

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

Jaciara Rodrigues de Oliveira

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Haemophilus influenzae* EM CRIANÇAS DE
UMA CRECHE DO MUNICÍPIO DE JACOBINA, BAHIA.**

Rio de Janeiro

2013

Jaciara Rodrigues de Oliveira

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Haemophilus influenzae* EM CRIANÇAS DE
UMA CRECHE DO MUNICÍPIO DE JACOBINA, BAHIA.**

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

Orientador: Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Oliveira, Jaciara Rodrigues de

Ocorrência e caracterização de *Haemophilus influenzae* em crianças de uma creche do município de Jacobina, Bahia./ Jaciara Rodrigues de Oliveira. – Rio de Janeiro. INCQS / FIOCRUZ, 2013.

80 f.: il., tab.

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

Orientadora: Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

1. *Haemophilus influenzae* tipo b. 2. Infecções por *Haemophilus*. 3. Creche. 4. Saúde Escolar. I.Título

Occurrence and characterization of *Haemophilus influenzae* in children from a day care center in Jacobina, Bahia.

Jaciara Rodrigues de Oliveira

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Haemophilus influenzae* EM CRIANÇAS DE
UMA CRECHE DO MUNICÍPIO DE JACOBINA, BAHIA.**

Dissertação 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 como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre.

Aprovado em: ___/___/___

Dra. Célia Maria Carvalho Pereira de Araújo Romão (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves (UFF/Rio de Janeiro)

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida - Orientador (INCQS/FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus passos, iluminar minha caminhada, por me tornar forte e saudável para alcançar mais um importante objetivo. Agradeço sua presença divina manifestada através de tantos encontros e pessoas amigas que se fazem presentes em minha vida, em especial: Ao meu querido orientador Eugenio, pela orientação, proteção e momentos de descontração durante estes dois anos;

À Nathalia Caldeira, pessoa essencial neste período. Muito obrigada pela importante ajuda com os experimentos, pelo apoio e principalmente pela amizade;

Dr. Ivano de Filippis, pela importante colaboração para este trabalho;

Aos professores Drs. Felipe Gonçalves, Maysa Clementino e Célia Romão pelas importantes sugestões na qualificação e por aceitarem participar da banca examinadora;

Jorge Samuel e todos do Lapec (Jacobina-Ba), pelo apoio dispensado durante a coleta das amostras.

A todos do Laboratório de Micro-organismo de Referência, em especial Cláudia Andrade, Guilherme Sardinha, Cíntia Romanelli, Alice Batalha, Cátia Chaia e Talita Coelho, pela paciência e momentos de descontração;

A Fábio, João Paulo e Adriana, por me acolherem com tanta naturalidade, sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Às amigas da pós, Juliana, Myrna, Bruna, Joseane e Patrícia, pelo incentivo nos momentos de desânimo e angústia.

Não poderia esquecer daqueles que, mesmo distante, se fizeram presentes através de orações e palavras de incentivo, Taíse, Leandra, Sandra e Batista.

A toda família Oliveira, pelo carinho e incentivo, em especial à minha “mãe-irmã” Jane Márcia, por ter me mostrado o caminho da educação e por me ensinar a ser independente e corajosa;

A todos da Biblioteca do INCQS, em especial ao Alexandre, pelas orientações para montar a estrutura desta dissertação.

Ao INCQS e CAPES pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização desta pesquisa;

A todos do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

Aos pais e crianças da creche Mãe Rosa

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

RESUMO

As bactérias do gênero *Haemophilus*, família *Pasteutelleaceae* têm ainda na espécie *influenzae influenzae* (Hi) a mais importante nas infecções humanas. Hi, que inclui os sorotipos capsulares (a-f) e os NT é responsável por diversos quadros infecciosos. *Haemophilus influenzae b* (Hib) era um dos principais responsáveis pelos casos de meningites em diversos países do mundo. Estava também associado a outras infecções graves como epiglote, artrite séptica, bacteremia, pneumonia e septicemia, principalmente em crianças. 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. Após a introdução da vacina conjugada contra o Hib houve redução expressiva das doenças causadas pelo Hib, nos diversos países que introduziram a vacina em seus calendários de imunização, porém, os outros sorotipos, inclusive os HiNT passaram a ser isolados com maior frequência como agente infeccioso de meningites sendo também atualmente um dos principais agentes etiológicos da Otite Média Aguda (OMA), o que o torna alvo de importantes pesquisas para novas vacinas. A colonização desta é fundamental para que ocorra a infecção e, crianças de creches e orfanatos apresentam variáveis taxas desta bactéria. A importância deste estudo continuando uma linha de pesquisa sobre o Hi no INCQS-FIOCRUZ, com ênfase no estudo de cepas isoladas após a implantação da vacina está associada à necessidade de verificar a situação de portadores, em uma população fechada (creche) para contribuir com o conhecimento da situação do Hi após treze anos da introdução da vacina conjugada contra o Hib no Brasil, que reduziu, mas não impediu a ocorrência da doença. O objetivo principal deste estudo foi determinar a ocorrência de Hi em crianças frequentadoras de uma creche em Jacobina, Bahia. Realizou-se coleta de material da nasofaringe de 73 crianças. Encontrou-se uma taxa de colonização de 78,08%. sendo todas as cepas isoladas classificadas como HiNT. O biotipo prevalente foi o III. Através do estudo de susceptibilidade a antimicrobianos foram encontradas cepas produtoras de β -lactamase e não produtoras resistentes à ampicilina. Foram observadas altas taxas de resistência à ampicilina (41,8%) e a sulfametoxazol+trimetoprim (67,2%). O gene *bla*_{TEM}, que é o principal responsável pela resistência à ampicilina, foi encontrado em 81,8%. O *bla*_{ROB}, não foi evidenciado. As amostras BLNAR (β lactamase negativa ampicilina resistente) foram sequenciadas e foram observadas alterações na PBP3, as principais alterações foram: nas posições 547V→547I, encontrada em três amostras, 422N→422S e 273S→273F. Foram avaliadas cepas em relação à amoxicilina / ácido clavulânico, ceftriaxona, rifampicina, cloranfenicol sendo todas sensíveis. O presente estudo confirma a eficácia da vacina contra o Hib e aponta para necessidade de vigilância do HiNT, já que apresentou alto percentual de colonização e de resistência a alguns antimicrobianos.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae*, creches, meningite.

ABSTRACT

The Bacterial genus *Haemophilus* is included in the family *Pasteutelleaceae* and the *influenzae* specie (Hi) is the most important in human infections. Hi includes capsular serotypes (a-f) and non-capsulated strains (NT), which are responsible for many infections. *Haemophilus influenzae* b (Hib) has been one of the main cause of meningitis in many countries worldwide. It has been also associated with other severe infections such as epiglottitis, septic arthritis, bacteremia, pneumonia and septicemia, mainly in children. Since 1988 these infections are preventable by Hib conjugate vaccine consisting of PRP and a carrier protein, and it has been included in the national vaccination program (PNI/ MS) in 1999. After the introduction of Hib conjugate vaccine, diseases caused by Hib had significantly decreased in several countries where the vaccine was introduced into their immunization schedules however, other serotypes, including HiNT, has been isolated with greater frequency as agents of infectious meningitis which is currently one of the main etiological agents of Acute Otitis Media (AOM) and the subject of important researches on new vaccines. Colonization is essential to start the infection, and children from daycare centers present variable rates of the bacteria in their nasopharynx. The importance of this study on an ongoing line of research at INCQS-FIOCRUZ with emphasis on the study of strains isolated after the introduction of the vaccine, is associated with the monitor of carriers in a closed population (daycare) to contribute to the knowledge of the circulation of Hi after thirteen years using conjugate vaccine against Hib in Brazil, which reduced but did not prevent the occurrence of the disease. The main objective of this study was to determine the occurrence of Hi in children attending a daycare center in Jacobina, Bahia. For the study we collected material from the nasopharynx of 73 children. We found a colonization rate of 78.08% and all isolates were classified as HiNT. Biotype III was the most prevalent. The study of antimicrobial susceptibility showed ampicillin-resistant strains producing and non-producing β -lactamase. We also observed high rates of resistance to ampicillin (41.8%) and trimethoprim+sulfametoxazol (67.2%). The gene blaTEM, which is primarily responsible for ampicillin resistance was found in 81.8% of the strains. The blaROB gene, was not observed among the strains analyzed. The PBP3 gene of β LNAR samples was sequenced and changes were observed, the major changes were in positions 547V \rightarrow 547I found in three samples, 422N \rightarrow 422S and 273S \rightarrow 273F. Strain susceptibility was evaluated against amoxicillin/clavulanic acid, ceftriaxone, rifampicin, chloranphenicol and were susceptible. This study confirms the efficacy of the vaccine against Hib and points to the relevance to vigilance HiNT, as presented high percentage of colonization and resistance to some antimicrobials.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, daycare, meningitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Composição das cápsulas polissacarídicas dos diferentes tipos de Hi	20
Figura 1	Esquema simplificado do <i>locus cap</i> do <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b.....	21
Figura 2	Ilustração da coleta de material da nasofaringe	35
Gráfico 1	Biotipos	46
Figura 3:	Produtos da reação de PCR multiplex	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência de colonização de Hi em crianças de diferentes países que frequentam creches	24
Tabela 2	Vacinas contra o Hib licenciadas.....	26
Tabela 3	Classificação do <i>H. influenzae</i> em biótipos, segundo reações bioquímicas.....	37
Tabela 4	Esquema de preparação de diluições da ampicilina utilizados no MIC	39
Tabela 5	Esquema do preparo das placas de meio de cultura e antimicrobiano para realização do MIC	39
Tabela 6	Iniciadores utilizados	42
Tabela 7	Faixa etária das crianças estudadas com isolamento de Hi ...	45
Tabela 8	Número de colônias diferentes de acordo com a classificação fenotípica ou susceptibilidade aos antimicrobianos	46
Tabela 9	Frequência de resistência aos antimicrobianos.....	47
Tabela 10	Amostras resistentes a dois tipos de antimicrobianos	48
Tabela 11	Crianças que estavam/estiveram em uso de antimicrobianos.....	48
Tabela 12	Perfil das amostras resistentes à ampicilina	51
Tabela 13	Alterações de aminoácidos detectadas no sequenciamento ...	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMC	Amoxicilina e ácido clavulanato
AMP	Ampicilina
ATCC	American Type Culture Collection
AZI	Azitromicina
<i>bcs1,2,3,4</i>	genes da região II do <i>H. influenzae</i> tipo b
<i>bexA,B,C,D</i>	genes da região I do <i>H. influenzae</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BLNAR	Resistência a ampicilina, não produtora de β -lactamase
BLNAS	Sensível a ampicilina, não produtora de β -lactamase
BLPAR	Resistência a ampicilina, produtora de β -lactamase
<i>cap</i>	cassete responsável pela síntese e transporte do polissacarídeo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIE	Contraímuno eletroforese
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSF	Líquido Cefalorraquidiano
DD	Disco Difusão
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTP	Difteria Tétano e Pertussis/Coqueluche
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz

Hap	Proteína de <i>Haemophilus</i> de Aderência e penetração
Hi	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hia	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo a
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
Hic	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo c
Hid	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo d
Hie	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo e
Hif	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo f
Hinb	<i>Haemophilus influenzae</i> não b
HiNT	<i>Haemophilus influenzae</i> Não Tipáveis
HTM	<i>Haemophilus</i> test médium
IgA	Imunoglobulina Humana A
IgG	Imunoglobulina Humana G
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade
ITR	Infecções do Trato Respiratório
LOS	Lipo-oligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	Ministério da Saúde
MEC	Ministério da Educação
MER	Meropenem
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NC	Não capsulado
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NT	Não tipável

OAP	Proteína associada a opacidade
OMA	Otite Média Aguda
OMP	Proteína de Membrana Externa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHiD-CV	Vacina Pneumocócica 10-valente conjugada à proteína D do HiNT
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PRP	Polirribosil-ribitol-fosfato
SAL	Soroaglutinação em Lâmina
SQS	Substâncias Químicas de Referência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.2 TRANSMISSÃO.....	18
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	19
1.3.1 Cápsula	19
1.3.1.1 <i>Síntese e transporte de polissacarídeo</i>	20
1.3.2 Outros fatores de virulência.....	21
1.4 OCORRÊNCIA DE <i>H. influenzae</i> EM CRECHES.....	23
1.5 PROFILAXIA: A VACINA.....	24
1.5.1 Mecanismo imune envolvido	25
1.5.2 Tipos de vacina	25
1.6 DIAGNÓSTICO.....	28
1.6.1 Isolamento e identificação do micro-organismo.....	28
1.6.2 Sorotipificação.....	29
1.7 ANTIMICROBIANOS EMPREGADOS NAS INFECÇÕES CONTRA O Hi	30
1.8 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	30
1.8.1 Mecanismo de resistência a ampicilina	31
1.9 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	31
2 OBJETIVOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	34
3.2 COLETA DE DADOS.....	34
3.3 ASPECTOS ÉTICOS	34
3.4 AMOSTRAS.....	35
3.5 IDENTIFICAÇÃO	36
3.6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA, BIOTIPAGEM,E SOROTIPAGEM.....	36

3.7	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	37
3.7.1	Método disco de difusão – DD (Kirby-Bauer).....	37
3.7.2	Métodos para detecção do CIM (Concentração Inibitória Mínima)	38
3.7.2.1	Método Agar diluição – AD.....	38
3.7.2.2	Determinação do CIM por teste E (E-test®).....	40
3.7.3	Teste de detecção de β -lactamase	40
3.8	MÉTODOS MOLECULARES	41
3.8.1	Extração e purificação do DNA genômico	41
3.8.2	Tipificação molecular pela PCR	41
3.8.3	PCR para pesquisa de genes de resistência	42
3.8.4	Sequenciamento dos isolados.....	43
4	RESULTADOS	45
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E PERFIL DOS PARTICIPANTES	45
4.2	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO AD	47
4.3	PESQUISA DE β -LACTAMASE	48
4.4	PESQUISA DOS GENES <i>P6</i> e <i>bexA</i>	49
4.5	DETECÇÃO DOS GENES DA RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS	50
4.6	SEQUENCIAMENTO	52
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	59
6.1	CONCLUSÕES	59
6.2	PERSPECTIVAS	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO A - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS E SUAS CARACTERÍSTICAS	72
	ANEXO B – QUESTIONÁRIO APLICADO	77
	ANEXO C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	78

1 INTRODUÇÃO

A proposta desta pesquisa, dando continuidade a 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 determinar a frequência de cepas de *Haemophilus influenzae* em portadores. Trata-se de crianças saudáveis, menores de seis anos, imunizadas com a vacina conjugada contra o Hib, alunas de uma creche e residentes da cidade de Jacobina-Bahia. Nosso marco divisório inicial para esta pesquisa foi a inclusão da vacina contra o Hib no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS), em agosto de 1999.

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O gênero *Haemophilus* é formado por organismos procariotos pertencentes à família *Pasteurellaceae*, onde também estão incluídos os gêneros *Pasteurella* e *Actinobacillus*. As espécies deste gênero que atualmente são conhecidas como agentes de infecções ou de colonização no homem são: *H. influenzae*, *H. aegyptius* (associado à Febre Purpúrica Brasileira), *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. haemoglobinophilus*, *H. ducreyi*, *H. pittmaniae* e *H. sputorum* (JORDENS & SLACK, 1995; EUZÉBY, 2013). As espécies citadas de *Haemophilus* encontradas em humanos estão, na maioria, associadas ao trato respiratório superior, exceto *H. ducreyi*, que é um patógeno primário do trato genital (MENDELMAN, 1987, KONEMAN *et al.*, 2010).

Haemophilus são bactérias Gram-negativas, anaeróbios facultativos, imóveis, que se apresentam na forma de cocobacilos e bastonetes pleomórficos. Este gênero foi inicialmente descrito por Pfeiffer em 1892. A denominação de *Haemophilus* para este grupo de micro-organismo foi sugerida por apresentar crescimento, somente, quando cultivado em meio sintético contendo sangue ou hemácias lisadas (MARRS *et al.*, 2001).

A denominação *Haemophilus influenzae* (Hi) foi descrita inicialmente por Winslow e colaboradores em 1920 que, estudando os fatores de crescimento desta bactéria, observaram que uma das exigências para seu cultivo era a presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) também chamado de fator V e a hematina ou fator X. Estes fatores são a base primária na

diferenciação laboratorial de Hi das outras espécies de *Haemophilus* (WARD & ZANGWILL 1999).

A espécie *H. influenzae* é dividida em dois grupos, os capsulados e os não-capsulados (NC), descritos pela primeira vez em 1931. Baseado nesta estrutura existem seis sorotipos designados de a até f, que são classificados de acordo com os antígenos encontrados nas suas cápsulas. Os sorotipos que não apresentam ou não expressam a cápsula em sua estrutura são denominadas não tipáveis (NT) ou não capsulados, devido à sua impossibilidade de serem tipados pelos métodos sorológicos tradicionais (PITTMAN, 1931).

As cepas encapsuladas, especialmente *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), mesmo após o emprego da vacina, ainda são responsáveis por uma variedade de doenças invasivas graves como meningite, pericardite, septicemia, artrite séptica e outras como conjuntivite e otite média (MURPHU *et al.*, 1993; DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Estudos revelam que, antes da introdução da vacina contra o Hib, este micro-organismo era um dos principais responsáveis pelos casos de meningites tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (WENGER, 1993; MADORE, 1996). No Brasil até a década de 90, período conhecido como pré-vacinação, o Hib era responsável pela manifestação de 95% das doenças invasivas causadas por Hi (FALLA *et al.* 1995; ARACIL & CAMPOS 2003). Aproximadamente 80% das doenças por Hib ocorriam 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 foram observados em crianças com mais de 18 meses de vida (AMATO NETO *et al.*, 1991).

