (1999). *Haemophilus*. In: Murray PR, Barron EJ, Tenover FC & Tenover FC & Tenover RH (Editors), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
5. Gomez-de-Leon P, Santos JI, Caballero J, Gómez D, Espinosa LE, Moreno I, Piñero D & Cravioto A (2000). Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2504-2511.
6. Ministério da Saúde (1998). Meningites em geral. In: *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, DF, Brazil.
7. Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM et al. (2003). Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of immunization in Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, 187: 109-116.
8. Simões LLP, Andrade ALSS, Laval CA, Oliveira RM, Silva AS, Martelli CM, Alves SLA, Almeida RM & Andrade JG (2004). Impact of *Haemophilus influenzae* b (Hib) vaccination on meningitis in central Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 38: 664-670.
9. LaClaire LL, Tondella MLC, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PP,

- Rosenstein NE & Popovic T (2003). Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 393-396.
10. Hargreaves RM, Slack MPE, Howard AJ, Anderson E & Ramsay ME (1996). Changing patterns of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales after introduction of the Hib vaccination programme. *British Medical Journal*, 312: 160-161.
  11. Steinhoff M & Goldblatt D (2003). Conjugate Hib vaccines. *Lancet*, 361: 360-361.
  12. Perdue DG, Bulkow LR, Gellin BG, Davidson M, Petersen KM, Singleton RJ & Parkinson AJ (2000). Invasive *Haemophilus influenzae* disease in Alaskan residents aged 10 years and older before and after infant vaccination programs. *Journal of the American Medical Association*, 283: 3089-3094.
  13. Urwin G, Krohn JA, Deaver-Robinson K, Wenger JD & Farley MM (1996). Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. The *Haemophilus influenzae* Study Group. *Clinical Infectious Diseases*, 22: 1069-1076.
  14. McVernon J, Morgan P, Mallaghan C, Biswas T, Natarajan M, Griffiths D, Slack M & Moxon R (2004). Outbreak of *Haemophilus influenzae* type b disease among fully vaccinated children in a day-care center. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 23: 38-41.
  15. Anonymous (2002). Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children - United States, 1998-2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 51: 234-237.
  16. Harper JJ & Tilse MH (1991). Biotypes of *Haemophilus influenzae* that are associated with noninvasive infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 2539-2542.
  17. Moustouli N, Aitmand R, Elmdaghri N & Benbachir M (2000). Serotypes, biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Haemophilus influenzae* isolated from invasive disease in children in Casablanca. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 48-49.

Antimicrobial susceptibility studies

## Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990–2003)

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida<sup>a,\*</sup>, Ivano de Filippis<sup>a</sup>, Diana Guedes Ferreira<sup>a</sup>,  
Alessandra Oliveira de Abreu<sup>a</sup>, Cristina Rebelo<sup>b</sup>, André Luis Gemal<sup>a</sup>,  
Keyla Belízia Feldman Marzochi<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiologia/Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS),  
Rio de Janeiro 21045-900, RJ, Brazil

<sup>b</sup>Instituto Estadual de Infectologia S. Sebastião, Secretaria Estadual de Saúde, Rio de Janeiro 20931-000, RJ, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Pesquisas Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21045-900, RJ, Brazil

Received 12 April 2005; accepted 2 August 2005

### Abstract

Antimicrobial susceptibility was determined for 174 *Haemophilus influenzae* strains collected from patients with infection before and after vaccination against Hib (1990–1999 and 2000–2003, respectively) from 4 public health laboratories in 3 Brazilian states. All strains were characterized for serotype and  $\beta$ -lactamase production and in vitro activity of the following antimicrobial agents: ampicillin, amoxicillin/clavulanate, ceftriaxone, rifampin, chloramphenicol, and trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX). Minimum inhibitory concentrations were determined according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Overall, ampicillin resistance was observed in 29 strains (17%), all  $\beta$ -lactamase producers. All isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanate and ceftriaxone. The prevalence of TMP-SMX-resistant isolates increased from 32.6% in the period 1990–1999 to 65.8% during the period 2000–2003. Among these isolates, 10.0% and 12.5% were resistant to ampicillin and chloramphenicol, respectively. Resistance to rifampin was detected in 8.2% and 9.7% of the strains, in 2 periods, respectively. Continued surveillance is necessary to monitor trends with the *H. influenzae* disease in Brazil.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *Haemophilus influenzae*; Antimicrobial susceptibility; Hib vaccine; Brazil

### 1. Introduction

*Haemophilus influenzae* is a pathogenic Gram-negative bacterium responsible for a wide variety of infections in both children and adults, from bronchitis to meningitis. *H. influenzae* is classified into 2 major groups: typeable (encapsulated) and nontypeable (nonencapsulated) strains. Six capsule serotypes have been described (a–f) by Pittman et al. (1931), Satola et al. (2003), and Campos et al. (2004).

With the widespread use of *H. influenzae* type b conjugate vaccines in the United States starting in 1988 (Adams et al., 1993; LaClaire et al., 2003), the incidence of invasive type b *H. influenzae* disease in children younger

than 5 years has declined dramatically (Adams et al., 1993; CDC, 2002). In Brazil, during the prevaccination period, from 1990 to 1999, the incidence coefficient (annual mean) of *H. influenzae* type b meningitis in children aged up to 1 year and up to 4 years were 22.3 and 8.8 cases per 100,000 inhabitants, respectively (FUNASA, 2003). The lethality rates among these age groups were 19.9% and 17.1%, respectively. In August 1999, the *H. influenzae* type b conjugate vaccine was introduced as part of the routine National Immunization Program in Brazil, under the Ministry of Health. Children aged <1 year were scheduled to receive 3 vaccine doses given at 2-month intervals. The actual vaccination schedule followed in Brazil does not include the booster shot after 12 months. Children aged 12–23 months were scheduled to receive a single vaccine dose. Data from the Brazilian National Health Foundation/National Immunization Program (FUNASA /PNI/Ministry

\* Corresponding author. Tel.: +55-21-3865-5236; fax: +55-21-2290-0915.

E-mail address: [eugenio@incqs.fiocruz.br](mailto:eugenio@incqs.fiocruz.br) (A.E.C.C. de Almeida).

of Health) show that in 2002 and 2003, 92.91% and 95.99%, respectively, of eligible children received the vaccine.

Before the advent of *H. influenzae* type b vaccination, pediatric invasive *H. influenzae* disease was caused almost exclusively by *H. influenzae* type b isolates. After the implementation of vaccination, serotype b disease decreased, and it has been predicted that after the eradication of *H. influenzae* type b, other *Haemophilus* serotypes and nontypeable strains could become relatively more important (Heath et al., 2001; Mühlemann et al., 1996; De Almeida et al., 2005). The advent and widespread use of the protein-conjugated type b capsular polysaccharide *H. influenzae* vaccine have largely eliminated the risk of life-threatening infections due to encapsulated type b strains (Black et al., 1992), but localized infections caused by nonencapsulated *H. influenzae* strains remain frequent. Antimicrobial resistance has emerged in both *H. influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, and effective patient management requires physicians to be aware of the patterns and clinical significance of antibiotic resistance in these pathogens. This knowledge is obtained, for the most part, from periodic systematic epidemiologic surveillance studies (Jacobs et al., 1999; Mendes et al., 2004).

An adequate identification of the etiological agent is therefore important, as well as the correct specific antibiotic therapy for each case, because antimicrobial resistance among clinical isolates of *H. influenzae* has become an increasingly prevalent problem (Doern et al., 1986). In addition, in many countries, antibiotics are frequently used in patients before diagnostic testing and, in some cases, the clinical practice for the diagnosis of suspected meningitis does not dictate routine lumbar punctures. Moreover, many children may not have access to medical facilities, and diagnostic capabilities are often not available (Dominguez and Daum, 2003; Russel et al., 2003).

For many years, ampicillin and/or chloramphenicol were recommended for the treatment of meningitis in infants. Between 1972 and 1974, the first ampicillin-resistant *H. influenzae* isolates were reported in Europe and the United States, and after that the prevalence of nonsusceptible strains has increased and spread worldwide (Jacobs et al., 1999; Jordans and Slack, 1995; Jorgensen, 1992). The emergence of antimicrobial resistance in *H. influenzae* and *S. pneumoniae* has been widely reported (Koeth et al., 2004). The primary mechanism of aminopenicillin resistance of *H. influenzae* is plasmid-mediated production of  $\beta$ -lactamase. The prevalence of  $\beta$ -lactamase production also varies by country, but seems to have reached a plateau in recent years (Jones, 1999). The rate of  $\beta$ -lactamase production of *H. influenzae* strains in Brazil has recently been reported in the range of 10–13% (Sader et al., 1999).

