

# OCORRÊNCIA DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EM CONJUNTIVITES INFANTIS NO RIO DE JANEIRO

## OCCURRENCE OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* IN CHILD'S CONJUNCTIVITIS IN RIO DE JANEIRO

### RESUMO

O processo infeccioso conhecido como conjuntivite ocorre quando há diminuição da imunidade do hospedeiro ou pela aquisição de um microrganismo mais virulento. Até o nascimento há proteção intrauterina. A microbiota bacteriana é adquirida pela passagem no canal do parto. Uma ampla variedade de agentes infecciosos apresenta alta transmissibilidade e se dá por meio do contato direto com secreções oculares de uma pessoa infectada ou de maneira indireta por meio de superfícies, instrumentos ou soluções contaminadas. É frequente a transmissão nasocomial em escolas e creches, bem como a disseminação secundária no núcleo familiar.

Embora se trate de doença geralmente benigna, a rápida disseminação, com comprometimento de um grande número de pessoas, além da falta de diagnóstico etiológico específica põe em alerta os serviços de saúde. No entanto, epidemias de grande magnitude têm se associado à transmissão de agentes bacterianos, entre eles *Haemophilus influenzae*, agente infeccioso mais conhecido de meningites e bacteremias infantis. Este trabalho foi realizado com cepas de Hi de crianças com idade de 0 a 3 anos e o predomínio nos isolados foi do HiNT. Nos antibiogramas realizados (difusão do disco em ágar e concentração inibitória mínima-CIM /E-test) houve oito cepas resistentes aos antibióticos: sulfametoxazol-trimetoprima; amoxicilina - ácido clavulânico; ampicilina e ceftriaxona. Dessas, apenas uma apresentou resistência para sulfametoxazol-trimetoprima e ampicilina, tendo também a produção de  $\beta$ -lactamase, que foi determinada pelo método da cefalosporina cromogênica. Estes resultados nos mostram a necessidade de realização da identificação bacteriana, antibiograma e análises moleculares, dentro das normas de controle de qualidade, pela importância dos resultados e conseqüentemente, suas contribuições para a saúde pública.

**Palavras-chave:** Conjuntivite Bacteriana. *Haemophilus influenzae*. Vacina Conjugada Contra Hib.

### ABSTRACT

The known infectious process as conjunctivitis occurs when it has reduction of the immunity of the host or for the acquisition of a more virulent microorganism. Until the birth it has intrauterine protection. The ticket in the canal of the childbirth acquires Microbiota bacterial. An enormous variety of infectious agents presents high transferability and occurs by means of the direct contact with ocular secretions of an infected person or in indirect way by means of surfaces, instruments or contaminated solutions. The nasocomial transmission in schools and day-care centers is frequent, as well as the secondary dissemination in the familiar groups. Although if it deals with benign illness generally, the fast dissemination, compromises of a great number of people, beyond the lack of aetiologic diagnosis specifies puts in alert the health services. However epidemics of great magnitude if are associated with the transmission of bacterial agents, between them *Haemophilus influenzae* infectious agent more known of meningitidis and infantile bacteremia. The main agent on this study was carried through with of Hi strain from children with up to 0-3 years and the predominance in the isolated ones was of the HiNT.

In resistant the carried through antimicrobial susceptibility test (disc diffusion agar and minimal inhibitory concentration-MIC/E-test) it had eight strains to antibiotics: trimethopim-sul-

Deiviane Aparecida Calegar<sup>1</sup>,  
Nathalia Gonçalves Santos  
Caldeira<sup>2</sup> e  
Antonio Eugênio Castro Cardoso  
de Almeida<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Autor - aluna de Ciências  
Biológicas da Universidade  
Grande Rio - Rio de Janeiro-RJ  
- bolsista programa PEC-INCQS-  
FIOCRUZ

<sup>2</sup>Autor -Técnica em Saúde Pública  
- aluna de Mestrado do Programa  
de Pós- Graduação em Vigilância  
Sanitária do INCQS-FIOCRUZ

<sup>3</sup>Autor correspondente-  
Tecnologista em Saúde Pública,  
Orientador do Programa de Pós-  
Graduação em Vigilância Sanitária  
do INCQS-FIOCRUZ

\*Correspondência  
eugenio.almeida@incqs.fiocruz.br

famethoxazole; amoxicillin-clavulanic acid – ampicillin and ceftriaxone. Of these only one presented resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and ampicillin also having the production of  $\beta$ -lactamase, by the chromogenic cephalosporin method. These results in show the molecular necessity of accomplishment of the bacterial identification, antimicrobial susceptibility test and identification to be carried through inside of the norms of quality control, for the importance of the results and consequently, its contributions for the public health.