Apesar do tipo b ser o principal causador de doenças na era pré-vacinal e ainda ser um importante agente infeccioso, os HiNT (*Haemophilus influenzae* não tipáveis) podem ser isolados do trato respiratório superior de crianças saudáveis, com altas taxas de colonização, afetando cerca de 80% a 100% das crianças e são frequentes causadores de infecções localizadas, tais como: conjuntivite, otite média e sinusites em crianças (FOXWEL, 1998; SILVA & MARIN, 2001; CRIPPS *et al.* 2002). O primeiro relato de doença invasiva associado ao HiNT foi documentado em 1996 por Nizet e colaboradores (1996), de uma criança com meningite. Após a vacina contra o Hib, esta bactéria passou a ocupar um importante papel como causadora de doenças invasivas, tais como pneumonia em crianças de países em desenvolvimento e, septicemia e meningite em adultos (CONNELL *et al.*, 2007; ADAM *et al.*, 2010).

Outra classificação importante da espécie Hi é em biotipos, podendo ser subdividida em oito, de acordo com a combinação de resultados do metabolismo de determinados substratos: produção de indol, presença de urease e atividade de ornitina descarboxilase. Os biotipos fornecem informações valiosas para a epidemiologia, pois estão associados a diferentes tipos de infecção, fontes de isolamento, propriedades antigênicas e resistência a antibióticos (LEDEBOER & DOERN 2011).

1.2 TRANSMISSÃO

A colonização da nasofaringe é um fator indispensável para que ocorra a infecção e, as condições locais (condições socioeconômicas desfavoráveis, permanência em locais fechados como creches) representam fatores importantes para o aumento do número de indivíduos colonizados, embora a relação entre colonização e manifestação de infecções não seja diretamente proporcional (ST GEME III & CUTTER, 1996; AGNIESZKA S, 2004).

A dispersão de gotículas e secreções nasofaríngeas, seguindo-se à colonização é a maneira mais comum de transmissão de Hi, além disso, o contato direto da face ou dos olhos das pessoas contaminadas com toalhas, lenços ou outros objetos compartilhados entre pessoas também tem sido descrito como formas de transmissão. O período de incubação é desconhecido, provavelmente variando de dois a quatro dias. A transmissibilidade pode se estabelecer durante todo o tempo em que o micro-organismo estiver presente, podendo ser duradoura, inclusive na ausência de secreções nasais. (KMETZSCH *et al.*, 2003; LOPES, 2006).

Alguns autores chamam atenção para as doenças invasivas ocasionadas por Hi que são observadas principalmente em populações com contatos frequentes ou que estejam em exposição prolongada ao micro-organismo, como por exemplo, creches e orfanatos (GINSBURG *et al.*, 1977; REDMOND & PICHICHERO, 1984; MARIN & SILVA, 2005). O conhecimento dos parâmetros da colonização e da infecção permite determinar os fatores de risco, entre estes, a idade é o mais característico, por exemplo, crianças com menos de cinco anos de idade, com pico de incidência de infecção ao redor dos dois anos (GREENBERG 2004).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

1.3.1 Cápsula

Em 1981, Sutton e colaboradores propuseram uma nova divisão para Hi, baseado nas estruturas dos polissacarídeos capsulados, estruturas dos seis tipos (Quadro 1) estão provavelmente relacionadas com as propriedades de virulência do Hi. O polissacarídeo capsular do Hib confere virulência por "blindagem" das estruturas bacterianas mais profundas, tais como proteção da atividade lítica de complemento. Mais tarde, esta linha de observações foi reforçada por estudos de pesquisadores chefiados por Jin (2007). Chamam atenção de que os tipos a e b são os mais virulentos, sendo ambos compostos de um açúcar neutro, um álcool (ribitol) e uma ligação fosfodiéster, mas tipo b é o único dos seis tipos encapsulados que contém uma pentose, como componente da subunidade do carboidrato da cápsula, uma propriedade que pode estar relacionada à virulência (JIN *et al*, 2007; KONEMAN, 2010). Os tipos "c" e "f" têm menor resistência ao sistema complemento, baixa virulência e são compostos de um açúcar amino N-acetilada, outro sacarídeo e uma ligação fosfodiéster. Já os tipos "d" e "e" têm uma unidade de repetição de uma N-acetilglicosamina e N-acetilmanosamina e ácido urônico (ou ácido manurônico) e são rapidamente lisados pelo complemento (SUTTON *et al.*, 1981, JIN, 2007).

Quadro 1: Composição das cápsulas polissacarídicas dos diferentes tipos de Hi

Tipo	Estrutura*
a	4)-β-D-Glc-(1 → 4)-D-ribitol-5-(PO ₄ →
b	3)-β-D-Rib-(1 → 1)-D-ribitol-5-(PO ₄ →
c	4)-β-D-GlcN Ac-(1 → 3)-α-D-Gal-1-(PO ₄ → $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ \\ R \end{array}$ R = OAc(0.8) H(8.8)
d	4)-β-D-GlcN Ac-(1 → 3)-β-D-Man AN Ac-(1 → $\begin{array}{c} 6 \\ \uparrow \\ \\ \\ R \end{array}$ R = L – serina(0.41) L – teonina(0.14) L – alanina(0.41)
e	3)-β-D-GlcN Ac-(1 → 4)-β-D-Man AN Ac-(1 →
e'	3)-β-D-GlcN Ac-(1 → 4)-β-D-Man AN Ac-(1 → $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \\ \beta\text{-D-frutose} \end{array}$
f	3)-β-D-GalN Ac-(1 → 4)-α-D-GalN Ac-1-(PO ₄ → $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ \text{OAC} \end{array}$

*: Ribose e frutose estão na forma de anel de furanose, Glc, Gal, GlcN Ac, GalNAc e ManANAc estão na forma de anel de piranose

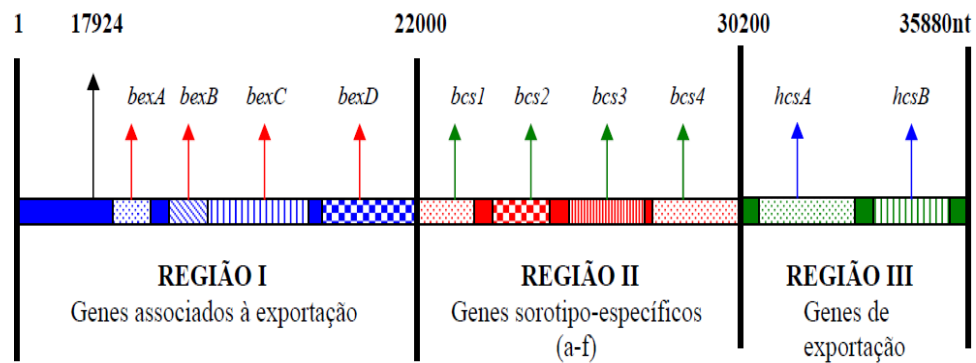
Fonte: SUTTON *et al.* 1981.

1.3.1.1 Síntese e transporte do polissacarídeo

Os polissacarídeos são regulados por um complexo de genes, denominado de locus *cap*, contidos em uma unidade funcional chamada cassette. O locus *cap* tem uma organização comum para todos os seis tipos capsulados e é formado por três regiões: I, II e III, ilustrados na Figura 1. As regiões I e III contêm os genes necessários para o processamento e exportação do polissacarídeo, que são comuns para todos os sorotipos (OGILVIE 2001 *et al.*; SATOLA, SCHIRMER, FARLEY, 2003). A região I contém genes designados *bexA*, *bexB*, *bexC* e *bexD* que estão envolvidos na exportação da cápsula de polissacarídeo. Na região II encontram-se os genes responsáveis pela síntese dos polissacarídeos (*bcs1*, *bcs2*, *bcs3*, *bcs4*), portanto, a região capsular é sorotipo-específica e está situada entre as regiões I e III (SUKUPOLVI-PETTY, GRASS, ST GEME, 2006). Os genes da região III (*hcsA*, *hcsB*), parecem estar envolvidos na pós-polimerização da cápsula (SATOLA, SCHIRMER, FARLEY, 2003). Os isolados de Hib mais invasivos possuem uma duplicação do *cap*, com duas cópias separadas entre si e ligadas a

elementos de inserção (IS1016). Entretanto, estes dois loci não são idênticos, pois uma cópia é intacta e a outra apresenta uma deleção de 1.2kb na porção *bexA* e no IS1016 (KROLL & MOXON, 1988). Este arranjo parcial duplicado, provavelmente, permite a amplificação posterior do gene da cápsula e o aumento na produção do seu polissacarídeo que influencia diretamente na virulência das cepas de Hib (KROLL *et al.*, 1993).

Figura 1: Esquema simplificado do *locus cap* do *Haemophilus influenzae* do tipo b.



Fonte: BATALHA, 2010.

A deleção na porção IS1016 foi inicialmente identificada em isolados do sorotipo “b” resulta em cepas conhecidas como “b⁻” (cepa Hib mutante). Relatos recentes descreveram a ocorrência desta mutação também em cepas do sorotipo a (a⁻) em isolados associados a doenças invasivas. Estas cepas não podem ser diferenciadas das cepas não capsuladas, pelas técnicas de sorotipificação tradicionais, somente pela técnica da PCR com os primers específicos para a região I (primer HI) e para os da região II (primers Hia eHib) (Falla, et al, 1994, 1995; ADDERSON et al., 2001; KAPOGIANNIS et al. 2005).

1.3.2 Outros fatores de virulência

Nas superfícies bacterianas são encontradas fímbrias ou pili, que se apresentam como organelas filamentosas. A principal função das fímbrias é a capacidade de aderência à superfície da mucosa, facilitando assim, a colonização do trato respiratório. São proteínas complexas

contendo uma subunidade maior, codificada pelo gene *hifA* e duas subunidades menores, codificadas pelos genes *hifD* e *hifE*, que se agrupam em cópia única, juntamente com dois genes (*hifB* e *hifC*) que codificam proteínas envolvidas na montagem das fímbrias e proteção das proteínas nascentes das fímbrias contra a degradação durante a sua exportação da célula. Deste modo, estas estruturas têm contribuído para a virulência tanto de Hi capsulados como de não capsulados (GILDSORF, MCCREA, MARRS, 1997).

Outros importantes fatores de virulência são as adesinas, que são encontradas nas cepas encapsuladas tipo b e em cerca de 30-40% das cepas não-tipáveis. A Oap (proteína A associada a opacidade), que é encontrada em todas as cepas de Hi e as proteínas de alto peso molecular HMW1 e HMW2 (encontradas em 70-80% das cepas de HiNT), são responsáveis pela aderência dos micro-organismos às células epiteliais. Algumas cepas não-tipáveis que carecem das adesinas HMW1/HMW2 possuem outra proteína não fimbrial, denominada Hia, que é sintetizada e secretada na sua forma intacta e permanece associada com a membrana externa da bactéria. A Hia é estruturalmente semelhante à proteína Hsf, uma adesina secundária encontrada em cepas tipo b. Além destas, a Hap (proteína de *Haemophilus* de aderência e penetração) possui atividade adesiva e de protease, está relacionada à IgA protease do Hi. (KONEMAN, 2010).

A imunoglobulina A (IgA) apresenta funções protetoras na superfície mucosa, incluindo neutralização das toxinas, inibe a atração do patógeno ao epitélio e a aglutinação dos organismos com a mucosa, facilitando a expulsão do patógeno pelos movimentos mucociliares do trato respiratório. *H. influenzae* produz IgA1 protease que inativa a ação da IgA, impedindo a aglutinação bacteriana ao muco e a expulsão destas bactérias do organismo (MARRS, 2001).

O lipopolissacarídeo (LPS) do Hi difere dos outros LPS dos micro-organismos entéricos e de outros micro-organismos pela ausência das cadeias laterais terminais repetitivas, por conseguinte, é denominado lipo-oligossacarídeo (LOS). Ocorre variação da fase do LOS em nível genético por meio de mudanças nos números de sequências genômicas curtas de quatro nucleotídeos, que resultam em mudanças na fase de leitura códon-anticódon. Além disso, o LOS de muitas cepas de Hi assemelha-se em nível estrutural e antigênico aos oligossacarídeos humanos. Essa modificação do LOS ajuda o micro-organismo a escapar da opsonização e da fagocitose ao imitar estruturas moleculares normalmente presentes no hospedeiro. O LOS do Hi também está sendo investigado como antígeno potencial para o desenvolvimento de vacinas contra HiNT (KONEMAN, 2010).

Mais de 90% das cepas de Hib também produzem uma bacteriocina chamada hemocina. São proteínas produzidas por uma variedade de espécies bacterianas que têm a capacidade de inibir o crescimento de cepas da mesma espécie ou de espécies relacionadas. A produção da hemocina pode contribuir para a habilidade do Hib em competir efetivamente com as cepas HiNb (*Haemophilus influenzae* não b) e HiNT na colonização da nasofaringe (LIPUMA, RICHMAN, TERRENCE, 1990, KONEMAN, 2010).

As cepas de Hi possuem seis a oito Proteínas de Membrana Externa (OMP). Estas proteínas desempenham um papel fundamental na patogenicidade e na proteção e têm sido o principal foco de investigação destinada a identificar componentes para inclusão em vacinas contra HiNT que atualmente estão em desenvolvimento (CANTISANI *et al*, 2012).

1.4 OCORRÊNCIA DE *H. INFLUENZAE* EM CRECHES

Estudos evidenciam que crianças que frequentam creches e orfanatos são mais propícias a desenvolverem doenças invasivas provocadas por Hib, com pico de incidência de infecção ao redor dos dois anos (BORDERON, 1995; SILVA *et al*, 2004). O estudo da prevalência destas bactérias e de seus padrões de resistência aos antibióticos pode fornecer indicações úteis para a antibioticoterapia mais racional dessas infecções (SILVA *et al*, 2004).

H. influenzae é frequentemente isolado do trato respiratório superior de crianças saudáveis e está associado a uma variedade de infecções (SILVA *et al*, 2004). Com a acentuada diminuição das doenças provocadas pelo Hib após a vacinação e a diminuição da colonização deste, outros sorotipos de *H. Influenzae*, especialmente o “a”, “e” e “f”, e as cepas não tipáveis (HiNT) passaram a representar uma importante fonte de doenças invasivas. Em estudo realizado por Urwin e colaboradores (1996), o sorotipo f foi considerado o substituto mais importante do b, enquanto que outros estudos com pacientes com meningite, evidenciam que o Hia é o provável sucessor do Hib (RIBEIRO *et al* 2003; LIMA *et al*, 2010). Um estudo realizado no Canadá revelou que a incidência de doenças invasivas por *H. influenzae* não b está se aproximando das taxas de infecções pelo tipo b que ocorriam antes da vacina (TSANG *et al.*, 2007).

A Tabela 1 apresenta resultados de estudos em vários países, envolvendo crianças que frequentam creches, demonstrando que é possível encontrar situações distintas, com prevalência de colonização de Hi com variação de 37 a 90%.

Tabela 1 – Prevalência de colonização de Hi em crianças de diferentes países que frequentam creches.

Autor/ano	País	População (N)	Prevalência de Hi	Sorotipos prevalentes
Silva e Marin 2001	Brasil	61 crianças	56 (91,8%)	1 Hie, 6 Hib, 49 HiNT
Masuda 2002	Japão	156 crianças	83 (53,2%)	Não citado
Farjo <i>et al.</i> , 2004	Estados Unidos	198 crianças	127 (64%)	Não citado
Silva <i>et al.</i> 2006	Brasil	114 crianças	82 (72%)	1 Hib, 1 Hid, 1 Hie, 3 Hif, 76HiNT
Hashida <i>et al.</i> , 2008	Japão	363 crianças	172 (47,4%)	Não citado

1.5 PROFILAXIA: A VACINA

A partir dos anos 70 foi desenvolvida a primeira vacina contra o Hib, inicialmente composta basicamente da cápsula polissacarídica do micro-organismo (RODRIGUES, SCHNEERSON, ROBBINS, 1971; CRISEL *et al.*, 1975). Após vários estudos realizados para avaliar a eficácia da vacina, concluiu-se que apresentava eficiência satisfatória, mas somente em crianças com idade superior a 18 meses (PELTOLA, 1984; GRANOFF & CATES 1985; 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).

1.5.1 Mecanismo imune envolvido

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 e doses subsequentes estimulam a memória imunitária nos quais a IgG predomina. É esta a base da vacinação atual (SCHNEERSON *et al.*, 1980).

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 (SCHNEERSON *et al.*, 1980).

Com isso, as vacinas conjugadas passaram a se apresentar como solução, já que estudos realizados com este tipo de vacina demonstraram que as vacinas conjugadas não apenas previnem as doenças pela indução de imunidade ativa, mas podem reduzir o número de indivíduos portadores de Hib (ADA, 2003; TAKALA *et al.*, 1991).

1.5.2 Tipos de Vacina

No Brasil atualmente existem licenciadas cinco tipos de vacinas contra o Hib, todas utilizam o mesmo princípio imunogênico variando apenas quanto ao tipo de carreador proteico. A Tabela 2 apresenta as vacinas contra o Hib licenciadas e as proteínas carreadoras (KONEMAN, 2010).

Tabela 2 - Vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b atualmente licenciadas no Brasil.

	Vacina	Fabricante	Proteínas carreadoras
a)	PRP-D	Pasteur Merieux	toxóide diftérico
b)	PRP-HbOC	Wyeth Lederle	toxina diftérica mutante atóxica
c)	PRP-T	Pasteur Merieux, Smith Kline e Bio-Manguinhos	toxóide tetânico
d)	PRP-OMP	Merck & Co.	complexo OMP de <i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo B
e)	Vacina pentavalente	Novartis/Berna e Serum Institute of India Ltda e Bio-Manguinhos	Toxóide tetânico

Fonte: Koneman, 2010 (adaptado).