The objective of this study is to determine the susceptibility to different antimicrobial agents of *H. influenzae* isolated from children to verify the possibility of increasing in the resistance during the prevaccination period (1990–1999) and the postvaccination period (2000–2003),

with conjugate vaccine against Hib in 4 centers from 3 Brazilian regions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Organism collection

Clinical isolates were part of the research collection of the National Institute for Quality Control in Health (INCQS), at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Brazil. The institute has monitored the evolution of phenotypic and genotypic characteristics of *H. influenzae* strains before and after the introduction of the *H. influenzae* type b conjugate vaccine by the National Immunization Program. The current study was based on a collection of 174 *H. influenzae* strains isolated from Brazilian children from 1990 to 2003. INCQS receives clinical isolates from different geographic regions of Brazil (States), mainly from the regional public health laboratories in Pernambuco (Northeast) ( $n = 49$ ), Santa Catarina (South) ( $n = 19$ ), and Rio de Janeiro (Southeast), both from the Fernandes Figueira Institute–FIOCRUZ ( $n = 43$ ) and the São Sebastião State Institute of Infectology–State Secretariat of Health ( $n = 63$ ).

We analyzed 98 *H. influenzae* strains isolated from cerebrospinal fluid (CSF) during the prevaccination period (1990–1999). The criteria used by public hospitals to collect the clinical specimens from patients admitted to the regional public health laboratories and sent to the laboratories of Pernambuco, Santa Catarina, and Rio de Janeiro to be immediately processed for this study were the following: patients aged 0–5 years presenting symptoms of bacterial meningitis were submitted to lumbar puncture for the collection of CSF, which was cultured on chocolate brain–heart infusion agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI), supplemented with 10% defibrinated horse blood and 1% IsoVitaleX (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD), Gram stained, and tested for bacterial antigens by Slidex méningite-Kit 5 (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) to confirm Hib.

After 1999, during the postvaccination period, localized infections caused by nonencapsulated and other *H. influenzae* serotypes have been one of the most important causes of respiratory tract infections (RTIs) in Brazil. Thus, new criteria were included to *H. influenzae* infection in this study, not only the growth of *H. influenzae* from a normally sterile site, for example, blood culture or CSF, but also the inclusion of patients who were admitted with symptoms of RTI: the etiology was established by isolates cultured from patients with bronchial secretion obtained during bronchoalveolar lavage of vulnerable populations, such as bronchopneumonia in the exacerbations of chronic bronchitis, and sputum culture was obtained from a deep cough (tracheobronchial sputum). Patients with a history of antibiotic therapy and those currently receiving antibiotics were excluded. Patients with infections that include otitis media

Table 1  
Correlation and frequency of source of 174 *H. influenzae* strains isolated in 1990–2003

Source of clinical specimens	No. of <i>H. influenzae</i> strains isolated and serotypes (a–f) by year of isolation				
	1990–1999	2000	2001	2002	2003
Sterile ( <i>n</i> = 127)					
CSF ( <i>n</i> = 124)	a = 2; b = 96	b = 4	b = 3	b = 9	a = 1; b = 8; c = 1
Blood Culture ( <i>n</i> = 3)	0	0	0	b = 1; c = 1	b = 1
Nonsterile ( <i>n</i> = 47)					
Bronchial secretion ( <i>n</i> = 37)	0	0	0	b = 5; d = 1; e = 1; f = 1; NT = 8	a = 2; b = 7; c = 2; d = 1; e = 1; NT = 8
Sinusitis ( <i>n</i> = 2)	0	0	0	0	c = 1; d = 1
Sputum ( <i>n</i> = 7)	0	0	0	a = 1; b = 5; NT = 1	0
Middle ear infection ( <i>n</i> = 1)	0	0	0	NT = 1	0
Total	98	4	3	35	34
%	56.3	2.3	1.7	20.1	19.6

NT = nontypeable.

and acute suppurative sinusitis: the etiology of patients with acute suppurative sinusitis and otitis media infections was established by culture of paranasal sinus and middle ear fluid, respectively. These isolates were bronchial secretion (*n* = 37), sputum (*n* = 7), middle ear fluid (*n* = 1), and paranasal sinuses fluid (*n* = 2). In addition, *H. influenzae* strains were isolated from CSF (*n* = 26) and blood culture (*n* = 3) as shown in Table 1. From the 174 *H. influenzae* strains isolated during the pre- and postvaccination period, 139 were serotype b and 35 were non-serotype b.

During the postvaccination period, these isolates were collected between October 1999 and December 2003 from 76 children aged <10 years, and all serotype b strains were isolated from unvaccinated or partially vaccinated children. Isolates from patients admitted to public hospitals were included, like prevaccination period, but only from specimens collected within 48 h of admission. Clinical specimens were sent to the regional public health laboratories of Pernambuco, Santa Catarina, and Rio de Janeiro, where primary isolation was performed by inoculation on selective medium consisting of chocolate brain–heart infusion agar plate (Difco), supplemented with 10% defibrinated horse blood and 1% IsoVitaleX (BBL), with 300 mg/L bacitracin. The isolates were identified by Gram staining and typical morphology on chocolate agar plates. *H. influenzae* serotype b was characterized by Slidex méningite-Kit 5 (bioMérieux). All the other serotypes were characterized by slide agglutination serotyping with polyvalent antiserum (Difco).

During the pre- and postvaccination period, all *H. influenzae* isolates were sent to INCQS. At this institute, the isolates were confirmed as *H. influenzae* through Gram staining and recognition of typical morphology, after growing for 24 h in 5% CO<sub>2</sub> on chocolate agar consisting of Mueller–Hinton agar base (Difco), enriched with 10% defibrinated horse blood and 1% IsoVitaleX (BBL). Serotypes of *H. influenzae* strains were identified by reaction with monovalent antisera (Difco) against the capsular antigens a, b, c, d, e, and f. Nontypeable *H. influenzae* strains were determined by lack of agglutination against any of the above-mentioned antisera (Campos, 1999). Reference

strains of *H. influenzae* serotypes a–f were obtained from the Reference Culture Collection at the INCQS/FIOCRUZ and were stored at –70 °C in supplemented brain heart infusion broth containing 20% glycerol. All the reference strains were originally from the ATCC (Manassas, VA).

## 2.2. Antimicrobial susceptibility testing

All strains were subcultured twice on chocolate agar plates consisting of Mueller–Hinton agar base (Difco) enriched with 10% defibrinated horse blood and 1% IsoVitaleX (BBL) and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 18–24 h before testing. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents were determined as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000; Reynolds et al., 2003) by the agar dilution plates method using *Haemophilus* test medium agar, supplemented with 15 µg/mL of bovine hematine, 15 µg/mL of NAD, and 15 µg/mL of yeast extract (Difco), containing one of the following antimicrobial agents at a 2-fold dilution: 1–64 µg/mL ampicillin, 1/1–16/8 µg/mL amoxicillin/clavulanate, 0.06–4 µg/mL ceftriaxone, 0.125–16 µg/mL rifampin (Sigma Chemical, St. Louis, MO), 0.125–16 µg/mL chloramphenicol (United States Pharmacopeia–INCQS/FIOCRUZ, Brazil), and 0.125/0.59–16/152 µg/mL trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX; INCQS/FIOCRUZ, Brazil). The quality control organism was *H. influenzae* ATCC 49247, which was used in every assay; results were only accepted when the reference strain MIC values were in the range specified by NCCLS (2000).

The production of β-lactamase was determined by the chromogenic cephalosporin method (O’Callaghan et al., 1972) using reconstituted lyophilized nitrocefin (Glaxo 87/312 Glaxo Research, Unipath, Hampshire, UK).

## 3. Results

The prevalence of serotypes is shown in Table 1. We note that 96 of 98 strains from the prevaccination period (1990–1999) were serotype b and only 2 were non-serotype b strains (2 type a), isolated from meningitis cases in children

Table 2  
Distribution of  $\beta$ -lactamase-positive strains of 174 *H. influenzae* isolated from 1990 to 2003 in 3 Brazilian states

States	1990–1999		2000–2003	
	No. of strains isolated	$\beta$ -Lactamase-positive (%)	No. of strains isolated	$\beta$ -Lactamase-positive (%)
Rio de Janeiro (Southeast)	55	12.3	51	5.3
Pernambuco (Northeast)	30	4.1	19	7.9
Santa Catarina (South)	13	1.0	06	2.6
Total	98	17.4	76	15.8

1 month to 10 years of age. Of these, 92 (94%) were from children younger than 5 years before the introduction of *H. influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil (1999). Thus, our findings showed an expected and rapid reduction in the number of invasive *H. influenzae* type b infections in the postvaccination period after 1999, but other *H. influenzae* serotypes and nontypeable strains showed increased isolation rates as compared with the prevaccination period (2 of 33). However, major expression of serotype b (39 out 96) is still observed.