**Keywords:** Bacterial Conjunctivitis. *Haemophilus influenzae*. Conjugate Vaccine Against Hib.

## INTRODUÇÃO

A conjuntiva do olho humano, normalmente, é colonizada por uma microbiota bacteriana equilibrada, que pode, devido à diminuição da imunidade do hospedeiro ou pela aquisição de um microrganismo mais virulento, causar o aparecimento do processo infeccioso conhecido como conjuntivite bacteriana (MEDEIROS, *et al.* 2003)

Antes do nascimento, a conjuntiva e as pálpebras são estéreis, pois o saco amniótico está íntegro. A microbiota bacteriana é adquirida durante a passagem pelo canal de parto. A colonização do olho é retardada pela aplicação tópica de nitrato de prata ou antibiótico tópico para profilaxia da gonorreia e infecção por *Chlamydia trachomatis*. Após o nascimento, pessoas saudáveis de todas as idades apresentam aproximadamente à mesma característica quanto à população bacteriana (CREDE CSF). Com a mudança das condições normais da superfície ocular, os microrganismos, com seus fatores de virulência, ficam mais resistentes às defesas naturais e aumentam sua capacidade infecciosa. Para que a infecção ocular se instale é necessária aderência, penetração, invasão, persistência e replicação do microrganismo, independentemente dos mecanismos de defesa existentes. A capacidade de invasão microbiana decorre da capacidade de produção de exotoxinas, proteases e endotoxinas que destroem células e tecidos oculares (VIEIRA, *et al.* 1999).

Uma ampla variedade de agentes infecciosos apresenta alta transmissibilidade e dá por meio do contato direto com secreções oculares de uma pessoa infectada ou de maneira indireta por meio de superfícies, instrumentos ou soluções contaminadas. É frequente a transmissão nasocomial em escolas e creches, bem como a disseminação secundária no núcleo familiar (MEDEIROS, *et al.* 2003)

As conjuntivites virais e bacterianas agudas são quase sempre autolimitadas, durando em torno de 7 a 14 dias. As de origem bacteriana aguda, se tratadas adequadamente, duram de 1 a 3 dias. Embora se trate de doença geralmente benigna, a rápida disseminação, com comprometimento de um grande número de pessoas, além da falta de diagnóstico etiológico específica põe em alerta os serviços de saúde. No entanto, epidemias de grande magnitude têm se associado à transmissão de agentes bacterianos, entre eles *Haemophilus influenzae* (Hi) agente infeccioso mais conhecido de meningites e bacteremias infantis (EPLING, 2010).

*Haemophilus influenzae* sorotipo b (Hib) foi até pouco tempo causa importante de doenças como, por exemplo, meningite, artrite séptica, conjuntivite, otite média e pericardite no meio pediátrico. Com a implementação da vacina conjugada contra o Hib, observou-se uma queda dramática na incidência da doença invasiva pelo Hib num período muito curto de tempo (KONEMAN, *et al.* 2001) (ALMEIDA, *et al.* 2005). Como consequência, os Hi não capsulados isolados, atualmente são predominantes na doença invasiva de *H. influenzae*, sobretudo em países que os programas de vacinação contra Hib são rotineiros (LEDEBOER & ADAM & ZGHEREA, *et al.*). Nos países sem vacinação contra Hib, o *H. influenzae*, continua sendo das principais causas de meningite em crianças de até 5 anos de idade, bem como tem sido relatados o aumento das taxas de resistência aos antibióticos (ELMINGHAM, GRUNEBERG & GARCÍA-COBOS, *et al.* 2000). Na era pré-vacina conjugada contra o Hib, os Hi não tipáveis (presumivelmente não-encapsuladas) raramente eram agentes de doenças invasivas em crianças (ALMEIDA, *et al.* 2005).