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 CRM₁₉₇.

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.

e) DTP/HB/Hib: toxóides de difteria e tétano, suspensão celular inativada de *Bordetella pertussis*, antígeno de superfície de hepatite B (HBs-Ag), e P oligossacarídeos conjugados de *Haemophilus influenzae* do tipo b.

A partir de 1997, a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) recomendou a aplicação da vacina contra Hib na América Latina (BEPA, 2004). Em 1999, a vacina contra o Hib foi introduzida no Brasil, pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS). Optou-se em utilizar, dentre os tipos existentes, a produzida através da purificação do polissacarídeo capsular do Hib, o poliribosil-ribitol fosfato (PRP), que é covalentemente ligado ao toxóide tetânico. Em 2002, a apresentação deste imunobiológico era formada pela combinação Hib + DTP (Difteria, Tétano e Pertussis/Coqueluche). Em 2012, em várias cidades do país, esta vacina começou a ser substituída pela vacina pentavalente, que combina a vacina tetravalente, já em uso, com a vacina contra a hepatite B e tem como principal vantagem diminuir o número de injeções (FIOCRUZ, 2007; BRASIL, 2012).

O amplo uso da vacina conjugada anti-Hib em vários países contribuiu para a diminuição drástica, caminhando para a eliminação das doenças invasivas provocadas por Hib naqueles que incluíram a vacina no seu programa de imunização (PELTOLA *et al.*, 2000). No Brasil, trabalhos tem mostrado uma sensível diminuição de infecções causadas por este agente assim como da colonização pelo micro-organismo (PELTOLA *et al.*, 2000; DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Com isso abriu-se a possibilidade da substituição de cepas colonizadoras, do sorotipo b, por outros sorotipos, que têm sido associados a quadros infecciosos graves, inclusive os não capsulados (CARDINES *et al.*, 2007; DE ALMEIDA *et al.*, 2008).

Na tentativa de diminuição dos casos de doenças bacterianas que atingem a infância, em 2010, foi introduzida no calendário de imunização brasileiro, a vacina pneumocócica 10-valente conjugada à proteína D do HiNT (PHiD-CV), que contém sorotipos de pneumococos 1, 5 e 7F além dos sete sorotipos incluídos na vacina 7vCRM (vacina com sete polissacarídeos conjugados com a proteína CRM₁₉₇). A PHiD-CV contém também proteína D recombinante, que atua como proteína transportadora para 8 dos 10 sorotipos e é derivada a partir de uma lipoproteína de superfície celular de HiNT (BERMAL *et al.*, 2009; DICKO *et al.*, 2011). A utilização da proteína D tem como objetivo o aumento da eficácia vacinal na prevenção da otite média aguda (OMA), já que o HiNT é importante agente da doença (VAN DEN BERGH *et al.*, 2013). Dados sobre a colonização da nasofaringe após a introdução destas vacinas conjugadas são limitados e, faltam evidências conclusivas de que as vacinas conjugadas com a proteína D podem afetar a colonização de HiNT e, assim evitar a transmissão deste micro-organismo (VAN DEN BERGH, 2013) e, se comprovar que a vacina oferece proteção contra HiNT será um bônus adicional para vacinação, uma vez que a vacina foi concebida principalmente para prevenir doença pneumocócica (CARVALHO *et al.*, 2011).

Estruturas bacterianas que também são candidatas a vacinas são as proteínas de membrana externa (OMP): P2 e P6 de HiNT. A proteína P2 está parcialmente exposta sobre a superfície de cepas não tipáveis. A análise de sequência de aminoácidos desta proteína purificada indica que as porções da molécula inseridas dentro da membrana externa são conservadas enquanto os epítomos expostos na superfície têm sua sequência altamente variável de uma cepa para outra. Para considerar as proteínas P2 possíveis antígenos para vacinas, será necessária uma análise das OMP P2 de uma variedade de cepas *de H. influenzae* para determinar se os epítomos são conservados em nível estrutural e imunológico (GALDIERO, 2003; KONEMAN, 2010).

Porém estudos iniciados mais recentemente demonstraram uma variação na *H. influenzae* para determinar se os epítomos são conservados em nível estrutural e imunológico (GALDIERO, 2003; KONEMAN, 2010).

Nos estudos com a proteína P6, ao se avaliar a sequência de nucleotídeos entre as estirpes de HiNT, observou-se similaridade de 97%, e 100% na sequência de aminoácidos, indicando desta forma, que a proteína é altamente conservada entre as estirpes (BUD NELSON, 1991), o que não descartou completamente a possibilidade da P6 ser utilizada como componente de uma vacina (NORSKOV- LAURITSEN, 2009; CHANG, 2011).

Desta forma, consideramos de grande importância a existência de estudos para o desenvolvimento de vacinas onde são utilizadas proteínas de Hi e que provavelmente visam a diminuição, ainda mais, de casos de doenças causadas por este micro-organismo.

1.6 DIAGNÓSTICO

A suspeita clínica etiológica é essencial para o tratamento precoce, que pode levar a evolução favorável, sobretudo nas formas clínicas graves da doença associável a *H. influenzae*. No caso das meningites, deve-se sempre proceder a punção do líquido cefalorraquidiano, salvo raras contraindicações, como: infecção no local da punção; presença de sinais neurológicos focais exceto o comprometimento do VI par de nervo craniano, que é comum e decorrente de edema cerebral quando a manifestação for isolada; suspeita de hipertensão intracraniana grave por presença de edema de papila. Em crianças, apenas a ocorrência de crises convulsivas, que ocorrem em 30% dos casos, contraindica a punção. A história clínica completa e acurada, com exame clínico minucioso, incluindo a busca de infecções de porta de entrada como otite, sinusite e pneumonia, é essencial (LOPES *et al*, 2006).

1.6.1 Isolamento e Identificação do Micro-organismo

A cultura bacteriológica da amostra de líquido, de sangue e/ou de outros materiais, como secreções de ouvidos, seios da face, celulites, abscessos e outros - utilizando meios de cultura com os fatores V e X e demais componentes necessários, já citados neste trabalho, para o

crescimento do micro-organismo é de fundamental importância visando o isolamento do *H. influenzae* bem como a sua identificação.

A coloração pelo método de Gram pode estabelecer um diagnóstico presuntivo rápido de meningite por Hi pelo exame direto de amostra de líquido cefalorraquidiano (CSF), o que muitas vezes pode antecipar o início do tratamento.

1.6.2 Sorotipificação

Todos os isolados de *H. influenzae* devem ser sorotipificados. Este procedimento deve ser solicitado especialmente quando se trata de pacientes menores de 15 anos, faixa etária na qual está sendo frequente o aparecimento de infecção pelo Hi após a introdução da vacinação de rotina contra o Hib, como também os isolados em adultos e indivíduos acima de 60 anos (DE ALMEIDA, 2010).

A técnica de detecção do antígeno fornece uma rápida identificação do patógeno, porém seu uso é de valor clínico limitado, sobretudo quando o paciente já está em uso de antimicrobianos e o micro-organismo podendo não estar viável nas culturas. No entanto, em certos contextos clínicos, como em regiões de recursos limitados, quando a prevalência da doença é elevada e a cultura de rotina não é confiável, os métodos de detecção baseados em antígenos podem ser úteis. Entre os métodos indicados, destacam-se (LIPUMA *et al.*, 1990; FALLA, 1994; LEDEBOER & DOERN):

a) aglutinação em látex: rápido, sensível, específico para detecção do antígeno capsular do Hi no líquido, soro, urina, fluido pleural e fluido de articulações;

b) contraímunoeletroforese (CIE): é o método mais antigo, similar à aglutinação em látex, porém é um método menos sensível, mais demorado e exige equipamento específico. Além disso, estudos realizados comparando resultados obtidos por esta técnica e por métodos moleculares evidenciaram o alto índice de resultados falsos positivos, portanto, recomenda-se a utilização de um segundo método para confirmação do diagnóstico (FUKASAWA *et al.*, 2010);

c) identificação molecular pela PCR (Reação em cadeia da Polimerase): 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.

1.7 ANTIMICROBIANOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR Hi

Os antimicrobianos são grandes aliados se usados adequadamente no tratamento contra infecções bacterianas. Porém, seu uso excessivo e indiscriminado favorece o aparecimento das cepas resistentes, o que se reflete na prática como não eficácia.

Durante anos a ampicilina (isoladamente ou em combinação com cloranfenicol) foi considerada como o fármaco de eleição no tratamento de doença invasiva. Com o surgimento de isolados resistentes à ampicilina, ampliou-se o uso de cefalosporinas de amplo espectro. O grupo dos carbapenêmicos é considerado uma alternativa útil para tratamento de infecções invasivas, porém, já há relatos de isolados de Hi resistentes a este fármaco, principalmente entre os que são β -lactamase negativos resistentes à ampicilina (CERQUETTI, 2007).

Portanto, no tratamento de infecções causadas pelo Hi, o estudo dos mecanismos de resistência e a susceptibilidade das cepas devem ser analisados nos laboratórios clínicos e de pesquisas. Devem com isso fornecer dados de apoio para a classe médica, principalmente quando não há proteção pela vacina anti-Hib, já que este micro-organismo vem apresentando um considerável índice de resistência a alguns antimicrobianos que antes eram considerados opções para tratamento da doença (BRYSKIER, 2005; RESMAN, 2012).

Em países em desenvolvimento, o estudo da resistência aos antimicrobianos torna-se ainda mais importante. Nesses países os fármacos que apresentam resistência são aqueles que são utilizados em grande escala, principalmente a combinação de ampicilina e cloranfenicol, tendo em conta o seu baixo custo e eficácia, porém o fator custo-benefício é ainda priorizado (CASTANHEIRA *et al.*, 2006).

1.8 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A auto-administração com antimicrobianos é uma prática comum em países da América, o que contribui para o aumento de muitos organismos resistentes, incluindo resistência à ampicilina por *Haemophilus* spp. Isto pode ocorrer devido a administração de antimicrobiano por pacientes com infecção do trato respiratório fornecendo uma pressão seletiva e diminuição da susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos (FERREIRA *et al.*, 2007).

A resistência a alguns antimicrobianos vem crescendo, principalmente à ampicilina, que durante muito tempo foi recomendada para tratamento de meningites em crianças. Em alguns países da Europa, a incidência de cepas produtoras de β -lactamases é particularmente elevada, atingindo 50% nas cepas Hib, e variando de 20 a 30% em HiNT (DABERNAT *et al.* 2002). No Brasil, estudos realizados com 1.712 cepas originárias de 10 estados, exceto da região norte, apresentam índices de cepas produtoras da enzima entre 6.6 e 57.7% (CASAGRANDE *et al.*, 2002).

1.8.1 Mecanismos de resistência a ampicilina

A resistência de Hi frente à ampicilina é mediada por dois mecanismos, o enzimático e o não enzimático. No mecanismo enzimático ocorre a hidrólise do anel β -lactâmico devido a produção da enzima β -lactamase codificada pelo gene *bla_{TEM}*, presente em aproximadamente 95% dos isolados e, em alguns casos pelo gene *bla_{ROB}*, que geralmente está envolvido com a resistência à cefaclor (HASHIDA, 2008, TRHISTAM, 2010). O mecanismo não enzimático envolve a diminuição da afinidade pela proteína PBP-3 (penicillin-binding protein), que está envolvida na síntese do peptidoglicano, por antimicrobianos β -lactâmicos (UBUKATA *et al.*; 2001; SANBOGI *et al.*, 2006). Os isolados que apresentaram este fenótipo geralmente não produzem β -lactamase e são chamados de β -lactamase negativa ampicilina resistente (BLNAR) (CASTANHEIRA *et al.*, 2006).

1.9 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Com a utilização da vacina conjugada contra o Hib, sem dúvida, houve uma acentuada diminuição de surtos pelo Hib em berçários e creches, assim como dos portadores desse micro-organismo, tanto nas crianças vacinadas como não vacinadas (MEATS *et al.*, 2003). No entanto, em países em desenvolvimento a pneumonia causada por Hib ainda representa uma grande parcela de patogenicidade atribuída a este micro-organismo, sendo responsável por 15 a 25% do total de pneumonias (PELTOLA, 1997; LEVINE *et al.*, 1998; PELTOLA, 2000).

Uma grande variedade de infecções causadas por espécies de *Haemophilus* pode ocorrer em humanos, variando desde doenças infecciosas que são facilmente curáveis como conjuntivite

e otite média (LOOS *et al.*, 1989; TROTIER *et al.*, 1991), até as que são potencialmente perigosas como meningite e pericardite (KONEMAN *et al.*, 2010). Além disso, dados mundiais sobre as taxas de colonização da naso/orofaringe pelo Hi mostram que estas taxas variam de acordo com a região geográfica, faixa etária, condição clínica do portador, entre outras variáveis (LAGOS *et al.*, 1998; DE ALMEIDA, 2005; LADHANI *et al.*, 2008). Estes itens mostram a importância do conhecimento dos fatores de risco através dos parâmetros da colonização e da infecção.

Portanto, a importância deste estudo está associada à necessidade de verificar a situação de portadores, em uma população fechada (creche) para contribuir com o conhecimento da situação do *Haemophilus influenzae* após treze anos de uso da vacina conjugada contra o Hib no Brasil.

Consideramos ser de grande relevância para a Vigilância Epidemiológica do país bem como para a área da Vigilância Sanitária, a investigação proposta, já que se trata não só do monitoramento das cepas de Hi, que estão circulando nos portadores vacinados com a vacina conjugada contra o Hib, como também revelar os sorotipos atuais mais frequentes, tendo em vista que, após a política mundial de imunização com a referida vacina, sobretudo no Brasil, pouco se conhece sobre a nova epidemiologia associada aos sorotipos circulantes e a expressão clínica de infecções localizadas ou invasivas por *H. influenzae* (CAMPOS *et al.*, 2003). Assim, torna-se necessário avaliar as possibilidades de um novo papel ecoepidemiológico e clínico de *Haemophilus influenzae* não b (Hinb), assim como o impacto que estes sorotipos poderão causar em quadros infecciosos e até nortear o desenvolvimento de novas vacinas.

2 OBJETIVOS

Geral

- Isolar, identificar e determinar a ocorrência de Hi a partir de material de nasofaringe de crianças saudáveis, menores de seis anos, imunizadas com a vacina contra o Hib de uma creche do Município de Jacobina, Bahia.

Específicos

- Caracterizar os tipos de Hi encontrados (capsulados e não capsulados) por métodos sorológicos e moleculares;
- Determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados nas infecções pelo Hi e a presença da enzima β -lactamase nas cepas isoladas deste estudo;
- Pesquisar a presença dos genes *TEM-1* e *ROB-1*, relacionados à resistência a beta-lactâmicos nos isolados de Hi, utilizando a técnica da PCR;
- Pesquisar alterações na PBP3 nas amostras BLNAR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido em uma creche municipal do povoado de Cachoeira Grande, Jacobina - BA, cidade que tem uma população de 79.285 habitantes segundo o último censo populacional e área da unidade territorial: 2.359 km² (IBGE, 2010).

A creche é composta por 75 alunos divididos em três turmas de 25. Cada sala de aula mede 49m², que é o tamanho preconizado para salas com 20 alunos. As instalações possuem limitações quanto a algumas recomendações do MEC (Ministério da Educação) (BRASIL, 1988) principalmente nos refeitórios, tipo de piso para cozinha e banheiros, ventilação e a quantidade de banheiros.

3.2 COLETA DE DADOS

Foi realizada uma palestra inicial com a equipe de trabalho da creche, mães e responsáveis, esclarecendo o trabalho de pesquisa, com amplo material audio-visual. Após esta etapa foi realizada entrevista com a aplicação de questionário específico (Anexo I) a cada responsável e mediante o preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II) a cada responsável e respectiva criança. Durante a entrevista, os dados das crianças foram obtidos, como idade, sexo e estado de saúde (vacinação, uso de antibiótico, hospitalização recentemente ou se são portadoras de doença crônica, problemas respiratórios).

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

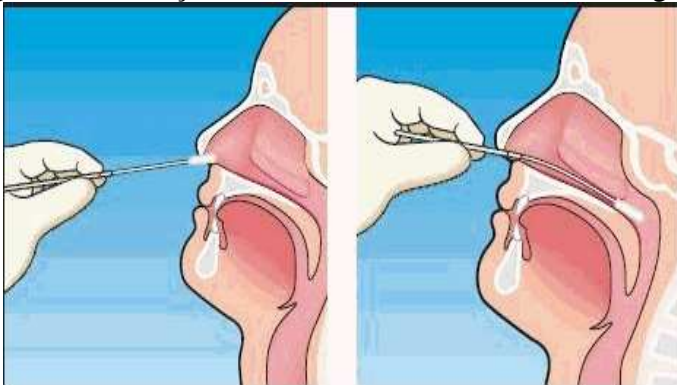
Este trabalho foi desenvolvido observando as recomendações da Resolução nº 196 de 10/10/1996 - Conselho Nacional de Saúde para Pesquisa Científica em Seres Humanos. Foi submetido e autorizado pelo CEP-Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, com o número: 464174.

3.4 AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas de 73 crianças (N=73) das 75 matriculadas, já que duas não estavam presentes no dia da coleta. A faixa etária das crianças era de dois até seis anos de idade.