Based on data from the Brazilian National Health Foundation (FUNASA/Ministry of Health), after the introduction of *H. influenzae* type b conjugate vaccine, the incidence of *H. influenzae* type b meningitis in Brazil decreased 83% in 2 years, from 1368 cases in 1999 to 234 cases in 2001. The susceptibility of *H. influenzae* to the antibiotics tested is shown in Tables 2 and 3.

Of the 174 isolates collected in our study, 17 (17.4%) and 12 (15.8%) in the pre- and postvaccination periods, respectively, were  $\beta$ -lactamase-positive by the nitrocefin-chromogenic cephalosporin method (O'Callaghan et al., 1972) (Table 2). Overall, ampicillin resistance observed among those 29 strains showed MIC<sub>90</sub> values of 32 and 8  $\mu$ g/mL, respectively. All the  $\beta$ -lactamase-negative isolates were fully or intermediate-susceptible to ampicillin. It is of note, however, that 100% of the *H. influenzae* strains were susceptible to amoxicillin/clavulanate and ceftriaxone. The

MIC ranges and the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for all strains are shown in Table 3.

The susceptibility values for chloramphenicol and rifampin were 80.6% and 86.7%, respectively, among strains isolated from 1990 to 1999; during the postvaccination period the susceptibility of the 72 isolated *H. influenzae* type b was 87.5% for both agents. One should note that the MIC<sub>90</sub> for 9.7% of strains tested against rifampin was very high ( $\geq 4$   $\mu$ g/mL) (Table 3).

The highest prevalence of TMP-SMX–nonsusceptible strains (21.1% intermediate, 65.8% resistant) was found in the period of 2000–2003, whereas in the prevaccination period (1990–1999) it was 24.5% and 32.6%, respectively (Table 3).

#### 4. Discussion

The recent increased resistance of the major respiratory pathogens *H. influenzae* and *S. pneumoniae* to oral antimicrobial agents showed the need to reevaluate treatment options for RTIs (Green and Wald, 1996; Dowell et al., 1998).

The WHO and the Brazilian Ministry of Health have recommended TMP-SMX as a first-line drug because of its lower costs and easy dosage (WHO, 1995) for empiric treatment of most cases of RTIs, including pneumonia. The present study showed a high resistance rate of 65.8% for TMP-SMX in isolates of *H. influenzae* during the postvaccination period (2000–2003), when a decrease in the number of meningitis cases due to *H. influenzae* (mainly type b) was observed together with an increased isolation of *H. influenzae* non-type b causing other infections such as bronchitis, otitis, sinusitis, and others. Hammitt et al. (2005) showed that non-type b *H. influenzae* is an uncommon cause of invasive disease in children. However, with the decline of Hib disease, the relative importance of infections caused by nonencapsulated and non-type b encapsulated *H. influenzae* has increased as observed in the present study. The greatest incidence found (45%) was among *H. influenzae* types a, b, c, d, and nontypeable, isolated from bronchial secretion, with 19% from the Rio de Janeiro state

Table 3  
Summary of MIC and MIC interpretation data of 174 isolates of *H. influenzae* isolated from pediatric patients in Brazil in the 1990–1999 and 2000–2003 periods

Antimicrobial agents	1990–1999 (n = 98)						2000–2003 (n = 76)					
	MIC ( $\mu$ g/mL)			Isolates that were (%)			MIC ( $\mu$ g/mL)			Isolates that were (%)		
	Range	50%	90%	S	I	R	Range	50%	90%	S	I	R
Ampicillin	1–64	1	32	76.5	6.2	17.3	1–64	1	8	77.7	6.5	15.8
Amoxicillin/clavulanate	1/1–16/8	1	1	100	–	–	1/1–16/8	1	1	100	–	–
Ceftriaxone	0.06–4.0	0.5	1	100	–	–	0.06–4.0	0.5	1	100	–	–
Chloramphenicol	0.125–16	1	16	80.6	–	19.4	0.125–16	1	16	87.5	–	12.5
Rifampin	0.125–16	0.5	8	86.7	5.1	8.2	0.125–16	0.5	8	87.5	2.8	9.7
TMP-SMX	0.125/0.59–16/152	1/38	16/152	42.9	24.5	32.6	0.125/0.59–16/152	8/76	16/> 152	13.1	21.1	65.8

S = susceptible; I = intermediate; R = resistant. Interpreted using NCCLS (2000).

alone. Only 2 type b *H. influenzae* strains were isolated from CSF and septicemia, respectively, from the Pernambuco state (Tables 1 and 3). According to Mendes et al. (2004), resistance to antimicrobial agents in Brazil was >40% during the period of 1997–2002 with *H. influenzae* Brazilian isolates. In addition, De Andrade et al. (2001) showed that in the last decade there has been an “epidemic use” of TMP-SMX in patients with HIV infection, which could have also potentially contributed to the increased overall resistance among *H. influenzae* isolates. Our data suggest the need to determine the resistance to TMP-SMX and monitor the incidence of *H. influenzae* in acute respiratory infections and other diseases where *H. influenzae* is frequently the etiologic agent.

The overall prevalence of *H. influenzae* with decreased susceptibility to ampicillin observed in our study was higher than the one reported for Brazil (Mendes et al., 2004). Reis et al. (2002) showed that from 150 *H. influenzae* isolates from Salvador (Brazil), 10 (6.7%) patients developed meningitis due to antibiotic-resistant strains routinely used for the prophylactic treatment of bacterial meningitis in Brazil. However, our results show that there was a little reduction in ampicillin- and chloramphenicol-resistant strains after the vaccination with *H. influenzae* isolates. It is important to note that isolates from the Pernambuco state showed the highest MIC values for chloramphenicol (>16 µg/mL) and ampicillin (>64 µg/mL). All these isolates were β-lactamase-positive. It is therefore extremely important for health authorities to keep monitoring the possible emergence of resistant strains to those antibiotics.

In Brazil, in the last years, the growth of tuberculosis cases has contributed to the increased use of rifampin as a prophylactic drug, which can also have potentially contributed to rifampin resistance found among the strains isolated from 1990 to 2003 in the 3 states studied (Pernambuco, Rio de Janeiro, and Santa Catarina). This resistance showing MIC values >8 µg/mL among *H. influenzae* isolates indicates the necessity to continue the surveillance program.

Because all isolates of *H. influenzae* strains were susceptible to amoxicillin/clavulanate and ceftriaxone, we conclude that these antimicrobial agents could be an option for the treatment of *H. influenzae* disease for patients with suspected *H. influenzae* infections.

In short, our results show that there is an urgent need for periodic surveillance of antibiotic resistance profiles in developing countries. Prophylactic measures such as *H. influenzae* type b conjugate immunization have been highly effective, but *H. influenzae* type b and especially *H. influenzae* non-type b isolates have not yet been totally eliminated. It is expected that the *H. influenzae* type b carriage will be maintained until the herd immunity levels are sufficient to avoid transmission (Bokermann et al., 2003). These findings also emphasize the need for close clinical and epidemiologic surveillance by improving bacteriologic services in public health laboratories, as well as the need to review the present antibiotic therapies used in Brazil.

## Acknowledgments

We are grateful to Nadjla F de Souza and Rita Bertoncini from the Public Health Laboratory/LACEN—Pernambuco and Santa Catarina states and Cléia M. M. Cunha from Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, for providing *H. influenzae* strains. We would like to thank Raffaella Quental for English revision of the text.