No Brasil, durante o período de pré-vacinação, de 1990 a 1999, o coeficiente de incidência (média anual) de meningite de tipo b do *H. influenzae* em crianças com idade até 1 ano e até aos 4 anos foram 22,3 e 8,8 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. As taxas de mortalidade entre estes grupos de idade foram 19,9% e 17,1%, respectivamente. Em agosto de 1999 foi introduzida a vacina conjugada contra o Hib, como parte da rotina do programa nacional de imunização no Brasil, do Ministério da Saúde. As crianças com até 1 ano de idade foram programadas para receber três doses de vacina aplicadas em intervalos de 2 meses. A agenda de vacinação oficial, seguida no Brasil, não inclui a dose de reforço (*booster*) após 12 meses. Crianças com idades entre 12 - 23 meses devem receber apenas uma única dose de vacina. Dados da Fundação Nacional de Saúde / Programa Nacional de Imunização (FUNASA/PNI/Ministério da Saúde) mostram que em 2002 e 2003, 92,91% e 95,99%, respectivamente, das crianças elegíveis receberam a vacina (Ministério da Saúde, Funasa).

O impacto clínico da vacina conjugada contra o Hib foi considerável, mas doenças graves com o Hi não desapareceram. Em vez disso, há indicações de que podem ter alterado a epidemiologia e a virulência do Hi e infecções graves causaram por não-tipo b e não encapsulados ou estirpes de Hi (HiNT) não tipáveis tornaram-se mais comuns (BROWN, *et al.* 2009).

*Haemophilus influenzae* não tipável (HiNT) está presente na nasofaringe, em aproximadamente 50% das crianças e é uma causa comum de doença do trato respiratório localizadas, incluindo sinusite, otite média, bronquite e pneumonia (ZGHEREA, *et al.* & PITTMAN). A realização da imunização de rotina contra *H. influenzae* tipo b (Hib) há pouco mais de uma década, mostram atualmente que os Hi não tipáveis assumiram maior importância, como causa de bacteriemia, meningite e outras formas de doença invasiva (ZGHEREA, *et al.* & PITTMAN & CDC, 2008).

Foi Robert Koch, em 1882, quem primeiro descreveu um microrganismo semelhante ao *Haemophilus* encontrado em exsudato conjuntival. Entretanto, considera-se o cientista Richard Pfeiffer como o primeiro a identificar o patógeno, designando-o de *Influenza bacillus* em 1892. Pensou-se equivocadamente ser o agente da pandemia de influenza, que dizimou, sobretudo grande número da população europeia no final do século XIX e início do século XX. Fatos como o isolamento dessa bactéria no escarro e em tecido de pulmão de indivíduos que morreram nessas pandemias de influenza, contribuíram grandemente para as suas conclusões (PITTMAN & CDC). Nesse mesmo ano, considerou-se ser ele o agente etiológico responsável pela gripe conhecida como influenza, quando provavelmente o *H. influenzae*, como foi denominado mais tarde, era um invasor secundário. Pfuhl fez o primeiro relato de meningite pelo *Influenza bacillus* no mesmo ano de 1892, tendo sido o organismo identificado após a morte dos pacientes. Em 1898, Slawyk relatou a recuperação do *Influenza bacillus* de um líquido purulento de um paciente ainda em vida. Winslow e colaboradores sugeriram a denominação de *Haemophilus* para esse grupo de microrganismos por terem apresentado crescimento significativo quando cultivados em meio sintético contendo sangue ou hemácias lisadas. O reconhecimento, finalmente, ocorreu quando o Comitê de Nomenclatura da Associação Americana de Bacteriologistas denominou-o *Haemophilus influenzae*. Pode ser encontrado sob duas formas: capsulado e não encapsulado. Os capsulados foram caracterizados conforme o tipo capsular de a até f, sendo o sorotipo b responsável por quase todas as infecções invasivas e graves causadas por *H. influenzae* e francamente predominante, principalmente em crianças menores de 6 anos, até o início da vacinação mundial em 1987 (PITTMAN & CDC & MANNHEIM, 1984). O sorotipo não tipável (HiNT), considerado raro e de baixa virulência, não aglutina com os antissoros existentes (a-f). Fazem parte do trato respiratório de pessoas saudáveis, correspondendo a 50 a 80% da microbiota e, portanto, não estariam, em princípio, relacionadas com doenças invasivas (LEDEBOER, DOERN, PITTMAN, 1931).