A coleta foi realizada utilizando “swabs” contendo meio estéril de Stuart e seguindo a técnica de introdução pernasal (Figura 2) e conduzido rapidamente (aproximadamente 30 minutos) para o Laboratório de Pesquisas Clínicas - Lapec, laboratório clínico que atende ao SUS, localizado a 30 km da creche. Esse laboratório foi utilizado como apoio, onde foi realizada a manipulação inicial para obter o crescimento microbiano. Primeiro, semeou-se em placa de ágar chocolate (base de ágar Mueller-Hinton / Difco) enriquecido com 10% de sangue estéril desfibrinado de cavalo, 1% de IsoVitaleX (BBL) e solução estéril de bacitracina (300mg/L) (matéria prima fornecida pelo Setor de Substância Químicas de Referência (SQR) do INCQS-FIOCRUZ), com incubação a 37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas. Desta placa, foram retiradas três colônias sugestivas de Hi (bordas regulares, aspecto acinzentado, semi-opaca, ligeiramente mucoide) e repicadas para nova placa de ágar chocolate (sem bacitracina) e incubadas de maneira semelhante ao isolamento inicial. Em seguida, realizou-se a análise microscópica com coloração de Gram e posterior estocagem à -20° e -70° C em caldo BHI com glicerol a 20%.

Figura 2 - Ilustração da Coleta de material da nasofaringe.



Fonte: <http://webserver.paucl.com/wwwdocs/cltm/Specimen%20Handling/Frame.htm>

3.5 IDENTIFICAÇÃO

Para a identificação dos isolados sugestivos de Hi, semeou-se uma alíquota da cultura de *H. influenzae* previamente estocada à -20°C, em placa de ágar chocolate (base de ágar Mueller-Hinton / Difco) enriquecido com 10% de sangue estéril desfibrinado de cavalo, 1% de IsoVitaleX (BBL) com incubação a 37°C em 5% de CO₂ por 18 a 24 horas. As colônias que, na análise microscópica se apresentaram inicialmente sugestivas de Hi, como bastonetes pleomórficos ou cocobacilos e Gram-negativas foram testadas quanto às exigências nutricionais para os fatores X, V e VX, em meios de cultura contendo ágar nutriente, sem a existência dos fatores citados (LEDEBOER N.A. & DOERN, G.V. 2011).

3.6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA, BIOTIPIFICAÇÃO E SOROTIPIFICAÇÃO

A identificação bioquímica dos Hi foi realizada através dos testes de fermentação de carboidratos em caldo - glicose, sacarose, lactose e manose - em uma base contendo vermelho de fenol como indicador de pH e suplementado com hemina (fator X) e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - NAD (fator V), incubados a 35-37°C por 24 horas. (KONEMAN *et al.* 2010; LEDEBOER N.A. & DOERN, G.V. 2011).

A sorotipificação das cepas de Hi foi realizada através do teste de soro aglutinação em lâmina (SAL) com antissoro comercial, marca Difco (Difco *Haemophilus influenzae* Antisera). Com auxílio de alça descartável, em uma lâmina de vidro, homogeneizou-se colônias de Hi com uma gota de cada antissoro (a-f). Foram utilizadas como controle positivo as cepas: ATCC 9006(Hia); ATCC 10211(Hib); ATCC 9007(Hic); ATCC 9008(Hid); ATCC 8142(Hie); ATCC 9833(Hif) respectivamente. As cepas que não aglutinaram a nenhum dos seis sorotipos foram consideradas como HiNT (KONEMAN *et al.* 2010; LEDEBOER & DOERN, 2011). Nestes casos, de sorotipificação duvidosa ou negativa, os resultados foram confirmados por PCR para todos os tipos capsulares.

A biotipificação foi feita através de três testes bioquímicos: a produção do indol, da urease e ornitina descarboxilase. Adicionou-se uma suspensão densa de cultura pura de Hi com os substratos específicos. A leitura pode ser feita a partir de quatro horas, mas a prova de ornitina às

vezes requer maior tempo de incubação, por isso, a leitura foi realizada após 24 horas. Uma combinação de resultados indica qual o biotipo da amostra (CAMPOS 1999, KONEMAN *et al.*, 2010). A Tabela 3 apresenta as características dos oito biotipos (KONEMAN *et al.* 2010; LEDEBOER & DOERN, 2011).

Tabela 3 - Classificação do *H. influenzae* em biótipos, segundo reações bioquímicas.

Biotipo	Indol	Urease	Ornitina descarboxilase
Biotipo I	+	+	+
Biotipo II	+	+	-
Biotipo III	-	+	-
Biotipo IV	-	+	+
Biotipo V	+	-	+
Biotipo VI	-	-	+
Biotipo VII	+	-	-
Biotipo VIII	-	-	-

Fonte: Koneman, 2010 (adaptado).

3.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada em todas as cepas utilizando-se o método Disco Difusão - DD (Kirby-Bauer) (BAUER *et.al*, 1966). Para as cepas que se apresentaram resistentes, foi realizado o método da CIM - Concentração Inibitória Mínima, adotado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011). Utilizou-se como controle de qualidade, as cepas de referência de Hi ATCC 49247 (*Haemophilus influenzae*) para o ensaio de susceptibilidade aos antibióticos e Hi ATCC 10211(*Haemophilus influenzae*) para a pesquisa da produção de β -lactamase nas cepas estudadas.

3.7.1 Método Disco Difusão – DD (Kirby-Bauer)

Para determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o meio de cultura *Haemophilus* Test Medium (HTM) que consiste da base de Mueller Hinton suplementado com 15 μ g/mL de hemina, 15 μ g/mL de NAD e 5mg/mL de extrato de leveduras. A suspensão das colônias foi realizada no caldo de BHI (Brain Heart Infusion) ajustada à escala de 0,5 Mc Farland

e inoculada com um “swab” estéril com haste de plástico em uma placa de 90 mm contendo o meio HTM. Após a inoculação da suspensão bacteriana nas placas, os discos de antimicrobianos foram distribuídos na superfície do meio com auxílio de uma pinça estéril. Em cada placa foram aplicados quatro discos de antimicrobianos e, em seguida as placas foram incubadas em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂, a 35-37°C, por 16 a 18 horas. Foram testados nove discos com combinações de 11 antimicrobianos para cada cepa bacteriana: ampicilina (AMP - 10 µg), amoxicilina - ácido clavulânico (AMC - 20/10 µg), ceftriaxona (CRO - 30 µg), cloranfenicol (CLO - 30 µg), ciprofloxacina (CIP - 5 µg), rifampicina (RIF - 5 µg) e sulfametoxazol-trimetoprima (SUT - 1.25/23.75 µg), meropenem (MER - 10 µg) e azitromicina (AZI - 15 µg). Todos os discos foram adquiridos comercialmente da empresa Cefar Diagnóstica Ltda.

3.7.2 Métodos para detecção da CIM (concentração inibitória mínima)

As amostras que mostraram resistência a algum antimicrobiano no método de disco difusão foram submetidas à determinação da CIM. Este ensaio foi realizado pelas metodologias: diluição em agar e de Etest®. Posteriormente, comparou-se os resultados dos dois métodos, disco difusão e o CIM.

3.7.2.1 Método diluição em agar (AD) - Ampicilina

- Preparo das soluções com diferentes concentrações do antimicrobiano

Foi preparada uma solução estoque contendo 6400µg/mL de ampicilina em tampão fosfato (pH 8,0 a 0,1 mol/L). Esta solução foi diluída na proporção 1:10 e, a partir desta solução foram feitas diluições seriadas na proporção de 1:2, obtendo-se soluções com concentrações de 0,5 a 64µg/mL. A Tabela 4 mostra o esquema de preparação para as diluições de ampicilina.

Tabela 4 - Esquema de preparação de diluições da ampicilina utilizados no CIM

Tubo	Concentração	Fonte	Vol.	Diluyente	Concentração
1	6400	Estoque	1 mL	9 mL	640
2	640	tubo 1	4 mL	4 mL	320
3	320	tubo 2	4 mL	4 mL	160
4	160	tubo 3	4 mL	4 mL	80
5	80	tubo 4	4 mL	4 mL	40
6	40	tubo 5	4 mL	4 mL	20
7	20	tubo 6	4 mL	4 mL	10
8	10	tubo 7	4 mL	4 mL	5

Fonte: CLLSI, 2011 (adaptado).

- Preparo das placas de meio de cultura com antimicrobiano

Para o preparo das placas, em cada tubo contendo 17,2 mL de HTM, acrescentou-se 2 mL de cada concentração de antimicrobiano, 0,2 mL de isoVitaleX, 0,6 mL de NAD, totalizando 20 mL, volume necessário para atingir a espessura preconizada de 3-4mm do agar. A Tabela 5 apresenta o esquema do preparo do meio de cultura. A suspensão bacteriana foi preparada de forma semelhante à utilizada no disco-difusão (item 4.3.1). Foram inoculados 2 µl de cada amostra com micropipeta (Eppendorf Research®) sobre a superfície da placa de HTM, seguindo o esquema apresentado na Tabela 6 (JORGENSEN *et al.*, 1990).

Tabela 5 - Esquema do preparo das placas de meio de cultura e antimicrobiano para realização do MIC:

Nº da placa	HTM	NAD	isoVitaleX	Sol. antimicrobiano	Concentração final de ampicilina em diluição 1:10 em ágar (µg/ml)
Controle pré-ensaio	17,2mL	0,6mL	0,2mL	2 mL de água purificada estéril*	-
1	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 1	64
2	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 2	32
3	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 3	16
4	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 4	8
5	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 5	4
6	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 6	2
7	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 7	1
8	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL tubo 8	0,5
Controle pós-ensaio	17,2 mL	0,6 mL	0,2 mL	2 mL de água purificada estéril*	-

Fonte: CCLSI, 2011 (adaptado).

Controle pré e pós-ensaio: sem adição de antimicrobiano

* Sem adição de antimicrobiano

HTM: Haemophilus Test Medium

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

As amostras foram inoculadas inicialmente em uma placa controle (sem antimicrobiano), seguida das placas com as menores para as maiores concentrações do antimicrobiano e por último inoculou-se na outra placa controle (sem antimicrobiano). As amostras foram incubadas em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, por 24 horas.

A cepa ATCC 49247 (*Haemophilus influenzae*) foi utilizada como controle positivo, como recomenda o CLSI 2011.

De acordo com os resultados frente às concentrações do antibiótico, as cepas foram classificadas como sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) de acordo com a referência do método de diluição do CLSI 2011.

3.7.2.2 Determinação da CIM por teste E (E-test[®])

Para determinação da CIM, utilizamos a técnica Etest[®]. Está baseada em um gradiente pré-definido e estável do antimicrobiano que é usado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) em microgramas por ml.

Para confecção deste ensaio utilizou-se o meio de cultura contendo HTM. O inóculo foi preparado através da suspensão das colônias no caldo de BHI, ajustada à escala de 0,5 Mc Farland. Com o auxílio de um “swab” estéril com haste de plástico, o inóculo foi semeado em uma placa de Petri de 90 mm. Em seguida, com auxílio de uma pinça estéril, aplicou-se as fitas do E-test[®] na superfície do meio. A incubação foi realizada em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂, a 35-37°C por 16 a 18 horas.

3.7.3 Teste de detecção de β-lactamase

As amostras que apresentaram resistência à ampicilina foram testadas para a produção de β-lactamase pelo método da cefalosporina cromogênica usando nitrocefina (Oxoid). Para o controle de qualidade foram usadas as cepas ATCC 29213 (*S. aureus*) para controle positivo e ATCC 25923 (*S. aureus*) para controle negativo. Foi seguida a técnica de O'Callaghan & cols. (1972)

3.8 MÉTODOS MOLECULARES

3.8.1 Extração e purificação do DNA genômico

Após o cultivo das cepas de Hi em meio de ágar chocolate suplementado, com o auxílio de uma alça bacteriológica, transferiu-se a quantidade equivalente a 10 µL de cada crescimento microbiano para um microtubo de 1,5 mL contendo tampão específico do kit da Qiagen, para a extração e purificação do DNA genômico, seguindo as etapas do protocolo da Qiagen D Neasy Tissue Kit (Qiagen Inc.Valencia, Calif. EUA). O DNA extraído e purificado foi armazenado a 20°C.

3.8.2 Tipificação molecular pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Todas as amostras foram testadas pela técnica da PCR multiplex adaptada de Van Ketel *et al.* (1990), utilizando dois pares de iniciadores P₆₁/ P₆₂ para confirmação da espécie e dois, HI₁/ HI₂, para identificação do gene para expressão da cápsula.

Os tipos capsulares foram determinados pela PCR de acordo com Falla e colaboradores (1994), que descreveram iniciadores específicos para detectar cada um dos seis tipos capsulares do Hi. Os iniciadores utilizados foram desenhados para a região I e III, comum a todas as cepas de Hi e onde estão localizados os genes específicos para a síntese das proteínas envolvidas na produção dos polissacarídeos específicos dos tipos a–f. A sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados são apresentadas na Tabela 6. Utilizaram-se as seguintes cepas padrões como controle positivo para todas as PCRs: Hia ATCC 9006; Hib ATCC 10211; Hic ATCC 9007; Hid ATCC 9008; Hie ATCC 8142; Hif ATCC 9833.

As amostras confirmadas para espécie, mas que não amplificaram o gene *bexA*, que caracteriza a presença da cápsula, foram ainda analisadas quanto a presença do gene *bcs*, que codifica a cápsula tipo b e possibilita a identificação de Hi tipo b⁻ e quanto a presença do gene *acs*, para pesquisa do tipo a⁻.

O produto da amplificação do DNA foi aplicado em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL e submetido a eletroforese por 1 hora a 100 V, utilizando-se como marcador de tamanho molecular 100 bp Ladder (Invitrogen).

3.8.3 PCR para pesquisa de genes de resistência

Todas as amostras resistentes foram pesquisadas quanto à presença dos genes responsáveis pela resistência à ampicilina pelo mecanismo da produção de beta-lactamase utilizando os seguintes iniciadores: Tem-tem (para pesquisa do gene *bla_{TEM}*), Rob-San, Rob-tem, *bla_{ROB}* (para pesquisa do gene *bla_{ROB}*) e PBP (para pesquisa do gene da proteína PBP-3. O gene *bla_{ROB}* foi pesquisado de acordo com o que foi descrito por Tenover e colaboradores (1994) e Sanbogi e colaboradores (2006). No entanto, os iniciadores indicados nesses estudos não resultaram em amplificação de bandas compatíveis com o esperado. Foram então desenhados novos iniciadores para a amplificação desse gene. A Tabela 6 apresenta a lista de iniciadores utilizados no estudo e suas respectivas sequências de nucleotídeos. Os programas utilizados na amplificação bem como as concentrações dos reagentes utilizados nas reações da PCR foram aqueles apresentados pelos respectivos autores, também apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Iniciadores utilizados:

Nome	Sequência 5' – 3'	Gene Alvo	Produto (bp)	Referência
HiP6	ACTTTTGGCGTTACTCTGT TGTGCCTAATTTACCAGCAT	P6	273	Van Ketel <i>et al.</i> (1990)
Hi	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC TGATGAGGTGATTGCAGTAGG	<i>bex A</i>	343	Van Ketel <i>et al.</i> (1990)
Hia	CTACTCATTGCAGCATTTC GAATATGACCTGATCTTCTG	<i>acs</i>	250	Falla <i>et al.</i> , 1994
Hib	GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA	<i>bcs</i>	480	Falla <i>et al.</i> , 1994
Hic	TCTGTGTAGATGATGGTTCA CAGAGGCAAGCTATTAGTGA	<i>ccs</i>	250	Falla <i>et al.</i> , 1994
Hid	TGATGACCGATAACAACCTGT TCCACTCTTCAAACCATTCT	<i>dcs</i>	150	Falla <i>et al.</i> , 1994
Hie	GGTAACGAATGTAGTGGTAG GCTTTACTGTATAAGTCTAG	<i>ecs</i>	1350	Falla <i>et al.</i> , 1994
Hif	GCTACTATCAAGTCCAAATC CGCAATTATGGAAGAAAGCT	<i>fcs</i>	450	Falla <i>et al.</i> , 1994
Pbp-Ubu	GTTGCACATATCTCCGATGAG CAGCTGCTTCAGCATCTTGC	PBP-3	1050	Ubukata <i>et al.</i> , 2001
ROB-San	TCCCGAAACCCAAAAATACG GATTGCCTGTTGCGTIATTG	<i>bla_{ROB}</i>	337	Sanbogi <i>et al.</i> , 2006
ROB-Tem	ATCAGCCACACAAGCCACCT GTTTGCATTTGGTATGCGA	<i>bla_{ROB}</i>	692	Tenover <i>et al.</i> , 1994
TEM- Tem	TGGGTGCACGAGTGGGTTAC TTATCCGCCTCCATCCAGTC	<i>bla_{TEM}</i>	526	Tenover <i>et al.</i> , 1994
Bla-Rob	CATTCGGTAAACGTCTAATCC TCTTCGGTAAATTGCGTACT	<i>bla_{ROB}</i>	740	Este trabalho

Na reação da PCR, para a detecção do gene *bla_{ROB}*, utilizou-se os iniciadores específicos (*bla_{ROB}* e *bla_{ROB2}*). Foi utilizado um volume total de 25 µL, sendo constituído de: 2,5µl de tampão (10mM), 1,0 µl dNTP (10mM), 2,0 µl MgCl₂ (50mM), 0,2 µl de *Taq* polimerase (2U), todos estes do kit Invitrogen- *Taq* DNA Polymerase, mais 1 µl de cada iniciador (50pmol) e 2,0µl de DNA genômico. As etapas da PCR foram desenvolvidas da seguinte forma: 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR com 740pb foram analisados em um gel a 1% de agarose (Sigma Aldrich, MO, USA) contendo 0,5 µg/mL brometo de etídio (Promega) e submetido a eletroforese por 1 hora a 100V, utilizando como marcador de peso molecular o 100bp Ladder (Invitrogen).