## References

- Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zeel ER, Broome CV, Wenger JD (1993) Decline of childhood Hi type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 269:221–226.
- Black SB, Shinefield HR, the Kaiser permanent vaccine study group. (1992) Immunization with oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine on a large HMO population: extended follow-up and impact on *Haemophilus influenzae* disease epidemiology. *Pediatr Infect Dis J* 11:610–613.
- Bokermann S, Zanella RS, Lemos APS, De Andrade ALSS, Brandileone MCC (2003) Evaluation of methodology for serotypes invasive and nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* in the ongoing surveillance in Brazil. *J Clin Microbiol* 41:5546–5550.
- Campos J (1999) In *Haemophilus influenzae*. Eds, PR Murray, EJ Barron, MA Pfaller, FC Tenover and RH Tenover. Manual of clinical microbiology. Washington (DC): American Society for Microbiology, pp. 604–613.
- Campos J, Hernando M, Román F, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J, Lázaro E, de Abajo F, the Group of invasive *Haemophilus* Infections, of the Autonomous Community of Madrid, Spain (2004) Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J Clin Microbiol* 42:524–529.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002) Progress towards elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children—United States, 1998–2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51:234–237.
- De Almeida AECC, de Filippis I, Abreu AO, Ferreira DG, Gemal AL, Marzochi KBF (2005) Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Braz J Med Biol Res* 38:777–781.
- De Andrade ALSS, Brandileone MC, DiFabio JL, Oliveira RM, Silva SA, Baiocchi SSA, Martelli CMT (2001) *Haemophilus influenzae* resistance in Latin America: systemic review of surveillance data. *Microb Drug Resist* 7:403–413.
- Doern GV, Jorgensen JH, Thomsberry D, Preston A, the *Haemophilus influenzae* Surveillance group (1986) Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*: A collaborative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 4:95–107.
- Dominguez SR, Daum RS (2003) Toward global *Haemophilus influenzae* type b immunization. *Clin Infect Dis* 37:1600–1602.
- Dowell SF, Marcy SM, Phillips WR, Gerber MA, Schwartz B (1998) Principles of judicious use of antimicrobial agents for pediatric upper respiratory tract infections. *Pediatrics* 101:163–165.
- FUNASA—<http://www.funasa.gov.br> - Boletim Eletrônico Epidemiológico-12/06/2003.
- Green M, Wald ER (1996) Emerging resistance to antibiotics: impact on respiratory infections in the outpatient setting. *Ann Allergy Asthma Immunol* 77:167–173.
- Hammit LL, Block S, Hennessy TW, DeByle C, Peters H, Parkinson A, Singleton R, Butler JC (2005) Outbreak of invasive *Haemophilus influenzae* serotype a disease. *Pediatr Infect Dis J* 24:453–456.
- Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, Slack MPE, Fogarty J, Moloney AC, Ramsay ME, Moxon ER (2001) Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: Clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatr Infect Dis J* 20:300–305.

- Jacobs MR, Bajaksouzian S, Zilles A, Lin G, Pankuch GA, Appelbaum PC (1999) Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. Surveillance Study. *Antimicrob Agents Chemother* 1901–1908.
- Jones R (1999) The impact of antimicrobial resistance: Changing epidemiology of community acquired respiratory-tract infections. *Am J Health Syst Pharm* 56:S4–S11.
- Jordans JZ, Slack MP (1995) *Haemophilus influenzae*: then and now. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:935–948.
- Jorgensen JH (1992) Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Infect Dis* 14: 1119–1123.
- Koeth LM, Felmingham D, Jacobs MR, Rossi F (2004) Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Sao Paulo, Brazil from 1996 to 2000. *Int J Antimicrob Agents* 23: 356–361.
- LaClaire LL, Tondella MLC, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE, Popovic T, The Bacterial Core Surveillance Team Members (2003) Identification of *Haemophilus influenzae* by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsulated typing. *J Clin Microbiol* 41:393–396.
- Mendes C, Kiffer CRV, Blosser-Middleton RS, Jones ME, Karlowsky JA, Barth A, Rossi F, Andrade S, Sader HS, Thornsberry C, Sahn DF (2004) Antimicrobial susceptibility to levofloxacin and other antibacterial agents among common respiratory pathogens—a Brazilian perspective from the GLOBAL Surveillance Initiative 2001–2002. *Clin Microbiol Infect* 10:521–526.
- Mühlemann K, Balz M, Aebi S, Schopfer K (1996) Molecular characteristics of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease during the period of vaccination in Switzerland: Analysis of strains isolated between 1986 and 1993. *J Clin Microbiol* 34:560–563.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically Approved standard M7-A5, (5th ed.). Wayne, PA: USA NCCLS.
- O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH (1972) Novel method for detection of beta-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1:283–288.
- Pittman M (1931) Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med* 53:471–492.
- Reis JN, Lima JB, Ribeiro GS, Cordeiro SM, Salgado K, Reis MG, Ko AI (2002) Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* isolated during population-based surveillance for meningitis in Salvador, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3641–3643.
- Reynolds R, Shachcloth J, Felmingham D, MacGowan A (2003) Comparison of BSAC agar dilution and NCCLS broth microdilution MIC methods for in vitro susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: The BSAC respiratory resistance surveillance program. *J Antimicrob Chemother* 52:925–930.
- Russel FM, Carapetis JR, Mansoor O, Darcy A, Fakakovi T, Metai A, Potoi NT, Wilson N, Mulholland EK (2003) High incidence of *Haemophilus influenzae* type b infection in children in pacific island countries. *Clin Infect Dis* 37:1593–1599.
- Sader HS, Sampaio J, Zoccoli C, Jones RN (1999) Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers. *Braz J Infect Dis* 3:63–79.
- Satola SW, Schirmer PL, Farley MM (2003) Complete sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. *Infect Immun* 3639–3644.
- World Health Organization (WHO) (1995) The use of essential drugs. *Sixth report of the WHO Expert Committee*. Geneva: World Health Organization.



Molecular and phenotypic characterization of *Haemophilus influenzae* strains isolated from Brazilian patients before and after vaccination against *Haemophilus influenzae* type b (Hib)

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida<sup>a</sup>, Ivano de Filippis<sup>a</sup>, Diana Guedes Ferreira<sup>a</sup>,  
Letícia Ferreira Lima Schroeder<sup>a</sup>, Nadjla F. de Souza<sup>b</sup>, André Luis Gemal<sup>a</sup> & Keyla Belízia  
Feldman Marzochi<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), Departamento de Microbiologia / Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365-Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro – RJ, Brasil; <sup>b</sup>Laboratório de Saúde Pública, Secretaria Estadual de Saúde, Pernambuco, PE- Brasil; <sup>c</sup>Instituto de Pesquisas Evandro Chagas (IPEC) – Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ Av. Brasil, 4365-Manguinhos 21045-900, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Corresponding author:

Antonio E. C. C. de Almeida

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS)

Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365-Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Fone: 55-21-3865-5236

Fax: 55-21-2290-0915

E-mail: [eugenio@incqs.fiocruz.br](mailto:eugenio@incqs.fiocruz.br)

Running title: Molecular analysis of *H. influenzae* in Brazil

## Abstract

In this study we reported the molecular characterization of 235 *Haemophilus influenzae* (Hi) strains collected from children with meningitis, septicemia, bronchial secretion, sinusitis, sputum and middle ear infection, before and after vaccination against *H. influenzae* b (Hib) (1990-2003) from three Brazilian states: Pernambuco, n=54, Rio de Janeiro, n=162, and Santa Catarina, n=19. Our results showed that invasive non-type b encapsulated and non-typeable (NT) Hi increased after 1999. The isolates were capsular typed by slide agglutination serotyping (SAST) and serotypes were confirmed by PCR assay. Comparison of the two methods showed some discrepancies. Seven of the isolates characterized by SAST as NT were determined to be capsular type a (n=1), b (n=4), b<sup>-</sup> (n=2) and 2 characterized as serotype d were identified as capsule type a by PCR. The genetic diversity of invasive and non-invasive Hi strains was determined by ERIC-PCR. Our data suggest that non-b Hi strains circulating in Brazil before and after vaccination, show a recombining population structure, since strains belonging to different serotypes, isolated from different geographic locations, at different time, clustered in the same electrophoretic type. This feature was observed also, with strains isolated from different clinical sources. According to the results achieved, we believe that two important aspects of the circulating strains in Brazil, should be taken in account toward Hib elimination and control of the non-b strains: (1) adequate determination of Hi capsular serotypes and (2) monitoring of the circulating genotypes.