A espécie *H. influenzae*, e seus sorotipos são classificados de acordo com os antígenos específicos de suas cápsulas em sorotipos de a até f, descritos originalmente por Pittman (1931). Esta classificação ainda é utilizada nos dias atuais em laboratórios clínicos e de pesquisa que isolam e identificam estes microrganismos. Aqueles que não reagem com os antissoros específicos (a-f), não expressando a cápsula na sua superfície, são denominados *Haemophilus influenzae* não ti-

páveis (HiNT). Os que reagem com um dos seis sorotipos (a-f) são denominados capsulados (tipáveis), recebendo a letra do sorotipo na sua nomenclatura, por exemplo: *Haemophilus influenzae* tipo b - Hib (LEDEBOER & MANNHEIM, 1984).

As doenças causadas por esse microrganismo compõem um leque de infecções, de caráter agudo, que acometem, com maior patogenicidade para o Sistema Nervoso Central (SNC) e os tratos respiratórios alto e baixos, infecções oftálmicas predominantes em crianças e associadas principalmente ao *Haemophilus influenzae* do tipo capsular b ou Hib (ZGHEREA & PITTMAN & MANNHEIM, 1984).

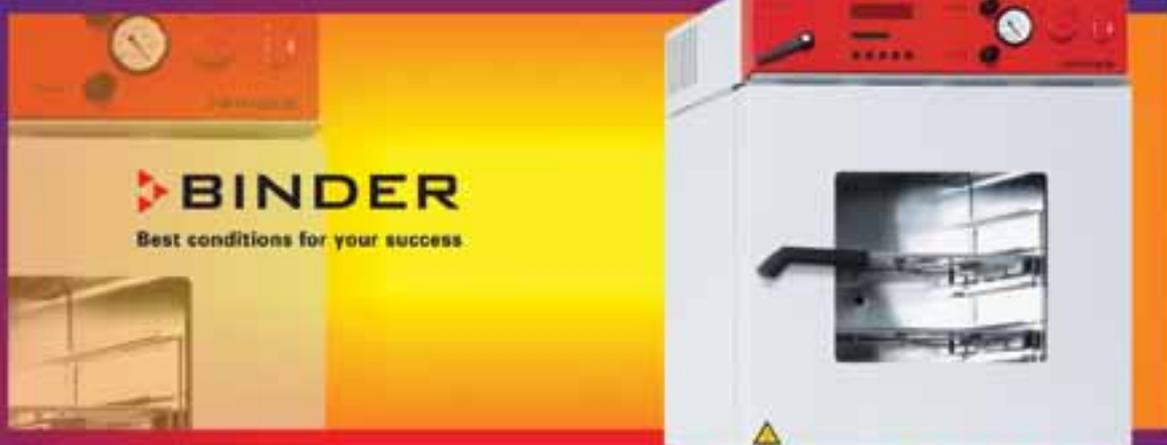
É no homem, o agente responsável por diversas infecções, invasivas ou não, mas que atingem ainda principalmente crianças. O Hi tem como porta de entrada a nasofaringe podendo fazer parte da microbiota transitória ou até permanecer por longos períodos sem causar doenças. Em alguns indivíduos, este microrganismo pode invadir áreas nobres, via circulação sanguínea, e causar infecções em locais como as meninges e os pulmões (CDC, 2008).

Os *Haemophilus* também podem ser classificados fenotipicamente, de acordo com seu biotipo. São divididos em oito biotipos fornecendo informações valiosas para a epidemiologia, pois os biotipos dos Hi estão associados a diferentes tipos de infecção, fontes de isolamento, propriedades antigênicas e resistência a antibióticos (LEDEBOER & PITTMAN, 1931).

Na América do Norte, antes da introdução da vacina conjugada contra Hib, o *H. influenzae* era encontrado em até 95% das culturas de líquido e sangue. Este ocorria em apenas 10% dos casos, em crianças maiores que 10 anos de idade, com situação semelhante ocorrendo em outros países tais como Inglaterra, Holanda, Finlândia e Brasil (ALMEIDA, *et al.* & WARD, 1996).