As amostras que não apresentaram na reação da PCR os genes da beta-lactamase foram submetidas à amplificação e posterior sequenciamento do gene PBP3 para determinar se o mecanismo de resistência dessas cepas era por possíveis alterações neste gene. As amostras que apresentaram bandas em alturas diferentes da esperada após a amplificação do gene *bla_{ROB}*, também foram submetidas ao sequenciamento do gene PBP3.

3.8.4 Sequenciamento

Após amplificação pela PCR dos DNAs dos isolados, os produtos foram quantificados e suas concentrações ajustadas para 200 ng/µL. Utilizou-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* e a reação de sequenciamento, para cada gene específico, foi constituída de 5,5 µL de DNA (200ng), 2 µL dos respectivos iniciadores (1,6 pmol/µL), 1 µL de reativo BigDye (Applied Biosystems), 1,5 µL de tampão BigDye, num volume final de 10 µL. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador ApolloTMATC 401 com as seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A seguir, o produto das reações foi precipitado adicionando-se a cada poço 30 µL de isopropanol 75%. A placa foi levada ao vortex e submetida a um “spin” por 10 segundos a 1000 rpm. A placa ficou em repouso sob proteção da luz por 15 minutos. A placa foi centrifugada por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de isopropanol. Adicionou-se 50 µL de etanol 75% em cada poço. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. O

sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de etanol. A placa foi colocada invertida na centrífuga e deu-se um pulso até 500 rpm. A placa foi deixada à temperatura ambiente, protegida da luz, por 2 horas para secar. Após, o DNA presente no poço da placa, foi ressuscitado em 5,5 µL de água (GIBCO®). Deixou-se em repouso por 1 hora e agitou-se no vortex.

Após, a placa foi encaminhada para o setor de sequenciamento para a reação de desnaturação. A reação de sequenciamento foi realizada segundo metodologia padrão, por eletroforese capilar em um aparelho ABI Prism 3700 Genetic Analyzer Sequencer (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E PERFIL DOS PARTICIPANTES

Foram isoladas três colônias de cada placa das crianças, identificadas inicialmente pelo aspecto morfológico e, após a confirmação pelos testes fenotípicos, genotípicos e de susceptibilidade aos antimicrobianos, aquelas que apresentaram as mesmas características, tais como: resultados semelhantes no teste de SAL, na identificação de biotipos, resistência às mesmas drogas no antibiograma, receberam a mesma identificação.

Após os resultados das provas fenotípicas, a partir de 57 de um total de 73 swabs coletados das crianças (78,08%) foram identificadas como *Haemophilus influenzae*. Nos materiais coletados das 16 crianças restantes do grupo, não foram obtidos crescimentos sugestivos de Hi. Foram isolados micro-organismos frequentes na microbiota do trato respiratório, porém após a realização da coloração do Gram, provas bioquímicas e exigências dos fatores V e X, foram identificadas como não Hi, portanto não consideradas de interesse neste estudo.

Das 73 crianças participantes do estudo, 39 são do sexo masculino e 34 feminino e a taxa de colonização por sexo foi de 79,5% e 82,3% respectivamente.

A Tabela 7 mostra a colonização da nasofaringe quanto à faixa etária.

Tabela 7 - Faixa etária das crianças estudadas portadoras de Hi

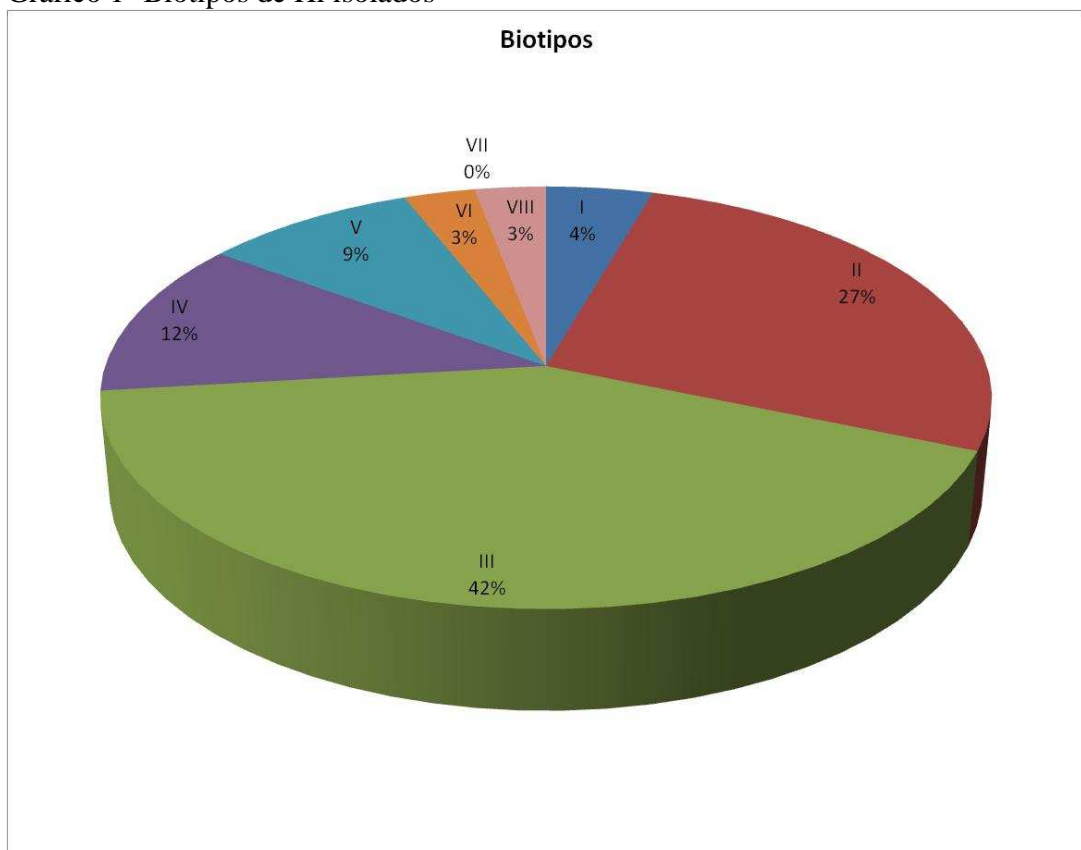
Faixa etária:	Nº crianças	Portadoras (%)
De 24 a 36 meses	15	12 (80%)
De 37 a 48 meses	16	13 (81%)
De 49 a 60 meses	27	19 (70%)
Acima de 61 meses	15	13 (86%)
Total	73	57 (78%)

Tabela 8 - Número de colônias diferentes Hi de acordo com a classificação fenotípica ou susceptibilidade aos antimicrobianos

Nº de crianças (N=57)	Colônias diferentes	Total de isolados
48	01	52
08	02	12
01	03	03
Total (57)	-	67

O Gráfico 1 apresenta os resultados da classificação dos biotipos, obtidos a partir da combinação de resultados de provas de indol, urease e ornitina.

Gráfico 1- Biotipos de Hi isolados



4.2 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DILUIÇÃO EM AGAR

O teste de susceptibilidade foi realizado em todos os 67 isolados de Hi, utilizando-se discos dos 11 antimicrobianos. Os percentuais de resistência observados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resistência aos antimicrobianos em isolados de Hi.

Antimicrobianos	Amostras resistentes/ N total		
	AD	R	CIM/Etest/% I
Amoxicilina+Ácido clavulânico (20/10 µg)	1/67	0/67	0/67
Ampicilina (10 µg)	33/67 (49,2%)	33/67 (49,2%)	0/67
Azitromicina (15µg)	0/67	Não realizado*	Não realizado*
Ceftriaxona (30 µg)	0/67	Não realizado*	Não realizado*
Cloranfenicol (30 µg)	0/67	Não realizado*	Não realizado*
Ciprofloxacina (5 µg)	0/67	Não realizado*	Não realizado*
Meropenem (10 µg)	0/67	Não realizado*	Não realizado*
Rifampicina (5 µg)	0/67	Não realizado*	Não realizado*
Sulfametoxazol+trimetoprim (1,25/23,75 µg)	45/67(67,1%)	37/67 (55,2%)	8/67 (12%)

AD: ágar diluição R: resistente I: intermediário N: número de amostras

* somente cepas sensíveis

O maior percentual de resistência observado entre os isolados de Hi foi o de sulfametoxazol + trimetoprim (SUT). Quanto ao método diluição em agar, 45 isolados das 67 (67,2%) cepas estudadas apresentaram resistência a esse antimicrobiano. Ao ser realizado o Etest, oito destas cepas foram classificadas como intermediárias e as 37 restantes confirmaram a resistência.

Quanto à ampicilina, 33 dos 67 isolados (49,25%) se mostraram resistentes. Vinte e oito amostras (41,8%) eram resistentes aos dois antimicrobianos, conforme a Tabela 10. Apenas uma amostra apresentou resistência à amoxicilina + ácido clavulânico, porém não foi confirmada pelo método de Etest, em que amostra apresentou sensibilidade à droga.

Tabela 10 - Amostras de Hi resistentes a dois tipos de antimicrobianos.

Antimicrobiano	N (%)
Ampicilina	33 (49,25%)
SUT	45 (67,2%)
Ampicilina e SUT	28 (41,8%)

SUT: Sulfametoxazol + trimetoprim

Durante a entrevista, os pais/responsáveis de oito crianças relataram o uso de antimicrobianos na época ou até seis meses anteriores à coleta. Destas, apenas uma não apresentou colonização por Hi. As outras sete crianças deste grupo estavam colonizadas por Hi e todas elas apresentaram resistência a pelo menos uma droga. A Tabela 11 apresenta os antibióticos usados pelas crianças e a resistência apresentada no antibiograma.

Tabela 11 - Crianças que estavam/estiveram em uso de antimicrobianos.

Amostra	Medicamento	AMP	SUT
012	*Ampicilina	R	R
013	*Sulfametoxazol+trimetoprim	R	R
031	Amoxicilina	R	R
034	Amoxicilina	NP	R
037	Amoxicilina	NP	NP
050	Sulfametoxazol	R	R
56	Amoxicilina	R	R
061	*Sulfametoxazol+trimetoprim	R	R

*Antimicrobiano usado nos últimos 6 meses AMP- ampicilina SUT: sulfametoxazol+trimetoprim
R: resistente S: sensível NP: não portador

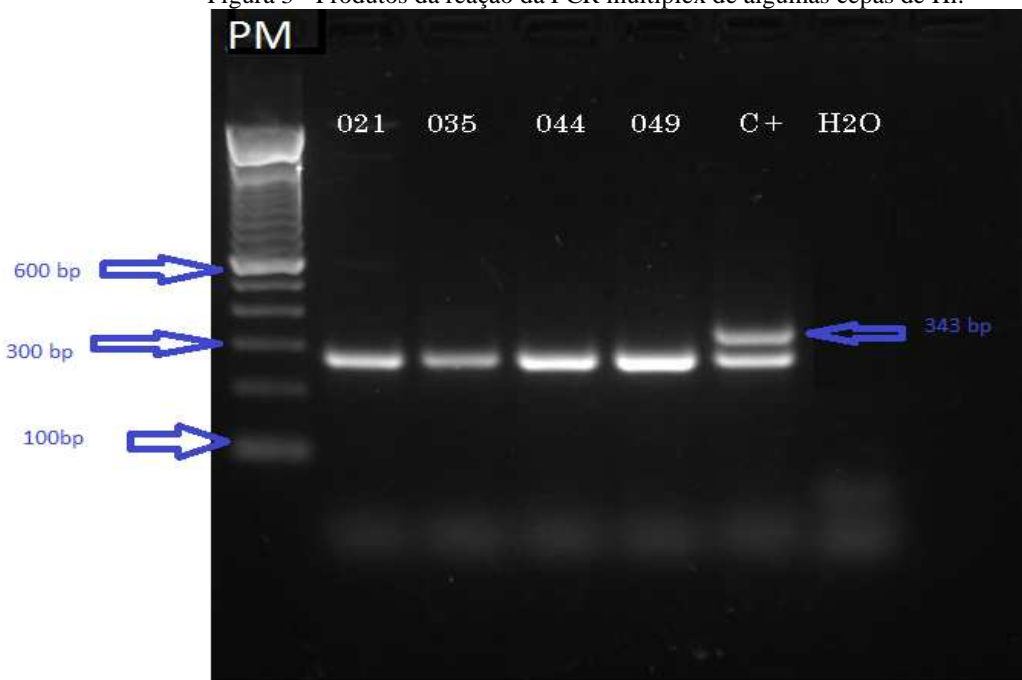
4.3 PESQUISA DE β -LACTAMASE

Das 33 amostras que apresentaram resistência à ampicilina, 27 (81,8%) foram produtoras de β -lactamase e classificadas como BLPAR (β -lactamase positivo ampicilina resistente) e as seis amostras não eram produtoras da enzima, classificadas como BLNAR (β -lactamase negativo ampicilina resistente).

4.4 PESQUISA DOS GENES *P6* e *bexA*

As amostras classificadas fenotipicamente como Hi foram submetidas à pesquisa do gene *P6* e do *bexA*, cujas presenças indicam a espécie e presença da cápsula respectivamente. Em todas as amostras foi encontrado o gene *P6*. A Figura 3 apresenta os produtos da reação de PCR multiplex de quatro amostras, em que todos amplificaram apenas o gene *P6*, já o *bexA* foi amplificado apenas na amostra controle. Este resultado foi encontrado em todas as reações de PCR das amostras. Somando-se estes resultados aos resultados dos testes fenotípicos, todos os isolados foram classificados com HiNT. Na pesquisa de amostras do tipo b⁻ ou a⁻ não foi encontrado amostra positiva para esta particularidade.

Figura 3 - Produtos da reação da PCR multiplex de algumas cepas de Hi.



Eletroforese em gel de agarose a 1% (1x TBE) com produto da reação da PCR de cepas de *H. influenzae*. (PM) / TM: tamanho molecular 100bp. 021, 035, 044, 045: cepas de Hi. Controle (C+) ATCC 10211 (Hib) ampliações para o gen P6 e *bexA*..

4.5 DETECÇÃO DOS GENES DA RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS

Todas as amostras resistentes à ampicilina foram submetidas a PCR para pesquisa dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{ROB}. A Tabela 12 apresenta as características das amostras resistentes à ampicilina, associadas com a produção da enzima β -lactamase e os resultados da pesquisa dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{ROB} e PBP pela PCR. O gene *bla*_{TEM} foi detectado em 29 amostras (87,8%).

A Tabela 12 também apresenta o perfil das seis amostras β -lactamase negativas ampicilina resistentes (BLNAR) em que, quatro (021, 034-4, 062-2, 072) apresentaram o gene *bla*_{TEM} e duas amostras (015 e 030) não amplificaram este gene. Duas amostras (030 e 062-2) amplificaram o gene *bla*_{ROB}, porém na altura 1100bp (acima do esperado), sendo realizado o sequenciamento.

Das 27 amostras β -lactamase positivo ampicilina resistente (BLPAR) 25 apresentaram o gene *bla*_{TEM}. Os produtos das duas amostras (026-3 e 031-2) que não apresentaram o gene, foram purificados e em seguida o sequenciados. Para o PBP3 o detalhamento do encontrado estão nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Perfil das amostras resistentes à ampicilina

Isolados	β -lac	SUT	Pesquisa de genes		
			Bla-TEM	Bla-ROB	PBP3
002(1)	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
003	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
006	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
007	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
09(2)	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
010	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
011	Positivo	Sensível	Positivo	Negativo	Positivo
013	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
015	Negativo	Sensível	Negativo	Negativo	Positivo
016	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
017	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
020	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
021	Negativo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
022	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
026 (1)	Positivo	Sensível	Positivo	Negativo	Positivo
026 (3)	Positivo	Resistente	Negativo	Negativo	Positivo
030	Negativo	Sensível	Negativo	Negativo	Positivo
031 (1)	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
031 (2)	Positivo	Resistente	Negativo	Negativo	Positivo
034 (3)	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
034 (4)	Negativo	Sensível	Positivo	Negativo	Positivo
035	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
044	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
045	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
047	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
049	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
051	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
056	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
062 (2)	Negativo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
064	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
067	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
071	Positivo	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo
072	Negativo	Sensível	Positivo	Negativo	Positivo

SUT: sulfametoxazol+trimetoprim

Amp: ampicilina

4.6 SEQUENCIAMENTO

As seis amostras BLNAR e as duas BLPAR (026-3 e 031-2) que não apresentaram o gene *bla_{TEM}* foram sequenciadas para estudar uma possível alteração na proteína PBP3.

As amostras 030 e 062-2 também foram sequenciadas com o iniciador *bla_{ROB}* para se observar possíveis alterações na sequência de nucleotídeo ou presença de elemento de inserção no gene *bla_{ROB}*.

A Tabela 13 apresenta o resultado do sequenciamento. Das seis amostras BLNAR, quatro apresentaram alterações nas sequências de nucleotídeos referente a proteína PBP3. A amostra 021 apresentou quatro alterações, nas posições 377, 522, 526 e 547, enquanto que a amostra 015 apresentou uma alteração na posição 422. Na posição 547 também houve alteração na sequência das amostras 034-4 e 030.