## INTRODUCTION

Before the introduction of highly immunogenic vaccines against *Haemophilus influenzae* type b (Hib), this serotype was the leading cause of bacterial meningitis and a common cause of other invasive infections in young children (Satola *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004). Six capsule serotypes of *Haemophilus influenzae* (Hi) have been described so far, named a to f (Pittman, 1931). Invasive infections caused by non-serotype b encapsulated Hi, are now less common than were Hib infections in the pre-vaccine era, but sporadic infections with these organisms are well recognized and associated to morbidity and mortality (Waggoner-Fountain *et al.*, 1995; Slack *et al.*, 1995; Kroll *et al.*, 1996; Fickweiler *et al.*, 2004). These findings reinforce active surveillance studies suggesting that invasive non-type b encapsulated and nontypeable Hi infections, have increased in recent years (Mühlemann *et al.*, 1996; Heath *et al.*, 2001). Conventionally, Hi serotypes were identified by slide agglutination serotyping (SAST) against six specific anti-sera (a to f), for each capsular antigen. PCR has been used for serotyping Hi strains, showing more sensitivity and specificity when compared with SAST (Falla *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 2003; La Claire *et al.*, 2003).

In August 1999, Hib conjugate vaccine was introduced as part of the routine infant National Immunization Program in Brazil, under the Ministry of Health. The immediate response to this action, was the dramatic decrease of invasive infections due to serotype b. Based on data from the Brazilian National Health Foundation (FUNASA/Ministry of Health), following the introduction of Hib conjugate vaccine, the incidence of Hib meningitis in Brazil decreased 83% in 2 years, from 1368 cases in 1999 to 234 cases in 2001 (FUNASA, 2003). However, recent studies with Brazilian Hi strains showed an increase of type a and

other serotypes isolated after vaccination against Hib (Ribeiro *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2004; de Almeida *et al.*, 2005).

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) has been used for molecular typing of several pathogens (Versalovic *et al.*, 1991, 1994; de Bruijn, *et al.*, 1992). Recently, ERIC elements were found in the genome of other organisms than enterobacteria, such as *H. influenzae* (Hulton *et al.*, 1991; Hood *et al.*, 1996; van Belkum *et al.*, 1994, 1998). In our study we used ERIC-PCR to determine the genetic relation of strains isolated from different locations, at different time before and after the introduction of the conjugate vaccine against Hib.

The aim of the present study is to show the progress achieved toward Hib elimination after the introduction of the Hib conjugate vaccine, but also to attract attention to the importance of the continuous surveillance of Hi disease, monitoring possible changes in the epidemiology of Hib, allowing the replacement of their ecological niche by non-type b strains.

## METHODS

Bacterial isolates. Clinical isolates were part of the research collection of the National Institute for Quality Control in Health (INCQS), at the Oswaldo Cruz Foundation /FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. We analyzed 235 Hi strains isolated from Brazilian children from 1990 to 2003, 9 years before and 4 years after the introduction of the conjugate vaccine. The strains analyzed were isolated from different geographic regions of Brazil (States), mainly from the Regional Public Health Laboratories of Pernambuco (PE) state (northeast, n=54), Santa Catarina (SC) state (south, n=19) and Rio de Janeiro (RJ) state (southeast, n=162). All Hi isolates were confirmed as *Haemophilus influenzae* through Gram staining and recognition of typical morphology after growing for 24h in 5% CO<sub>2</sub> on chocolate agar consisting of Mueller Hinton agar base (Difco Lab, Detroit, MI, USA), enriched with 10% defibrinated horse blood and 1% IsoVitaleX (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA). Serotypes of Hi strains were identified by reaction with monovalent antisera (Difco) against the capsular antigens a, b, c, d, e, and f. Non-typeable Hi strains were determined by lack of agglutination against any of the above-mentioned antisera (Campos, 1999). Reference strains of Hi serotypes a to f, were obtained from the Reference Culture Collection at the INCQS/FIOCRUZ. All the strains used in this study were freeze-dried and stored at -20°C.

DNA extraction and purification. After growth in chocolate agar at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours, ten colonies of *H. influenzae* strains were scraped from agar plates and DNA was extracted using the “Dneasy Tissue Kit” (QIAGEN, Hilden, Germany), according to manufacturer instructions.

Confirmation of serotype and detection of capsule gene by PCR. After SAST all Hi isolates were subjected to PCR as previously described (Falla *et al.*, 1994). Briefly, we used primers directed to the *bexA* region (HI-1 and HI-2). Subsequently, PCR with six pairs of primers included a1-a2, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2 and f1-f2 was performed for capsular typing (a through f), for all the typeable strains in order to confirm serotypes. Each reaction was performed in 25  $\mu$ l volume containing 1 $\mu$ M of each oligonucleotide primer (Invitrogen, USA) 2.5 $\mu$ l of 10x *Taq* Buffer (Promega, Madison, USA), 4mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM each dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5U of *Taq* polymerase (Promega) and 1.5 $\mu$ l of DNA template. The reaction mix was cycled 25 times at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min (we used 57°C to serotype e), and 72°C for 1 min, followed by a final 10 min incubation at 72°C. In further experiments, the non-typeable strains were subjected to PCR with primers b1 and b2, which are specific for capsular type b, to detect type b<sup>-</sup> strains. A strain would be considered to be type b<sup>-</sup>, if it shows a negative result by PCR with primers HI-1 and HI-2 and a positive result with primers b1 and b2 (Falla *et al.*, 1994).

ERIC-PCR and amplification conditions. ERIC-PCR was performed on the purified genome DNA as previously described (van Belkum *et al.* 1994; Gomez-de-Leon *et al.*, 2000). Briefly, extracted DNAs were amplified by using primers outwardly directed to the spacer regions between ERIC elements. Each reaction mixture included 35pmol of each primer (ERIC 1R and ERIC 2; ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC and AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG, respectively). Each reaction was performed in 25 $\mu$ l volume containing 1 $\mu$ M of each oligonucleotide primer (Invitrogen) 2.5 $\mu$ l of 10x *Taq* Buffer (Promega), 4mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM each dNTP (Invitrogen), 0.5U of *Taq* polymerase

(Promega) and 2.5µl of DNA template. Samples were cycled 35 times at 94°C for 1 min, 52°C for 1 min, and 74°C for 4 min, followed by a final 10 min incubation at 74°C.

Analysis of polymerase chain reaction products. Ten µl of all PCR products were resolved by 1% agarose gel electrophoresis at 60 V for 30 min and 80 V for 60 min in 0.5 Tris-borate-EDTA (pH 8.0). Gels were stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide. Gel images were digitalized with the Video Documentation System (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and analyzed with BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

## RESULTS AND DISCUSSION

The correlation and frequency of source of the isolates are showed in Table 1. Table 2 shows the serotypes isolated in all infection processes with Hi. We noted that during the pre-vaccination period (1990-1999) 155 out 159 strains were serotype b and only four (two type a and two type c, respectively) were isolated. All isolates were from meningitis. In the post-vaccination period (2000-2003) other Hi serotypes and non-typeable strains have been isolated showing increased isolation rates when compared to the pre-vaccination period (Tables 1 and 2). However, an important expression of serotype b (43 out 155) is still observed.

After 1999, a decrease in the number of meningitis cases due to Hi type b (155 to 26) was observed together with an increased isolation of Hi non-b causing other infections such as bronchial secretion, sinusitis, sputum and middle ear infection. Table 1 and 2 show that from 76 Hib and non-b isolates, 47 (62%) were from others sources and other serotypes not frequently isolated in Hi infections. When results of SAST and PCR were compared, only 9 (3.8%) discrepant results between the two methods, were found. Isolates serotyped initially by SAST, after PCR serotyping, showed the following results: a (n=2) identified by SAST as serotype d, and 7 NT after SAST serotyping, were classified as a (n=1), b (n=4), b<sup>-</sup> (n=2), by PCR (Table2). However, comparison between PCR and SAST showed that the concordance was of 94.2%. The discrepancy found shows that wrong serotyping results, could be associated with weak or slow reactions, which further demonstrate the interpretation difficulties encountered by using SAST (Gonin *et al* 2000, CDC 2002a,b). An increased in the incidence of Hia meningitis after initiation of Hib vaccination was described in Brazil (Ribeiro *et al.*, 2003) and others countries. Our results showed that in



the pre and post vaccination periods, serotypes a and c have been isolated from meningitis (Table 1). Thus, unequivocal methods to assigning capsular type are required to monitor infection due to uncommon serotypes (a, c, d, e and f). Expression of capsular polysaccharide is not sufficient to detect non-b Hi by SAST. Figure 1 shows strains mutants b<sup>-</sup> from clinical samples which initially were serotyped by SAST, as NTHi. Undoubtedly, PCR assay showed much more sensitivity and specificity than SAST, but it is still an expensive method to be established in public laboratories of developing countries, such as Brazil. Using the slide agglutination method, the frequency of errors fell substantially when standardized reagents, reference strains and routine quality control are followed during the test according to LaClaire *et al.* (2003) and CDC (2002a, b). When SAST is conducted under a strict quality control program, it remains a sensitive and specific tool for serotyping Hi. Adequate determinations of Hi capsular serotypes are an important step toward Hib elimination and control of non-b strains.