Atualmente, na prevenção contra Hib, além da vacina conjugada, que faz parte do calendário oficial do Ministério de Saúde, o uso profilático da rifampicina também é recomendado em adultos e em crianças que tiveram contato direto ou prolongado com pessoas com meningite por *Haemophilus*. O uso desse antibiótico é uma medida de prevenção da propagação da doença pela eliminação da bactéria que coloniza a nasofaringe dos então portadores. Enquanto que para as infecções oftálmicas é necessário o antibiograma (MINISTÉRIO DA SAÚDE & ALMEIDA, *et al.* 2005). Portanto, muitos antimicrobianos constituem uma grande arma contra estas infecções. A resistência, hoje frequente, dos *H. influenzae*, particularmente a ampicilina, pertencente ao grupo de beta-lactâmicos, pode ocorrer por dois mecanismos: não enzimático ou enzimático. As cepas de Hi que apresentam resistência a ampicilina pelo mecanismo não enzimático, ou seja, por alterações das proteínas ligantes de penicilina (PBPs) devido a mutações no gene *ftsL*, são denominadas de cepas resistentes a ampicilina não produtoras de beta-lactamase (BLNAR). Este mecanismo envolve alteração em particular das proteínas ligantes de penicilina 3 (PBP3) que diminuem sua afinidade a este antibiótico e a outros antibióticos beta-lactâmicos (UBUKATA & SABONGI, *et al.* 2012). Conforme descrito na literatura, o mecanismo de resistência

**AS MELHORES MARCAS**  
**OS MAIORES ESTOQUES**  
...→ **VOCÊ ENCONTRA NA ALPAX**



Estufas a vácuo e Incubadoras CO<sub>2</sub>



Balanças Analíticas e de Precisão



Bombas de Vácuo

enzimático ocorre em cerca de 30% das cepas de Hi e são denominadas  $\beta$ -lactamases positivas (BLA+) (FELMINGHAM & UBUKATA, *et al.* 2001).

Este trabalho visa conhecer o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, como também a presença da enzima de  $\beta$ -lactamase, frequente na infecção oftálmica causada por Hi apesar de ser amplamente estudada em outras infecções, nas conjuntivites infantis constitui área pouco conhecida, sobretudo quanto aos antibióticos empregados. Mesmo com o uso, em boa parte do mundo, da vacina conjugada contra Hib e a queda acentuada das infecções pelo *H. influenzae*, particularmente o tipo b, ainda existe carência de se conhecer esta agente nas infecções oculares em crianças brasileiras.

## MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo, foram utilizadas 16 cepas de *H. influenzae*, isoladas no período 2007 a 2011 de crianças entre 0 a 3 anos, que tiveram atendimento na rede pública hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. Estas conservadas por liofilização e fazem parte da Coleção de Pesquisa do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Para isolamento inicial, o meio de cultura empregado foi o ágar chocolate suplementado. Confeccionado com base ágar Mueller-Hinton (Oxoid), aquecida a 70°C, adicionado 10% de sangue estéril, desfibrinado de cavalo e 1% de IsoVitalax (BBL), com os fatores V (NAD) e X (Hemina). A incubação destas culturas foi feita em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37°C por 24 a 48 horas (KONEMAN & ALMEIDA, *et al.*, 2005).

Nas colônias suspeitas eram realizados esfregaços com a coloração de Gram. Quando as características morfológicas eram de Cocobacilos Gram-negativos pleomórficos, realizava-se a pesquisa de outras características.

O teste para confirmar a dependência dos fatores de crescimento (X e V) foi realizado em ágar Mueller-Hinton, distribuídos em placas de Petri, empregando-se discos de papel de filtro impregnados com os fatores V, X e XV (Oxoid). Foram consideradas Hi as cepas capazes de crescer somente ao redor do disco XV e entre os discos X e V (LEDEBOER & DOERN, 2011).

A identificação bioquímica baseou-se na fermentação, em meio de cultura (caldo) dos seguintes carboidratos: glicose, sacarose, lactose, manose e frutose. Para sua fabricação foi utilizada a base (Difco) com 1% de vermelho de fenol como indicador de pH e suplementado com soluções na concentração de 10 µg/mL de NAD (fator V) e hemina (fator X) (LEDEBOER & DOERN, 2011).