Tabela 13 - Alterações de aminoácidos detectadas no sequenciamento do gene PBP3 de 13 amostras

Amostra	Presença dos genes					Substituição de aminoácidos					
	MIC	Amp	β -lac	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{ROB}</i>	273	377M	422	522A	526	547V
008	ND	S	ND	ND	ND	--	--	--	--	--	--
018	ND	S	ND	ND	ND	--	--	--	--	--	--
003	>64	R	+	+	-	--	--	--	--	--	--
006	>64	R	+	+	-	--	--	--	--	--	--
026-3	>64	R	+	-	-	--	--	--	--	--	--
031-1	>64	R	+	+	-	--	--	--	--	--	--
031-2	>64	R	+	-	-	--	--	--	--	--	--
062-2	>64	R	-	+	-	--	--	--	--	--	--
030		R	-	-	-	F	--	--	--	--	I
021	>64	R	-	-	-	--	I	--	V	K	I
015	>64	R	-	-	-	--	--	S	--	--	--
034-4		R	-	+	-	--	--	--	--	--	I
072		R	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: não determinada R: resistente β -lac: presença de β -lactamase A: alanina F: fenilalanina I: isoleucina K: lisina M: metionina N: asparagina S: serina V: valina

As sequências de DNA utilizadas para pesquisar alterações na PBP3 foram depositadas no Gen-Bank sob os números de acessos: KC831771-KC831774.

5 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. Entre os produtos de interesse para a saúde, destacam-se as vacinas utilizadas no Brasil através do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde, que inclui a aplicação da vacina contra Hib.

Após 13 anos do início da vacinação com a vacina conjugada contra o Hib consideramos necessário e relevante o estudo com crianças que tiveram a vacinação completa, no sentido de avaliar a situação pós-vacinação em relação às cepas atualmente presentes em populações suscetíveis, como as crianças que frequentam ambientes coletivos como creches. Estudos nestas condições são raros. Em nosso país os dados publicados são escassos, o que nos deixa ávidos por essas informações (SILVA *et al*, 2004; MARIN & SILVA, 2005; JOURDAIN, S. *et al.*, 2011).

Em função da carência de informações, principalmente na região nordeste do Brasil, optou-se então em estudar uma creche na Bahia, cidade de Jacobina, povoado de Cachoeira Grande. Coletou-se amostras de todas as crianças de apenas uma creche por questão de logística. Tratava-se de um povoado distante do laboratório de apoio, onde seriam realizadas apenas as etapas iniciais: semeadura das placas, incubação com visualização do primeiro crescimento microbiano e passagem para nova placa de meio de cultura, porém sem bacitracina. Os testes de identificação e confirmação dos micro-organismos foram realizados no Rio de Janeiro (INCQS).

Foi encontrado um percentual de 78,08% de portadores de Hi na população estudada, dado de acordo com o estudo realizado em Ribeirão Preto, que relatou 72% de portadores em crianças, também frequentadoras de creches (SILVA *et al*, 2004). A aglomeração pode ser considerada um importante fator de risco, já que as crianças ficam mais expostas e este fator pode explicar as taxas elevadas de colonização encontradas neste e também em outros trabalhos (MASUDA *et al.*, 2002; SULIKOWSKA *et al.*, 2004). Apesar de não ter sido abordado o fator situação econômica durante a entrevista, ficou evidente que as crianças estudadas pertencem à

famílias de classe econômica baixa e que, em sua maioria convivem com irmãos não vacinados, o que pode ter contribuído para colonização por Hi.

O uso da vacina contra o Hib é considerado um marco na saúde pública de todo mundo, já que no período pós-vacinal, o índice de doenças causadas pelo micro-organismo diminuiu drasticamente nos países que incluíram a vacina em seus calendários de imunização. No presente estudo, 100% das cepas isoladas foram caracterizadas como HiNT. A ausência de colonização do Hib, que é o sorotipo ao qual a vacina oferece proteção, neste e em outros trabalhos reforça a eficácia da vacina contra o Hib (DABERNAT, 2003).

A colonização da nasofaringe humana é considerada o primeiro passo na série de eventos que resultam na infecção por *H. influenzae* e em uma doença invasiva. A predominância de colonização pelo HiNT encontrada neste e em outros trabalhos realizados em creches ressalta a importância da vigilância dos casos de infecções e/ou colonização deste micro-organismo (SULIKOWSKA *et al.*, 2004; CASTILLO-FEBRES *et al.*, 2005; BARBOSA-CESNIK *et al.*, 2006). Considerando-se a importância da colonização para o desenvolvimento da doença, verifica-se uma crescente preocupação com relação às cepas não capsuladas, isto porque se refere a um importante patógeno de doenças respiratórias ao longo dos anos, cujo número de casos de doenças causadas pelo NT tem aumentado consideravelmente. Em estudo realizado na Eslovênia, observou-se um aumento de 12% (no período pré-vacinal) para 85,2% (pós-vacinal) dos casos de doenças causadas por este micro-organismo (KASTRIN *et al.*, 2010). Em outro estudo realizado com crianças com bronquite, dos Estados Unidos, foram isoladas HiNT em 49% das amostras (ZGHEREA *et al.*, 2012). Além disso, já existem relatos da associação do HiNT com a forma mais grave da doença, a meningite, como descreveram Zanella e colaboradores (2011) com amostras de CSF de um centro de referência nacional, onde foi observado um aumento de meningite causada por HiNT, passando de 13 isolados no período de 2000-2002, para 64 (2006-2008).

Reforçando esta questão, a inclusão em 2010 pelo PNI/MS, no esquema de vacinação das crianças brasileiras, da vacina PHiD-CV, onde o HiNT fornece a proteína carreadora, merece considerações. Trata-se de proteção contra um dos principais patógenos da OMA, *S. pneumoniae*. Porém a presença da proteína do HiNT deverá contribuir para a diminuição das infecções onde o Hi aparece como agente infeccioso. Já existem relatos que correlacionam este micro-organismo com doenças invasivas, inclusive meningites e septicemia conforme já citado (ITO *et al.*, 2011).

Observamos que as crianças participantes deste trabalho não receberam a vacina antipneumocócica, pois não tinham a faixa etária sugerida na época da introdução da mesma no calendário de vacinação brasileiro. Portanto, é possível que a prevalência de colonização de Hi em crianças tenha diminuído nos últimos anos, tanto por causa da vacina PHiD-CV, que oferece imunização contra HiNT, quanto pela imunidade de rebanho conferida pelas vacinas conjugadas, o que nos sugere um estudo posterior para avaliar o impacto da vacina, tendo como referência crianças que frequentam creches.

Os sorotipos *Haemophilus influenzae* não b, incluindo o HiNT, raramente eram causadores de infecções invasivas (NIZET, 1996). Porém, este cenário sem dúvida sofreu alteração no Brasil e no mundo (DE ALMEIDA et al., 2010, ADAM et al, 2010; CALDEIRA et al, 2013). Nossos resultados demonstraram o incremento dos HiNT na população microbiana das crianças vacinadas, o que certamente poderá contribuir para infecções graves com estes microorganismos.

Outras características foram investigadas para identificar/confirmar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da doença. O principal deles é a relação idade/colonização (WARD et al. 1986; TAKALA 1989; MURPHY et al. 1989; MARIN & SILVA, 2005) que não foi observado neste trabalho, já que a taxa de colonização foi homogênea em todas as faixas etárias das crianças estudadas. É importante ressaltar que a faixa etária mais afetada, segundo estes autores, é a de crianças com idade inferior a dois anos, porém na creche estudada não é frequentada por crianças com essa idade (MARIN & SILVA, 2005).

A colonização de 72,7% e 74,07% das crianças do sexo masculino e feminino respectivamente, não caracteriza diferença significativa de colonização entre os sexos, estando de acordo com o estudo realizado em Taubaté-SP por BRICKS e colaboradores (2004).

A biotipificação, utilizando métodos fenotípicos, constitui uma das ferramentas utilizadas para pesquisas epidemiológicas nos Hi conforme relatos da literatura. 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, de Almeida et al, 2005). Um dos trabalhos pioneiros nesta área com cepas brasileiras, concluiu que há uma associação entre os biotipos I com o sorotipo b (LANDGRAF & VIEIRA, 1993). Em nossos resultados, o biotipo III foi o mais prevalente, seguido do biotipo II, estando de acordo com o trabalho de DABERNAT (2002), sobre isolados clínicos da França. Eles obtiveram maior prevalência entre os biotipos II e III respectivamente. Um dos poucos relatos

publicados com dados obtidos de creches brasileiras, o estudo de Silva e colaboradores (2006) realizado na cidade de Ribeirão Preto-SP, revela que os biotipos I e II foram os mais prevalentes.

Outro dado importante analisado foi o uso de antimicrobiano na época ou até seis meses antes da coleta. Das oito crianças que usaram algum antimicrobiano, cinco apresentaram resistência a sulfametoxazol+trimetoprim e à ampicilina, apenas uma não era portadora de Hi. Estes resultados nos levam a sugerir que o uso de antimicrobianos por muito tempo, pode contribuir e até implementar a seleção de cepas resistentes.

Os resultados dos ensaios de susceptibilidade (diluição em agar e CIM) com os antibióticos: azitromicina, ceftriaxona, cloranfenicol, meropenem, amoxicilina+ácido clavulânico, fluoroquinolonas (levofloxacina e ciprofloxacina) e rifampicina demonstraram alta atividade *in vitro* contra *H. influenzae*, podendo portanto, servir como base para a escolha do tratamento de infecções causados por este micro-organismo. Em contrapartida, mostram que *H. influenzae* apresenta alta resistência à ampicilina e sulfametoxazol+trimetoprim.

O alto índice de amostras resistentes à sulfametoxazol+trimetoprim (67,2%) confirma os resultados encontrados em isolados de Hi recuperados durante o período 1998-2004, em estudo realizado com 718 amostras de várias regiões do Brasil (São Paulo, Florianópolis, Porto Alegre, e Brasília) (CASTANHEIRA *et al.*, 2006). As altas taxas de resistência parecem ser atribuídas à elevada utilização deste agente para o tratamento de infecções respiratórias no Brasil, comuns em crianças, hipótese apoiada pelo fato de trimetoprim/sulfametoxazol ser de baixo custo no Brasil, além de ter um regime de dosagem simples (CASTANHEIRA *et al.*, 2006).

Após o emprego da vacina conjugada contra o Hib, diversos autores confirmaram que houve aumento de infecções pelos sorotipos não b, incluindo os não tipáveis, estes classicamente responsáveis pelas infecções do trato respiratório (ITR). Estudos de quase uma década, já mostram, que a resistência aos antimicrobianos envolvidos nas infecções do ITR, sobretudo nos de administração oral, necessitavam de uma reavaliação no emprego dos mesmos. Estudos com cepas brasileiras de Hi descrevem a mudança do perfil de resistência da associação sulfametoxazol-trimetoprim de 32,6% para 65,8% dos isolados (DE ALMEIDA *et al.*, 2006).

Andrade e colaboradores (2001) citam que a OMS e os Ministérios da Saúde de países da América Latina ainda recomendam o sulfametoxazol+trimetoprim, como droga de primeira linha pelo baixo custo e fácil dosagem, o que favorece o tratamento empírico da maioria das ITR, incluindo pneumonia. Estes mesmos autores mostraram o número crescente de cepas resistentes,

através de pesquisas com pacientes com infecção por HIV que fizeram uso rotineiro da associação sulfametoxazol+trimetoprim, o que pode ter potencialmente contribuído para a elevação no índice da resistência das cepas de Hi isoladas nas infecções respiratórias.

O estudo da resistência à ampicilina é de grande importância, já que por muitos anos esta droga foi a primeira opção para tratamento de meningites. Sendo assim, esclarecer sua efetividade é fundamental para se evitar uso desnecessário e disseminação da resistência. Neste trabalho, 49,25% dos isolados apresentaram resistência à ampicilina, valores acima dos encontrados no trabalho de Zanella e colaboradores em 2011, que encontraram resistência de 22% em 860 cepas estudadas e o grupo de Hashida (2008) que encontrou 37,2% amostras resistentes, de um total de 363 amostras. Nestes dois estudos, todas as amostras resistentes eram produtoras de β -lactamases.

Estudos de quase uma década, já mostravam que a 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, necessitavam de uma reavaliação no emprego dos mesmos. Esta observação ficou confirmada, por diversos autores, que após o emprego da vacina conjugada contra o Hib, com o aumento de infecções pelos sorotipos não b, incluindo os não tipáveis, estes classicamente responsáveis pelas ITR. Estudos com cepas brasileiras de Hi descrevem a mudança do perfil de resistência da associação sulfametoxazol-trimetoprim de 32,6% para 65,8% dos isolados (DE ALMEIDA et al., 2006).

Neste trabalho observamos que além da alta resistência à ampicilina, o principal mecanismo envolvido foi a produção da enzima β -lactamase observada em 81,8% das amostras resistentes a esse fármaco. Além disso, detectou-se o gene *bla*_{TEM} em 87,8% das amostras, confirmando os resultados do estudo de Karlowsky e colaboradores no Canadá (2000), que encontraram o índice de 90,7%. Resultados semelhantes também foram encontrados por Farrell e colaboradores, em 2005, com isolados de Hi de vários países, incluindo o Brasil, onde encontraram média de 93,7% cepas positivas para o gene *bla*_{TEM}.

O gene *bla*_{ROB} foi pesquisado utilizando três pares de iniciadores devido à dificuldade de ajuste do programa e à falta de um controle positivo. Utilizando-se os iniciadores Rob-SAN (SANBOGI et al., 2006) e Rob_{TEM} (TENOVER et al., 1994), seguindo-se os programas de PCR disponibilizados por seus respectivos descritores, não conseguimos encontrar resultados positivos. Foi então necessário desenhar outro par de iniciadores (*bla*_{ROB}). Na PCR utilizando

este último par de iniciadores, observou-se que duas amostras apresentaram amplificação, porém em altura diferente daquela encontrada em teste *in silico*. Para esclarecer se a banda amplificada era produto do gene com algum elemento de inserção, os amplicons dessas amostras foram sequenciados. Os resultados do sequenciamento mostraram que o fragmento amplificado não era o gene *bla_{ROB}*, concluindo que as bandas amplificadas eram inespecíficas, já que não houve similaridade da sequência das amostras com as dos banco de dados. A ausência do gene *ROB* pode ser confirmada com a ausência de cepas resistentes à ceftriaxona correlacionados em alguns estudos (KARLOWSKY, 2000)

As amostras BLNAR foram sequenciadas para se investigar possíveis alterações na PBP3. A alteração na PBP3 foi encontrada em quatro amostras. A Tabela 13 mostra os aminoácidos e locais de substituições. Esta observação pode sugerir que o mecanismo de resistência à ampicilina dessas cepas, não é a produção da enzima β -lactamase, mas a alteração na proteína PBP3 interferindo na afinidade dos beta-lactâmicos pelo micro-organismo e conseqüentemente, reduzindo a efetividade da droga. As amostras 062-2 e 072, também pertenciam ao grupo do BLNAR, mas nessas amostras o provável mecanismo de resistência é o gene *bla_{TEM}*, já que as duas apresentaram o gene e não apresentaram alteração na PBP3.

A susceptibilidade aos diferentes β -lactâmicos parece ser afetada por uma ou múltiplas substituições em posições específicas (CERQUETTI, 2007). Neste trabalho, houve uma alteração incomum. Observou-se uma substituição do aminoácido 547V por 547I, encontrada em três amostras, 021, 030, e 034-4. Alteração também encontrada nos trabalhos de Kubota et al colaboradores (2006), Cerquetti et al (2007) e Skaare et al (2009). Além desta alteração (posição 547), a amostra 021 apresentou outras alterações: a substituição de aminoácidos nas posições 377 e 526 já descritas por Ubukata e colaboradores em 2001 e, posteriormente observadas por Osaki (2005), Kubota (2006) e Shaare e colaboradores (2009). Esta mesma amostra também apresentou outra alteração na posição 522, onde uma alanina (A) foi substituída por uma valina (V) que não foi observada nas publicações anteriores, porém em conjunto com as outras mudanças, pode ter contribuído para resistência à ampicilina.

A amostra 015 apresentou uma substituição na posição 422 de uma asparagina (N) por uma serina (S), não observada nos trabalhos da área publicados até o momento. Esta mudança na PBP3 também pode ter induzido a resistência à ampicilina, já que essa amostra não apresentou o gene *bla_{TEM}*.

Dessa forma, o estudo com cepas de portadores vacinados com a vacina conjugada contra Hib, deverá contribuir para monitorar as possíveis alterações na prevalência dos sorotipos de Hi, a frequência destes nos casos infecciosos, o perfil da resistência aos antimicrobianos e certamente na estimativa do impacto da vacina contra o Hib no Brasil.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:

6.1 CONCLUSÕES

A prevalência de crianças portadoras de *Haemophilus influenzae* foi de 78,08%, todas HiNT, o que demonstra que creches representam um importante fator de risco, já que além de encontrar uma alta taxa de colonização, houve homogeneidade quanto aos sorotipos, sugerindo que a aglomeração pode contribuir para a disseminação do micro-organismo. Portanto, torna-se necessária a prevenção da colonização e, conseqüentemente de doenças causadas pelo micro-organismo.

A ausência de isolados de sorotipos b neste trabalho, somando-se aos resultados encontrados por outros autores, confirmam a eficácia da vacina contra o Hib.

A maioria dos antimicrobianos indicados no tratamento de doenças causadas pelo Hi apresentou eficiência nos testes *in vitro*, portanto, continuam sendo uma boa opção para tratamento dessas doenças.

A determinação da susceptibilidade pelo MIC permitiu observar que a maioria dos isolados apresentou resistência à ampicilina e a sulfametoxazol + trimetoprim, portanto, é necessária vigilância da susceptibilidade destes fármacos, já que são indicados constantemente no tratamento de outras infecções.

O principal mecanismo de resistência apresentados pelas cepas estudadas foi a produção de β -lactamase presente na maioria das cepas resistentes à ampicilina e confirmada a presença do gen *bla_{TEM}*, encontrado em 87,8% destas amostras.