#### Determination of genetic diversity

In order to determine the genetic diversity of the strains analyzed, we used the ERIC-PCR method, to determine the genetic relation of strains isolated from different locations, at different time before and after the introduction of the conjugate vaccine. ERIC sequences appeared to be randomly repeated along the bacterial genome, but strains genetically related showed the same intervals between these sequences. Recently, ERIC elements were found in the genome of other organisms than *Enterobacteria*, such as *H. influenzae* (Hulton *et al.*, 1991; Hood *et al.*, 1996) Although limited, our data suggest that Hi strains circulating in Brazil before and after vaccination, show a recombining population structure, since strains belonging to different serotypes, isolated from different geographic locations,

at different time, clustered in the same electrophoretic type. This feature was observed also, with strains isolated from different clinical sources. Dendrogram of Figure 2, shows the overall relatedness of the majority of Hi strains used in this study. Even with a high cutoff point of similarity (70%), each of the 4 clones generated, gather strains with different epidemiological characteristics. Each clone has at least two strains with different serotypes, one of which is a nontypeable strain and isolates from different periods (at least one from the pre-vaccination and one from the post-vaccination periods). ERIC-PCR analysis of 35 Hib strains also showed a mixed population since serotype b strains isolated before and after vaccination, were present in all the 4 clones generated (Figure 3). The analysis non-type b strains, showed a higher genetic diversity than type b strains. In fact the dendrogram of Figure 4 shows that a cutoff point of 70%, generated 7 different genotypes within 17 strains analyzed. The same cutoff point used in the dendrograms generated after ERIC analysis of strains isolated from different states, showed that PE was the state with the higher genetic diversity with 15 strains and 6 clones, while the other two states analyzed, showed a more clonal population structure, since ERIC analysis of strains isolated from SC, generated 2 clones within 13 strains and strains isolated from RJ, generated 3 clones within 23 strains (data not shown). When we analyze only non-typeable strains, the genetic diversity is much higher even of that found with non-type b strains (which includes serotypes a, c, d and NT), with less evidence of clonality. After analysis of 6 NT strains, isolated in the post-vaccination period in the state of RJ, at the same cutoff point of 70%, we found 5 different genotypes (Figure 5). Although the population structure of Hi was first described as clonal (Musser *et al.*, 1988), our results are in accordance with most recent works where high genetic diversity of Hi has been found (Sacchi *et al.*, 2005; Farjo *et al.*, 2004; Pettigrew *et al.*, 2002; Gomez-de-Leon *et al.*, 2000).

The data here presented, show that the continued occurrence of non-b serotypes genetically related with Hib strains, is an important issue that should be monitored to prevent increase in disease due to serotype replacement. Also it is important to note the high genetic diversity found among non-typeable strains which could be an important factor for the acquisition of the capacity to express the capsular lipopolysaccharide, a major virulence factor responsible for strain virulence. Another important question raised after PCR serotyping, is the presence of b<sup>-</sup> mutant strains isolated from patients with invasive disease which were serotyped by SAST as NT Hi. Such capsule-deficient mutant strains, could rapidly revert to encapsulated *H. influenzae* due to immunologic pressure and cause invasive disease. Finally, the high sensitivity and specificity of PCR-based serotyping method, should be valuable for serotyping invasive *H. influenzae* strains in Brazil. Although it is still an expensive method for developing countries, its use should be encouraged in reference laboratories for monitoring the changes in the prevalence of *H. influenzae* serotypes and for accurately estimating the impact of the Hib vaccine in Brazil.

#### Aknowledgements

We are grateful to the expert technical assistance of Alessandra Oliveira de Abreu from INCQS, and Cristina Rebelo from Instituto Estadual de Infectologia S. Sebastião, Secretaria Estadual de Saúde, Rio de Janeiro, RJ and Rita Bertoncini from the Public Health Laboratory/LACEN- Santa Catarina State, and Cléia M. M. Cunha from Instituto Fernandes Figueira /IFF, Fundação Oswaldo Cruz / Fiocruz – Rio de Janeiro for providing *H. influenzae* strains. This work was funded by INCQS / FIOCRUZ / MS.

## REFERENCES

Campos, J. M., (1999). *Haemophilus* p. 604-613. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, F.C. Tenover, & R.H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, USA.

Campos, J., Hernando, M., Román, F., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., Oteo, J., Lázaro, E., Abajo, F. de & the group of invasive *Haemophilus* Infections, of the Autonomous Community of Madrid, Spain. (2004) **Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b.** *J Clin Microbiol* 42, 524-529.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2002a). **Progress towards elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children - United States, 1998 - 2000** *Morb Mortal Wkly Rep* 51, 234-237.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2002b). **Serotyping discrepancies in *Haemophilus influenzae* type b Disease - United States. (1998-1999).** *MMWR* 51, 706-707.

de Almeida, A.E.C.C., de Filippis, I., Abreu, A.O., Ferreira, D.G., Gemal, A.L. & Marzochi, K.B.F. (2005). **Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine.** *Braz.J.Med.Biol.Res.*38, 777-781.

de Bruijin, F.J. (1992). **Use of repetitive (extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria.** *Appl. Environ Microbiol* 58, 2180-2185.

Falla, T. J., Crook, D. W. M., Brophy, L. N., Maskell, D. Kroll, J. S. & Moxon, E. R.(1994). **PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae***. *J Clin Microbiol* 32, 2382-2386.

Farjo, R. S., Foxman, B., Mayuri, JP., Zhang, L., Pettigrew, M. M., Mccoy, S.I., Marrs, C. F., & Gilsdorf, J. R. (2004). **Diversity and sharing of *Haemophilus influenzae* strains colonizing health children attending day-care centers**. *Pediatr Infect Dis J* 23, 41-46.

Fickweiler K., Borte M., Fasshauer, M., Spencker, F.B., Handrick, W & Rodloff, A.C. (2004). **Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type f in an 8-year old girl with congenital humoral immunodeficiency**. *Infection* 32, 112-115.

FUNASA - Boletim Eletrônico Epidemiológico. <http://www.funasa.gov.br>, 2003.

Gomez-de-Leon P., Santos J. I., Caballero J, Gómez D., Espinosa, L.E., Moreno, I., Piñero, D., & Cravioto, A. (2000). **Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR**. *J Clin Microbiol* 38, 2504-2511.

Gonin, P. Lorange, M, & Delage, G. (2000). **Performance of a multiplex PCR for the determination of *Haemophilus influenzae* capsular types in the clinical microbiology laboratory**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37,1-4.

Heath, P.T. Cooy, R. Azzopardi, H.J. Slack, M.P.E. Fogarty, J. Moloney, A. C. Ramsay, M.E. & Moxon, R. (2001). **Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era**. *Pediatr Infect Dis* 20, 300-305.

Hidalgo, M., Parra, C., Ovalle, MV, Agudelo, C.I., Castaneda, E.(2003). **Accuracy of the slide agglutination meted evaluated with PCR in Typing *Haemophilus influenzae* isolates** *Biomedica* 23, 208-212.

Hood, D. W., Deadman, M. E. , Jennings, M. P., Bisercic, M., Fleishmann, R. D., Venter, J. C., & Moxon, E. R. (1996). **DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae***. *Proc Nat Acad Sci USA* 93, 11121-11125.

Hulton, C. S. J., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). **ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria**. *Mol Microbiol* 5, 525-834.

Kroll J.S.& Booy R.(1996). *Haemophilus influenzae*: capsule vaccine and capsulation genetics. *Mol Med Today*2, 160-165.

LaClaire, L.L., Tondella, M.L.C., Beall, DS., Noble, C.A., Raghunathan, P.P., Rosenstein, N.E. & Popovic, T.(2003). **Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing**. *J Clin Microbiol* 41, 393-396.

Mühlemann, K. Balz, M, AEBI, S & Schopfer, K. (1996). **Molecular Characteristics of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease during the period of vaccination in Switzerland: Analysis of strains isolated between 1986 and 1993**.*J Clin Microbiol* 34, 560-563.

Musser, J. M., Kroll J. S., Moxon E. R., & Selander R. K. (1988). **Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae***. *Infect Immun* 56,1837-1845.