O mecanismo de resistência observado nas amostras BLNAR foi por alterações na PBP3 ou pela presença do gen *bla_{TEM}*.

O gen *bla_{ROB}* não foi evidenciado nas amostras testadas.

O tratamento de infecções causadas pelo Hi, o estudo dos mecanismos de resistência e a susceptibilidade das cepas devem ser analisados nos laboratórios clínicos e de pesquisa, já que medicamentos que antes eram considerados opções para tratamento de doenças causadas pelo Hi têm apresentado resistência, indicando a necessidade de vigilância contínua e medidas para restringir o uso de antibióticos desnecessários.

Desta forma, o presente trabalho que agora concluímos, com o alcance dos objetivos propostos, deve ser considerado como contribuição para a Saúde Pública, sobretudo por ter estudado crianças imunizadas com a vacina contra o Hib numa população fechada (creche) em uma cidade do Nordeste brasileiro (Jacobina), o que coloca nossos resultados como pioneiros no tema proposto e abordado naquela região do Brasil.

6.2 PERSPECTIVAS

- Realizar nova pesquisa envolvendo maior número creches, utilizando dados estatísticos, especificamente de amostragem estratificada com crianças de áreas diferentes, avaliando a colonização de Hi e também de *S. pneumoniae*.
- Realizar estudos com casos clínicos de otites, em crianças vacinadas com a vacina PCV-10 para observações da frequência dos isolados, bem como a susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento da infecção.

REFERÊNCIAS:

- ADA, G, ISAACS, D. Carbohydrate–protein conjugate vaccines, **Clin Microbiol Infect.** 9: 79–85, 2003.
- ADAM, H.J. *et al.* Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontario, Canada: evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. **Vaccine** 28(24):4073-8, 2010.
- ADAMS, W.G. *et al.* Decline in childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. **JAMA** 269:221–226, 1993.
- ADDERSON *et al.* Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics*, v.108, n.1, p.E18.2001.
- 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**, p 153-156, 1991.
- ANDRADE, A.L.S.S, BRANDILEONE, M.C., DI FABIO, J.L. *et al.* *Haemophilus influenzae* resistance in Latin America: Systematic review of surveillance data. *Microb Drug Resist* 7:403–11, 2001.
- ANIANSOON, G. *et al.* Nasopharyngeal colonization during the first year of life. **The Journal of Infectious Diseases.**165 (suppl 1):38-42, 1992.
- ARACIL, B.; CAMPOS, J. Reciente incremento de los fallos vacunales por *Haemophilus influenzae* serotipo b. **Enferm Infec Microbiol Clin** 21:383 – 385, 2003.
- BARBOSA-CESNIK, S.S. *et al.* Predictors for *Haemophilus influenzae* colonization, antibiotic resistance and for sharing an identical isolate among children attending 16 licensed day-care centers in Michigan. **Pediatr Infect Dis J.** 25:219-223. 2006.
- BATALHA, A. *et al.* Changes in *Haemophilus influenzae* capsule locus: possible emergence 2 of novel variants in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v.68, n. 2, p.97– 102. 2010.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45: 493-496, 1966.
- 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: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/outros/bol_bepa504.pdf. Acesso em: 07 mar. 2011.

BERMAL, N. *et al.* The 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) coadministered with DTPw-HBV/Hib and poliovirus vaccines: assessment of immunogenicity. **Pediatr Infect Dis J.** 28:(Suppl 4): S89-S96, 2009.

BORDERON, J.C. *Haemophilus influenzae*: colonization et infection. **Archives Pediatrics Childhrood.** 2:249-54, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 321 de 26 de maio de 1988. Aprova as normas e os padrões mínimos, que com esta baixam, destinados a disciplinar a construção, instalação e funcionamento de creches, em todo território nacional. **Diário oficial da União, Poder Executivo**, de 9 de setembro de 1988.

BRASIL, Informe Técnico da introdução da vacina pentavalente. Vacina adsorvida difteria, tétano, *pertussis*, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada). Disponível em: www.brasil.gov.br/svs. Brasil, 2012.

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. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, 59(5): 236-243, 2004.

BRYSKIER, A. Epidemiology of Resistance to Antibacterial Agents. In: *Antimicrobial Agents: Antibacterials and antifungals*. Washington, DC: **American Society for Microbiology**. p.39-92, 2005.

BUD NELSON, M. *et al.* Molecular Conservation of the P6 Outer Membrane Protein among Strains of *Haemophilus influenzae*: Analysis of Antigenic Determinants, Gene Sequences, and Restriction Fragment Length Polymorphisms. **Infection and immunity**. p. 2658-2663, 1991.

CALDEIRA, N.G. *et al.* *Haemophilus influenzae* serotype b and a capsule-deficient type mutant (b-) invasive disease in a partially vaccinated child in Brazil. **J Med Microbiol.** 655-7, 2013.

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

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

CANTISANI, M. *et al.*, Peptides complementary to the active loop of porin P2 from *Haemophilus influenzae* modulate its activity. **International Journal of Nanomedicine**, 2012.

CARDINES, R. *et al.* Nontypeable *Haemophilus influenzae* Meningitis in Children: Phenotypic and Genotypic Characterization of Isolates. **Pediatr Infect Dis J** ; 26: 577-582, 2007.

CARVALHO, C.X. *et al.* Carriage of *Haemophilus influenzae* among Brazilian children attending

day care centers in the era of widespread Hib vaccination. **Vaccine** 29 1438–1442. 2011.

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

CASTANHEIRA, M. *et al.* Changing Antimicrobial Susceptibility Patterns among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). **Microbial Drug Resistance**. Vol 12, Number 2, 2006.

CASTILLO-FEBRES, O. *et al.* Oropharyngeal carriers in Venezuelan children in two child care settings, vaccinated or not with *Haemophilus influenzae* type b tetanus toxoid conjugate vaccine (PRP-T). **Invest Clin**. Mar;46(1):15-24, 2005.

CERQUETTI, M. *et al.* First Characterization of Heterogeneous Resistance to Imipenem in Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 3155–3161, 2007.

CHANG, A. *et al.* *Haemophilus influenzae* vaccine candidate outer membrane protein P6 is not conserved in all strains. **Human Vaccines**, 2011.

CSLI M100-S21 (Vol. 31 No.1) - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing–Twenty-First Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2011.

CONNELL, Mc A, *et al.* Invasive infections caused by haemophilus influenzae serotypes in twelve Canadian IMPACT centers, 1996-2001. **Pediatr Infect Dis J**. Nov;26(11):1025-31, 2007.

Copan Diagnostics Inc. “How to Guide for Nasopharyngeal Flocked Swab and UTM”; Murrieta, CA. Disponível em: <http://webserver.paucl.com/wwwdocs/cltm/Specimen%20Handling/Frame.htm>. Acesso em 19/03/2013.

CRIPPS, A. W.; FOXWELL, R.; KYD, J. Challenges for the development of vaccines against *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitidis*. **Curr. Opin. Immunol.**, v.14, p. 553-557, 2002.

CRISEL, R. M.; BAKER, R.S.; DORMAN, D.E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. **J. Biol Chem**, p 492630, 1975.

DABERNAT, H. *et al.* Diversity of β -lactam-resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 46:2208 – 2218, 2002.

DE ALMEIDA A.E.C.C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V.54, n.1, p.57-62, 2006.

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. *et al.* Septic arthritis due to *Haemophilus influenzae* serotype a in the post-vaccination era in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v.57, p.1311-1312, 2008.

DE ALMEIDA, A.E.C.C. *et al.* Urinary tract infection caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the elderly. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 59 no. 9, 2010.

DICKO, A. *et al.* Primary vaccination with the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) in infants in Mali and Nigeria: a randomized controlled trial. **BMC Public Health**. 11:882, 2011.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature - Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire - France. [2011]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso em 28 de outubro de 2012.

FALLA, T.J. *et al.*, Characterization of capsular genes in *Haemophilus influenzae* type b vaccine recipients. **J Infect Dis** 171:1075 – 1076, 1995.

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.

FARRELL, D.J. *et al.* Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 56, 773–776, 2005.

FERREIRA, J. A. S. *et al.* β -Lactamase Production *Haemophilus* spp. and Resistance to Ampicillin in a General Hospital in Porto Alegre City, RS, Brazil (2001-2005). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 11(1):50-52, 2007.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. Bio-manguinhos/fiocruz nacionaliza a vacina Conjugada Hib e passa a produzir mais um imunobiológico 100% brasileiro. [Rio de Janeiro], [2007]. 2p. Disponível em: http://www.fiocruz.br/bio/media/release/Release_nacionalizacao_da_Hib_-_final.pdf. Acesso em: 23 out. 2011.

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.

- FUKASAWA, L.O. Limitações no uso da técnica de contraímunoelctroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b Limitations in the use of counterimmunoelctrophoresis (CIE) for diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b meningitis. **Bepa**. 7(76):4-12, 2010.
- GALDIERO, S. *et al.* Role of surface-exposed loops of *Haemophilus influenzae* protein P2 in the mitogen-activated protein kinase cascade. **Infect Immun**. 71(5):2798–2809, 2003.
- GILSDORF, J.R., MC CREA, K.W. MARRS, C.F. Role of Pili in *Haemophilus Influenzae* Adherence and Colonization. **Infection and Immunity**. v.65, n.8, p.2997- 3002, 1997.
- GINSBURG, C.M. *et al.* *Haemophilus influenzae* type b disease: incidence in a day care center. **JAMA**. 238:604-7, 1977.
- GRANOFF, D.M.; CATES, K.L. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. **J Pediat** 107:330 – 336, 1985.
- GRENNBERG, D. *et al.* Relative Importance of Nasopharyngeal versus Oropharyngeal Sampling for Isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from Healthy and Sick Individuals Varies with Age. **J Clin Microbiol**. 42:4604 – 4609, 2004.
- HARRISON, L.H., BROOME, C.V., HIGHTOWER, M.S. and the *Haemophilus* Vaccine Efficacy Study Grup – *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine: na efficacy study. **Pediatrics**, 84:255, 1989.
- HASHIDA, K. Nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* carriage in Japanese children attending day-care centers. **J Clin Microbiol**. 46:876 – 881, 2008.
- HEATH, P. T. *et al.* Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. **Pediatrics Infectious Disease**, v.20, n.3, p. 300-305, 2001.
- IBGE 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=291750>. Acessado em 20/01/2013.
- ITO, T. *et al.* Meningitis and septicemia caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* in a previously healthy 2-year-old girl. **J Infect Chemother** 17:559–562, 2011.
- JIN, Z. *et al.* *Haemophilus influenzae* Type a Infection and Its Prevention. **Infection and immunity**. p. 2650–2654, 2007.
- JONES, C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. **An. Acad. Bras. de Ciênc**. 77(2): 293-324, 2005.
- JORDENS, R.N.; SLACK, M.P.E. *Haemophilus influenzae*: then and now. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**.v.14, n.11, p.935-948, 1995.

JORGENSEN, J.H.; HOWELL, A.W.; MAHER, L.A. Antimicrobial Susceptibility testing of Less Commonly Isolated *Haemophilus* species Using *Haemophilus* Test Medium. **Journal of Clinical Microbiology**. V.28, n5, p985-988, 1990.

KAPOGIANNIS, B.G. *et al.* Invasive infections with *Haemophilus influenzae* serotype a containing an IS1016-bexA partial deletion: possible association with virulence. *Clin Infect Dis*, v.41, n.11, p.e97-103. 2005

KARLOWSKY *et al.* Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45 871-875, 2000.

KMETZCH, C.I. *et al.* Meningites por *Haemophilus influenzae* b após a implantação da vacina específica. **Journal Pediatrics** .79(6):530-6, 2003.

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

KONEMAN, E.W. *et al.* *Haemophilus*. In: **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI, p.373-396, 2001.

KROLL J.S.; MOXON E.R.; LOYNDS B.M. Na ancestral mutation enhancing the fitness and increasing the virulence of *Haemophilus influenzae* type b. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 168, n.1, p.172-176, 1993.

KUBOTA, T. *et al.*, 2006. Genetic analyses of beta-lactamase negative ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59:36-41, 2006.

LADHANI, S. SLACK, M.P. HEYS, M. *et al.* Fall in *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) disease following implementation of a booster campaign. **Archives Diseases Childhood**, 93(8): 665-9, 2008.

LAGOS, R.; LEVINE, O. AVENDAÑO, A. *et al.* The introduction of routine *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Chile: A framework for evaluating new vaccines in newly industrializing countries. **Pediatric Infection Disease Journal**, 17:S150-60,1998.

LANDGRAF, I. M.; VIEIRA, M.P. Biotypes and serotypes of *H. influenzae* from patients with meningitis in the city of S. Paulo, Brazil. **J Clin Microbiol** 31:743 - 745, 1993.

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

LEVINE, O.S. *et al* Development, evaluation and implementation of *Haemophilus influenzae* type b vaccines for young children in developing countries: current status and priority actions. **Pediatric Infect Disease Journal**.17:95-113; 1998.

- LIMA, J.B. *et al.* Poor clinical outcome for meningitis caused by *Haemophilus influenzae* serotype A strains containing the *IS1016-bexA* deletion. **J Infect Dis.** 1577–1584, 2010.
- 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.
- LOOS, B.G. *et al.* Determination of epidemiology and transmission of nontypable *Haemophilus influenzae* in children with otitis media by comparison of total genomic DNA Restriction Fingerprints. **Infection Immunity** 57:2751-7; 1989.
- LOPES, A.C. **Tratado de clínica médica.** V.3, São Paulo, Roca, 2006.
- MADORE, D. V. Impact of immunization on *Haemophilus influenzae* type b disease. **Infect. Agents Dis.** 5:8–20, 1996.
- MÄKELÄ, P.H., PELTOLA, H.KÄYHTY, H. *et al.*- Polysaccharide vaccines of group A *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b: a field trial in Finland. **J. Infect. Dis.**, 136 (Suppl.): S43, 1977.
- MARIN, J.M.; SILVA, M.E.N.B. Ocorrência de *Haemophilus influenzae* em crianças atendidas em creches. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n.3, p. 167-174, 2005.
- MARRS, C.F. *et al.* *Haemophilus influenzae* – Human Specific Bacteria. **Frontiers in Bioscience.**v.6, p.41-60, 2001.
- MASUDA, K. *et al.* Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. **Pediatrics International**, 2002 44, 376–380
- MENDELMAN, P. M. *Haemophilus* infections In: WENTWORTH, B.B. **Diagnostic Procedures for Bacterial Infections.** 7 ed. Washington, DC: American Public Health Association. Cap. 16, p.301-316, 1987.
- MEATS, E. *et al.* Characterization of encapsulated and non capsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogetic relationships by multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1623-1636, 2003.
- MMWR. 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.

- 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.
- MURPHY, T. F. *et al.* Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a Pathogen in Children. **Pediatr Infect Dis J**; 28: 43–48, 2009.
- MURPHY, T. V. *et al.* *Haemophilus influenzae* type b in respiratory secretions. **Pediatr Infect Dis J** 8:148 – 151, 1989.
- NIZET, V. *et al.* A virulent nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. **The Journal of Infectious Diseases**.173:180-6, 1996.
- NORSKOV-LAURITSEN, N. Detection of cryptic genospecies misidentified as *Haemophilus influenzae* in routine clinical samples by assessment of marker genes fucK, hap and sodC. **J Clin Microbiol**. 13-109, 2009.
- O'CALLAGHAN,C.H.;MORRIS, SUSAN M KIRBY & A.H. SHINGLER. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. **Antimicrob. Agents Chemother** April, 1(4): 283-288 , 1972.
- OGILVIE, C. *et al.* Capsulation Loci of Non–Serotype b Encapsulated *Haemophilus influenzae*. **The Journal of Infectious Diseases**, 184:144–9, 2001.
- OSAKI, Y. *et al.* Genetic Approach To Study the Relationship between Penicillin-Binding Protein 3 Mutations and *Haemophilus influenzae* β -Lactam Resistance by Using Site-Directed Mutagenesis and Gene Recombinants. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, p. 2834–2839, 2005.
- 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. *et al.* Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. **N Engl J Med** 310:1561–1566, 1984.
- PELTOLA , H., KÄYHTY, H. SIVONEN, A., MÄKELA, P. H. *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**, 60:730,1977.
- PELTOLA, H. World wide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21 st 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 Review**.v.13, n.2, p.302-317, 2000.
- PÉREZ-VAZQUEZ, M. *et al.* Laboratory Detection of *Haemophilus influenzae* with Decreased Susceptibility to Nalidixic Acid, Ciprofloxacin, Levofloxacin, and Moxifloxacin Due to gyrA and parC Mutations. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n.3, p.1185-1191, 2004.

- PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.53,n.4, p. 471-492, 1931.
- REDMOND, S.R.; PICHICHERO M.E. *Haemophilus influenzae* type b disease an epidemiological study with special reference to day-care centers. **JAMA** 252:2581-4, 1984.
- RESMAN, F. *et al.* Increase of β -Lactam-Resistant Invasive *influenzae* in Sweden, 1997 to 2010. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 4408–4415, 2012.
- RIBEIRO, G.S. *et al.* Prevention a of *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) Meningitis and Emergence of Serotype Replacement with Type a Strains after Introduction of Hib Immunization in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases** v.187, n.1, p109-116, 2003.
- RODRIGUES, L.P.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J.B. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b. **J Imm** 107:1071-1080; 1971.
- SANBOGI, Y. *et al.* Molecular Evolution of β -Lactam-Resistant *Haemophilus influenzae*: 9-Year Surveillance of Penicillin-Binding Protein 3 Mutations in Isolates from Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. p. 2487–2492, 2006.
- SATOLA, S. W.; SCHIRMER, P. L.; FARLEY, 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.
- SHAARE, D. *et al.* Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein mediated β -lactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. **Clinical Microbiology and Infection**, Vol. 16 1117–1124, 2010.
- SCHNEERSON, R., BARRERA, O., SUTTON, A., ROBBINS, J.B. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide – protein conjugates. **The Journal of experimental Medicine**, v.152, p. 361-376, 1980.
- SILVA, M.E.N.B. **Análise de cepas colonizadoras de *Haemophilus influenzae* em crianças de creches ligadas a Secretaria de Educação de Ribeirão Preto**. [Tese] Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP; 2004.
- SILVA *et al.*, M.E.N.B. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children attending day-care centers, in Ribeirão Preto, state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 37:33-38, 2006.
- SILVA, M.E.B.; MARIN, J.M. An epidemiological study of *Haemophilus influenzae* in a Brazilian day care center. **Brazilian Journal Infection Dis**. 5:260-8, 2001.
- ST. GEME III J.W.; CUTTER, D. Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. **Mol Microbiol** 21:21-31, 1996.

- SUKUPOLVI-PETTY, S., GRASS, S., ST. GEME III, J. W. The *Haemophilus influenzae* Type b *hcsA* and *hcsB* Gene Products Facilitate Transport of Capsular Polysaccharide across the Outer Membrane and Are Essential for Virulence. **Journal of Bacteriology**. p. 3870–3877, 2006.
- SULIKOWSKA, A. *et al.* Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* Isolated from the Nasopharynxes of Asymptomatic Children and Molecular Analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* Strain Replacement in the Nasopharynx. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 3942–3949, 2004.
- SUTTON, A. *et al.* Differential Complement Resistance Mediates Virulence of *Haemophilus influenzae* Type b. **Infection and Immunity**, p. 95-104 Vol. 1981.
- SCHOULS L.M. *et al.* Two variants among *Haemophilus influenzae* serotype b strains with distinct *bcs4*, *hcsA* and *hcsB* genes display differences in expression of the polysaccharide capsule. **BioMed Central Microbiology**. v.8, n.35, p. 1-11, 2008.
- TAKALA, A.K; CLEMENTS, D. A. Socioeconomic risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **The Journal of Infectious Diseases** 165:11-5, 1992;
- TAKALA, A. K. *et al.* Epidemiologic characteristics and risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in a population with high vaccine efficacy. **Pediatr Infect Dis J** 8:343 – 346, 1989.
- TAKALA, A.K.*et al.*: Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. **The Journal of Infectious Diseases** 164:982-6, 1991;
- TEELE, D.W. Otitis media in infancy and intellectual ability, school achievement, speech, and language at age 7 years. **The Journal of Infectious Diseases** 162:685-94, 1990.
- TENOVER, F.C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin Microbiol**, p.2233-9, 1994.
- TRISTAM, S.; LITTLEJOHN, R.; BRADBURY, R.S. *bla*ROB-1 presence on pB1000 in *Haemophilus influenzae* Is Widespread, and Variable Cefaclor Resistance Is Associated with Altered Penicillin-Binding Proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 4945-4947 vol. 54, , 2010,
- TROTTER, C.L. *et al.* Antibody to *Haemophilus influenzae* type b after routine and catch-up vaccination. **Ancet**. p. 1523-4, 2003.
- TROTIER, S. *et al.*: *Haemophilus influenzae* causing conjunctivitis in day-care children. **Pediatrics Infect Disease Journal**. 10:578-84, 1991.
- TSANG R.S.W. *et al.* Characterization of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Manitoba, Canada, 2000-2006: Invasive Disease due to Non-Type B Strains. **Clinical Infectious Diseases**.

v.44, n.12, p.1611-1614, 2007.

UBUKATA, K. *et al.* Association of Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 with b-Lactam Resistance in b-Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 1693–1699, 2001,

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** 22:1069-76, 1996.

VAN DEN BERGH, M.R. *et al.* Effects of the 10-Valent Pneumococcal Nontypeable *Haemophilus influenzae* Protein D–Conjugate Vaccine on Nasopharyngeal Bacterial Colonization in Young Children: A Randomized Controlled Trial. **Clinical Infectious Diseases**, 2013.

VAN KETEL, R.J. De WEVER B and VAN ALPHEN L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. **J Med Microbiology** 33:271 – 276, 1990.

WARD, J.I.; ZANGWILL KM . *Haemophilus influenzae* vaccines. **Vaccines** S. A. Plotkin & W. A. Orenstein, ed.. Philadelphia: WB Saunders 183 - 221p, 1999.

WARD, J.I. *et al.*, Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in Alaska: background epidemiology for a vaccine efficacy trial. **J Infect Dis** 153:17 – 26, 1986.

WENGER, J. D. Impact of *Haemophilus influenzae* type b vaccines on the epidemiology of bacterial meningitis. **Infect. Agents Dis.** 2:324–332, 1994.

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.

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

ANEXO A – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

Amostra	Idade	Sexo	AMP	MIC	Beta	SUT	E-test [®]	Açúcares	Biotipo	Sorologia	PCR	Pesq b ¹
001	58	F	Houve crescimento de outro micro-organismo (<i>Serratia odorifera</i>) - vitek									
002 (1)	3	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	6	Hi	II	NT	NT	Negativo
002(2)	36	F	Sensível	-	-	Resistente	4	Hi	II	NT	NT	Negativo
003	41	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	6	Hi	III	NT ou A	NT	Negativo
004	36	M	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
005	53	M	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
006	35	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	4	Hi	IV	NT ou A	NT	Negativo
007(1)	51	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	12	Hi	III	NT	NT	Negativo
008	48	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	VIII	E	NT	Negativo
009(1)	31	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	I	NT ou A	NT	Negativo
009(2)	31	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	2	Hi	III	C	NT	Negativo
10(1)	34	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	4	Hi	III	NT	NT	Negativo
10(2)	34	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	Resistente	Hi	III	NT ou D	NT	Negativo
10(3)	34	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	4	Hi	III	NT	NT	Negativo
011	38	F	Resistente	Resistente	Positivo	Sensível	-	Hi	I	D	NT	Negativo

AMP: ampicilina MIC: concentração mínima inibitória da ampicilina Beta: produção de β -lactamase SUT: sulfametoxazol+trimetoprim F: feminino M: Masculino
Hi: glicose (+), sacarose (-), manose (-) e lactose (-)

Amostra	Idade	Sexo	AMP	MIC	Beta	SUT	E-test	Açúcares	Biotipo	Sorologia	PCR	Pesq B-
012	31	M	Sensível	-	-	Resistente	Resistente	Hi	II	B	NT	Negativo
013	27	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	8	Hi	III	D	NT	Negativo
014	58	F	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
015	27	F	Resistente	Resistente	Negativo	Sensível	-	Hi	III	NT	NT	Negativo
016	55	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	Resistente	Hi	IV	C	NT	Negativo
017	27	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	4	Hi	III	D	NT	Negativo
018	38	F	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	II	NT	NT	Negativo
019	47	M	Houve crescimento de outro micro-organismo (não-identificado) – vitek									
20	60	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	Resistente	Hi	III	NT	NT	Negativo
21	47	F	Resistente	Resistente	Negativo	Resistente	3	Hi	IV	E	NT	Negativo
22	44	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	8	Hi	III	NT	NT	Negativo
23	49	F	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	III	NT ou D	NT	Negativo
24	51	F	Sensível	-	-	Resistente	Resistente	Hi	II	NT	NT	Negativo
025	24	F	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
26(1)	52	M	Resistente	Resistente	Positivo	Sensível	Resistente	Hi	III	NT ou D	NT	Negativo
26(3)	52	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	6	Hi	III	D	NT	Negativo
27(1)	50	F	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	VI	B ou D	NT	Negativo
27(2)	50	F	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	VI	B ou A	NT	Negativo
028	69	M	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									

AMP: ampicilina MIC: concentração mínima inibitória da ampicilina Beta: produção de β -lactamase SUT: sulfametoxazol+trimetoprim F: feminino M: Masculino
 Hi: glicose (+), sacarose (-), manose (-) e lactose (-)

Amostra	Idade	Sexo	AMP	MIC	Beta	SUT	E-test	Açúcares	Biotipo	Sorologia	PCR	Pesq B-
029	69	M	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
30	69	M	Resistente	Resistente	Negativo	Sensível	-	Hi	V	C	NT	Negativo
31(1)	62	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	Resistente	Hi	III	NT	NT	Negativo
31(2)	62	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	8	Hi	III	NT	NT	Negativo
032	58	F	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
33	61	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	III	NT ou E	NT	Negativo
34(2)	52	M	Sensível	-	-	Resistente	0,64	Hi	III	NT	NT	Negativo
34(3)	52	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	12	Hi	III	NT	NT	Negativo
34(4)	52	M	Resistente	8	Negativo	Sensível	-	Hi	III	NT	NT	Negativo
35	55	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	Resistente	Hi	I	NT	NT	Negativo
36(1)	58	F	Sensível	-	-	Resistente		Hi	II	NT	NT	Negativo
037	50	M	Houve crescimento de outro micro-organismo (<i>Brevundimonas diminuta/vesiculares</i>) – vitek									
038	37	F	Sensível	-	-	Resistente	1,5	Hi	II	E	NT	Negativo
39(1)	50	M	Sensível	-	-	Resistente	2	Hi	III	NT ou F	NT	Negativo
39(2)	50	M	Sensível	-	-	Resistente	2	Hi	III	NT ou F	NT	Negativo
40	46	M	Sensível	-	-	Resistente	Resistente	Hi	II	NT	NT	Negativo
41	64	M	Sensível	-	-	Resistente	2	Hi	II	NT	NT	Negativo
042	53	F	Houve crescimento de outro micro-organismo (com baixo perfil reativo) – Vitek									

AMP: ampicilina MIC: concentração mínima inibitória da ampicilina Beta: produção de β -lactamase SUT: sulfametoxazol+trimetoprim F: feminino M: Masculino Hi: glicose (+), sacarose (-), manose (-) e lactose (-).

Amostra	Idade	Sexo	AMP	MIC	Beta	SUT	E-test	Açúcares	Biotipo	Sorologia	PCR	Pesq B-
43	29	M	Sensível	-	Negativo	Resistente	4	Hi	II	NT	NT	Negativo
44	59	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	Resistente	Hi	III	NT	NT	Negativo
45	53	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	12	Hi	IV	NT ou C	NT	Negativo
46	47	F	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	V	C	NT	Negativo
47	56	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	4	Hi	IV	NT	NT	Negativo
48	56	M	Sensível	-	Negativo	Resistente	8	Hi	II	NT	NT	Negativo
49	59	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	0,75	Hi	IV	NT	NT	Negativo
50	55	M	Sensível	-	-	Resistente	2	Hi	V	D	NT	Negativo
51	61	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	8	Hi	IV	NT	NT	Negativo
52 (1+2)	48	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	III	D	NT	Negativo
52(3+4)	48	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	VI	D	NT	Negativo
53(1+2)	63	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	VIII	NT ou E	NT	Negativo
53(3)	63	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	III	NT	NT	Negativo
54	62	M	Sensível	-	-	Resistente	6	Hi	II	NT	NT	Negativo
55	31	F	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	IV	NT	NT	Negativo
56	67	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	6	Hi	III	NT ou C	NT	Negativo
57	72	M	Sensível	-	-	Resistente	4	Hi	III	NT ou C	NT	Negativo
58	35	F	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	III	NT ou A	NT	Negativo
59(1)	63	M	Sensível	-	-	Intermediária	1,5	Hi	II	NT	NT	Negativo

AMP: ampicilina MIC: concentração mínima inibitória da ampicilina Beta: produção de β -lactamase SUT: sulfametoxazol+trimetoprim F: feminino M: Masculino
Hi: glicose (+), sacarose (-), manose (-) e lactose (-).

Amostra	Idade	Sexo	AMP	MIC	Beta	SUT	E-test	Açúcares	Biotipo	Sorologia	PCR	Pesq B-
59(2)	63	M	Sensível	-	-	Intermediária	1,5	Hi	II	NT	NT	Negativo
060	59	F	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
61(1)	52	F	Sensível	-	-	Resistente	1	Hi	II	B	NT	Negativo
61(2+3)	52	F	Sensível	-	-	Resistente	1,5	Hi	II	B ou A	NT	Negativo
62(1)	48	F	Sensível	-	-	Resistente	3	Hi	V	NT	NT	Negativo
62(2)	48	F	Resistente	16	Negativo	Resistente	4	Hi	V	NT	NT	Negativo
063	59	M	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
64	34	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	12	Hi	III	D	NT	Negativo
065	57	M	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
066		F	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
67	43	F	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	12	Hi	III	NT ou A	NT	Negativo
68	44	F	Sensível	-	-	Resistente	2	Hi	II	NT	NT	Negativo
069	52	M	Houve crescimento de outro micro-organismo, mas foi descartada a possibilidade de Hi									
70(1)	71	M	Sensível	-	Negativo	Resistente	2	Hi	V	D	NT	Negativo
70(2)	71	M	Sensível	-	Negativo	Sensível	-	Hi	II	NT ou C	NT	Negativo
71(1)	68	M	Resistente	Resistente	Positivo	Resistente	Resistente	Hi	III	E	NT	Negativo
71(2)	68	M	Sensível	-	-	Sensível	-	Hi	III	E	NT	Negativo
72	46	F	Resistente	Resistente	Negativo	Sensível	-	Hi	II	NT ou A	NT	Negativo
73	64	M	Sensível	-	-	Resistente	1	Hi	II	E	NT	Negativo

AMP: ampicilina MIC: concentração mínima inibitória da ampicilina Beta: produção de β -lactamase SUT: sulfametoxazol+trimetoprim F: feminino M: Masculino Hi: glicose (+), sacarose (-), manose (-) e lactose (-)

ANEXO B- QUESTIONÁRIO APLICADO

FICHA DE INFORMAÇÕES DE PACIENTES
CRECHE MÃE ROSA –CACHOEIRA GRANDE- JACOBINA-BA.

Nº AMOSTRA

Responsável pelo preenchimento.....

NOME:	
DATA DE NASCIMENTO: / /	SEXO F () M ()
Raça: <input type="checkbox"/> Branco	<input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> desconhecida
VACINADO CONTRA <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib) ? () com a DPT/ quadrupla ()	
NÃO () SIM ()	QUANTAS DOSES? () DATA DA ÚLTIMA DOSE: / /
TEM OU TEVE CONTATO COM ALGUÉM COM SINTOMAS DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS NOS ÚLTIMOS 6 MESES?	
NÃO () SIM () ONDE?	
INTERNAÇÃO ANTERIOR (ATÉ 6 MESES) ? QUANDO?	
NÃO () SIM () MOTIVO:	
TIPO DE MATERIAL COLETADO: swab de nasofaringe	
DATA DA COLETA: / /	
DOENÇA CRÔNICA?	
NÃO () SIM () QUAL:	
PARENTE INTERNADO NOS ÚLTIMOS 6 MESES?	
NÃO () SIM () MOTIVO:	
PACIENTE EM USO DE MEDICAMENTO?	
NÃO () SIM () QUAL? QUANTO TEMPO?	
PACIENTE EM USO DE ANTIBIÓTICO?	
NÃO () SIM () QUAL? QUANTO TEMPO?	
PACIENTE TRATADO COM ANTIBIÓTICO ANTERIORMENTE (ÚLTIMOS 6 MESES)?	
NÃO ()	SIM ()
β-LACTÂMICOS () QUANDO?	MACROLÍDEOS () QUANDO?
CEFALOSPORINAS () QUANDO?	TETRACICLINAS () QUANDO?
CLORANFENICOL () QUANDO?	QUINOLONAS () QUANDO?
VANCOMICINA () QUANDO?	AMINOGLICOSÍDEOS () QUANDO?
OUTRO () QUAL?	QUANDO?

OBS. Anexar cópia-xerox da carteira de vacinação.

AUTORIZO A UTILIZAÇÃO DO MATERIAL COLETADO PARA FINS DE PESQUISA SEM A DIVULGAÇÃO DO NOME DO SUJEITO DA PESQUISA.

Data

Assinatura do responsável

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Autorizo a coleta de secreção de nasofaringe (região entre nariz e garganta), do(a) menor....., o(a) qual sou responsável e que frequenta a CRECHE MÃE ROSA – CACHOEIRA GRANDE-JACOBINA-BA. Estou ciente de participar do projeto “Ocorrência de *Haemophilus influenzae* em crianças saudáveis menores de cinco anos, vacinadas com a vacina conjugada contra o Hib, em uma creche do município de Jacobina, Bahia”. Sei que não há riscos e desconfortos na coleta deste material. Sei também que a coleta será feita por profissional da área de saúde, treinado e capacitado.

Estou ciente que as crianças serão consultadas, antes de ser processada a coleta do material, e será respeitado o desejo daquela que se negar a fazê-lo. Os benefícios esperados serão da maior relevância para a ciência brasileira e contribuirão para a melhoria e desenvolvimento da saúde pública.

Autorizo que os dados obtidos sejam publicados, sem a identificação dos pacientes, para as fontes científicas, que o responsável deste projeto, considere adequada. Concordo também em fornecer os dados que fazem parte deste termo através de ficha (em anexo).

Tenho o acesso dos telefones e endereço do pesquisador e de onde será realizada esta investigação:

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

FIOCRUZ-INCQS

Av. Brasil, 4365

21045-900-Manguinhos - Rio de Janeiro

Tels. 21-38655243 (Horário comercial)

21-30421167 ou 94013081 (Particular do pesquisador)

Jacobina (Bahia), _____

Assinatura do pai, mãe ou responsável -

Nº