Pettigrew, M. M., Foxman, B., Ecevit, Z., Marrs, C. F., & Gilsdorf, J. (2002). **Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontyplable *Haemophilus influenzae***. *J Clin Microbiol* 40, 660-662.

Pittman, M.(1931).**Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae***. *The Journal of Experimental Medicine* 53, 471-492.

Ribeiro, G.S., Reis, J.N., Cordeiro, S.M., Lima, J.B.T., Gouveia, E.L., Petersen, M., Salgado, K., Silva, H.R., Zanella, R.C., Almeida, S.C.G., Brandileone, M.C., Reis, M.G., & Ko, A.I., (2003). **Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil.** *J Infect Dis* 187, 109-116.

Sacchi, C. T., Alber, D., Dull, P., Mothershed, E. A., Whitney, A. M., Barnett, G. A., Popovic, T. , & Mayer, L. W. (2005). **High level of sequence diversity in the 16S rRNA genes of *Haemophilus influenzae* isolates is useful for molecular subtyping.** *J Clin Microbiol* 43, 3734-3742.

Satola, S.W, Schirmer, P.L & Farley, M.M (2003). **Complete Sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants.** *Infect Immun* 3639-3644.

Simões, L.L.P., Andrade, A.L.S.S., Laval, C.A, Oliveira, R.M., Silva, A.S., Martelli, C.M., Alves, S.L.A., Almeida, R.M. & Andrade, J.G. (2004). **Impact of *Haemophilus influenzae* b (Hib) vaccination on meningitis in central Brazil.** *Rev Saúde Pública* 38, 664-670.

Slack, M.P.(1995). **Invasive *Haemophilus influenzae* disease: the impact of Hib immunization** *J Med Microbiol* 42, 75-77.

Van Belkum, Duim,A.B., Regelink, A., Moeller, L., Quint, W., & van Alphen, L., (1994). **Genomic DNA fingerprinting of clinical *Haemophilus influenzae* isolates by polymerase chain reaction amplification: comparison with major outer membrane protein and restriction fragment length polymorphism analysis.** *J Med Microbiol* 41, 63-68.

Van Belkum, A., Scherer, S., Van Alphen, L., Verbrugh, H.A., (1998). **Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes.** *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 275-293

Versalovic, J., Koeuth. T., Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*19, 406-409.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupsky, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol*5, 25-40.

Waggoner-Fountain L.A., Hendley J.O., Cody E.J., Perriello, V.A. & Donowitz,L.G. (1995). The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens – *Clin Infect Dis* 21,1322-4.



Table1. Correlation and frequency of source of 235 *H. influenzae* strains isolated in 1990-2003.

Source of clinical specimens	Period of isolation			
	1990-1999		2000-2003	
	No.	%	No.	%
<b>Sterile (n=188)</b>				
*CSF (n=185)	159	67.7	26	11.1
Blood culture (n=3)	0	0	3	1.3
<b>Non-sterile (n=47)</b>				
Bronchial secretion (n=37)	0	0	37	15.7
Sinusitis (n=2)	0	0	2	0.9
Sputum (n=7)	0	0	7	2.9
Middle ear infection (n=1)	0	0	1	0.4
TOTAL (%)	159	67.7	76	32.3

\*CSF-Cerebrospinal Fluid

Table 2. Correlation between the results of SAST method and PCR capsule typing results for 235 *H. influenzae* strains isolated from 1990 to 2003.

Serotype by SAST	N° of isolated serotype by periods		Serotyping results by PCR			
			Agreement with SAST		Disagreement with SAST	
	1990-1999	2000-2003	N°	%	Typeable and NT	%
a (n=8)	2	6	8	100	0	0
b (n=198)	155	43	198	100	0	0
c (n=9)	2	7	9	100	0	0
d (n=3)	0	3	1	33	2 <sup>a</sup>	67
e (n=1)	0	1	1	100	0	0
f (n=1)	0	1	1	100	0	0
NT(n=15)	0	15	8	53	7 <sup>b</sup>	47
<b>TOTAL</b>	<b>159</b>	<b>76</b>	<b>226</b>	<b>96.2</b>	<b>9</b>	<b>3.8</b>

SAST: Slide agglutination tests

NT: Non-typeable strains

<sup>a</sup> Identified as capsule type a

<sup>b</sup> Identified as capsule type 1(a), 4(b) and 2(b').

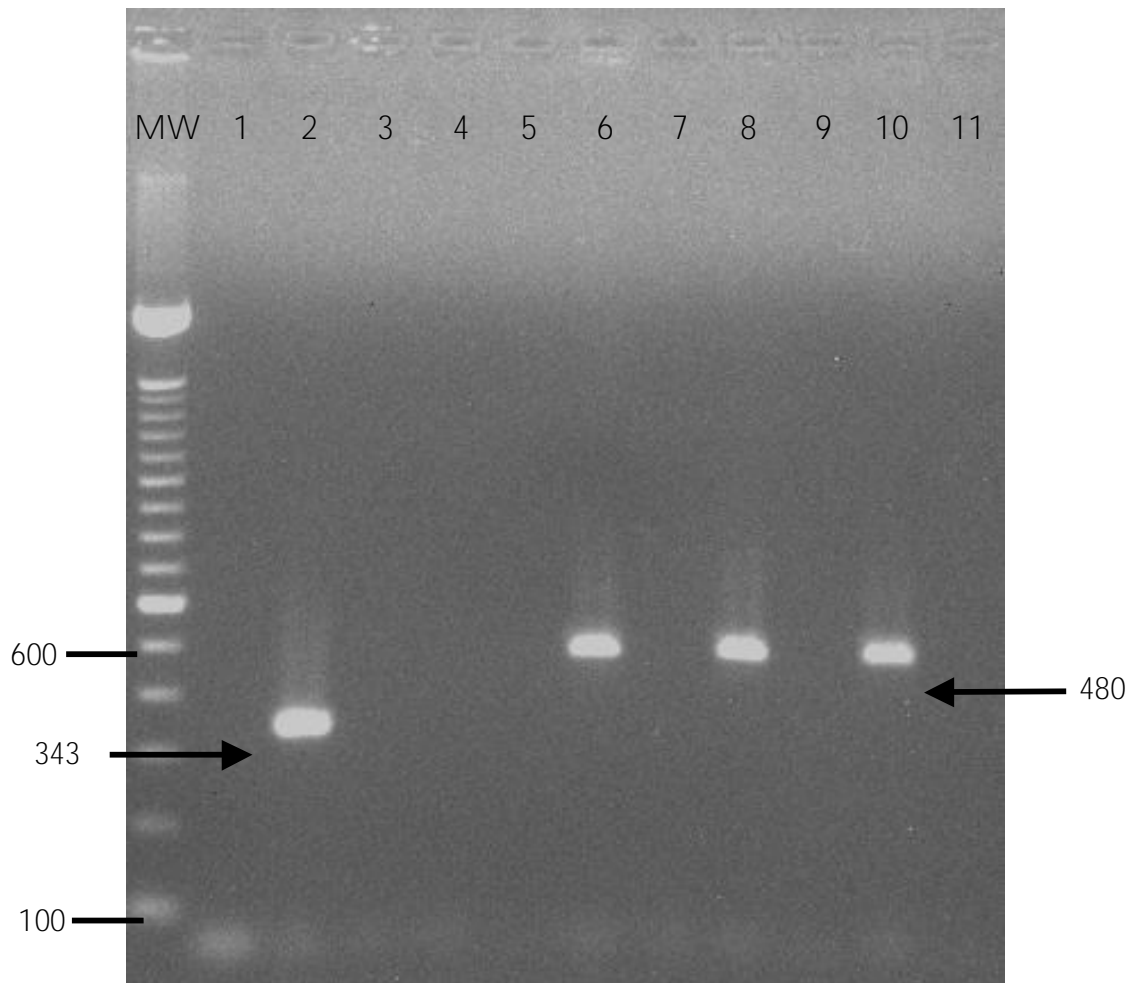


Figure 1 –Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from b and b<sup>-</sup> strains of *H. influenzae* by using PCR primers HI-1, HI-2 (lanes 1 to 5) and b1, b2 (lanes 6 to 11). Lane MW: 100bp molecular weight marker (Invitrogen); lanes 1, 3, 6 and 8: Hi mutant b<sup>-</sup> (clinical samples); lanes 2 and 7: reference strain ATCC 9007, serotype c; lanes 4 and 9: reference strain ATCC 49247 (NT); lanes 5 and 11: negative control ; lane 10: reference strain ATCC 10211, serotype b.

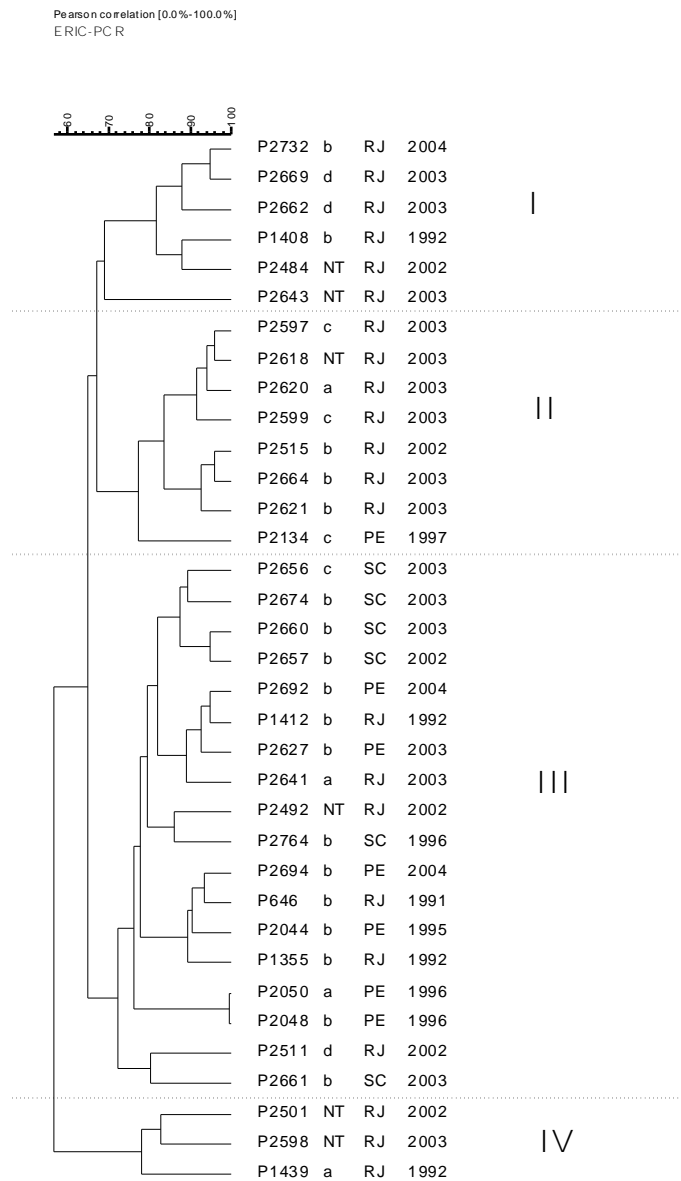


Figure 2. ERIC-PCR analysis of Hi strains isolated from different Brazilian states before and after vaccination. Columns from left to right are: strain number, serotype, state and year of isolation.

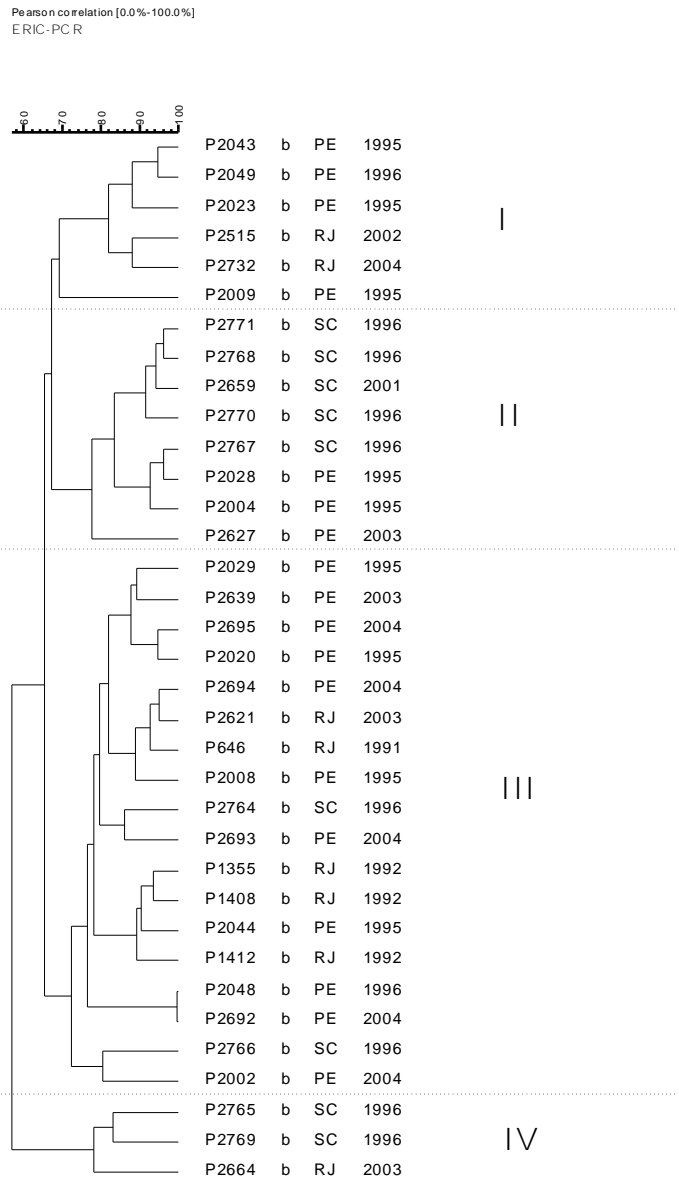


Figure 3. ERIC-PCR analysis of Hib strains isolated from different Brazilian states before and after vaccination. Columns from left to right are: strain number, serotype, state and year of isolation.

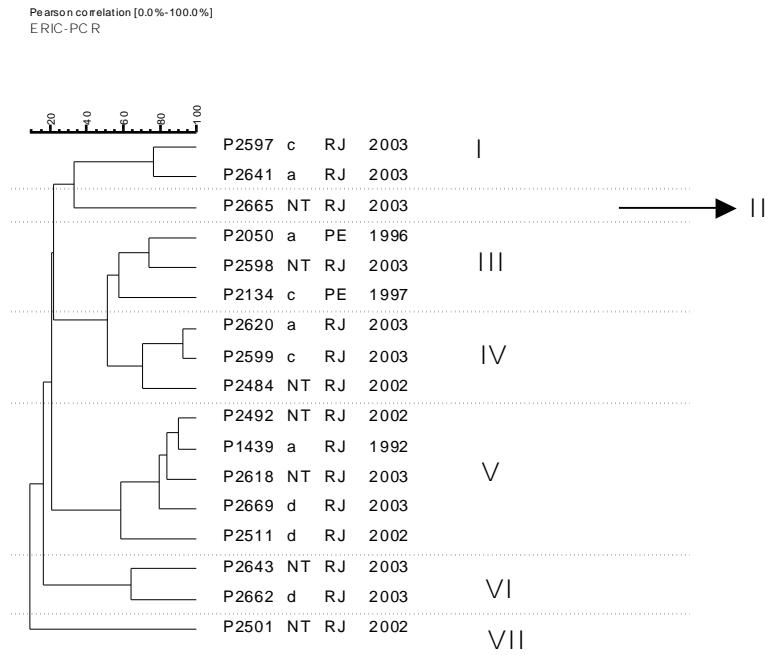


Figure 4. ERIC-PCR analysis of non-b Hi strains isolated from different Brazilian states before and after vaccination. Columns from left to right are: strain number, serotype, state and year of isolation.

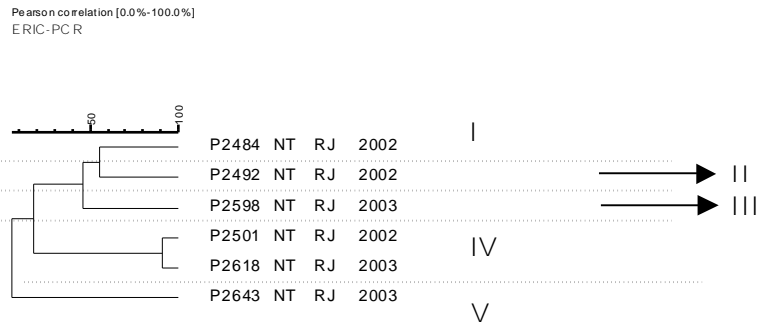


Figure 5. ERIC-PCR analysis of non-typeable Hi strains isolated from different Brazilian states before and after vaccination. Columns from left to right are: strain number, serotype, state and year of isolation.