A biotipagem, parte da identificação dos Hi é empregada como ferramenta epidemiológica. Foi realizada através de outros três testes bioquímicos com mecanismos enzimáticos característicos: Ornitina descarboxilase, da Urease e da triptofanase pela presença do indol (LEDEBOER & DOERN, 2011).

Para o tratamento de infecções causadas pelo Hi, o estudo dos mecanismos de resistência e a sensibilidade das cepas,

devem ser analisados nos laboratórios clínicos e de pesquisa através de testes com antimicrobianos. Isto é importante para nortear o uso adequado e emergencial que muitas vezes se faz necessário na clínica médica, sobretudo quando não há proteção vacinal, como para os Hi não b (Hinb) e para os HiNT (KONEMAN & ALMEIDA, CSLI).

O surgimento de resistência no que comumente ocorrem em bactérias Gram-positivas e negativas aos agentes antimicrobianos tornou-se de grande significativo clínicoepidemiológico. O aumento dos custos de mortalidade, morbidade e cuidados de saúde em pacientes internados e ambulatoriais foram diretamente atribuídos a este problema (BRYSKIER & JONES, 1999).

Nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (Técnica da difusão do disco em agar /Método Kirby-Bauer) foi realizado com o meio de cultura *Haemophilus* Test Medium (HTM) que consiste da base de agar Mueller-Hinton suplementado com 15 µg/mL de hemina (fator X), 15 µg/mL de dinucleotídeo de nicotinamida adenina – NAD (fator V) e 5mg/mL de extrato de leveduras. O inóculo da cultura suspeita foi realizado utilizando caldo BHI (Brain Heart Infusion) ajustado à escala de 0.5 McFarland e aplicados com um “swab” estéril na placa de Petri (90 mm) que continha o meio HTM. Em seguida, os discos de antibióticos foram distribuídos na superfície do meio, com auxílio de uma pinça estéril. Em seguida as placas foram incubadas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, por 16 a 18 horas. Foram testados os seguintes antibióticos 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), levofloxacina (LEV – 5 µg), rifampicina (RIF – 5 µg) e sulfametoxazol-trimetoprima (SUT –1.25/23.75 µg).

Os discos de antibióticos foram da marca Cefar Diagnóstica Ltda. A cepa de *H. influenzae* (ATCC 49247) foi utilizada como controle de qualidade (23). A pesquisa da produção da enzima  $\beta$ -lactamase, em cepas do grupo *Haemophilus influenzae* foi feita através do teste de cefalosporina cromogênica. Este método baseia-se na hidrólise da ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico da cefalosporina cromogênica (Nitrocefina, Glaxo Research, Ltda) pelo produto do microorganismo, resultando na mudança de cor amarelo para vermelho (LEDEBOER & CSLI, 2011).

Amostras de Hi isoladas com ambos os mecanismos de resistência (beta lactamase e PBP3), que apresentam  $\beta$ -lactamase positiva e resistência à ampicilina ou à amoxicilina associadas ao ácido clavulânico, são denominadas BLPA-CR (GARCÍA-COBOS & CSLI, 2011).

Todas as amostras foram testadas para a produção de  $\beta$ -lactamase pelo método da cefalosporina cromogênica usando nitrocefina (Oxoid). Para o controle de qualidade usou-se as cepas da ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* =  $\beta$ -lactamase positiva), uma cepa de Hi de isolado clínico, fornecido pela Coleção do INCQS-FIOCRUZ que também  $\beta$ -lactamase positiva e, portanto, utilizada como controle interno positivo. Como controle negativo usou-se ATCC 25923 (*S. aureus*  $\beta$ -lactamase negativa) (LEDEBOER & CSLI, 2011).

As cepas foram semeadas em “spot” numa placa de HTM+ NAD, dividida em 16 partes, cada uma correspondendo a uma cepa diferente. Inclusive as cepas necessárias ao controle de qualidade. Incubou-se a 37°C, em jarra em 5% de CO<sub>2</sub> por 24-48h. Após a incubação as placas foram retiradas das jarras e colocadas sobre superfície branca para melhor visualização da reação. Sobre cada “spot” foram colocadas 2 µl do reagente. As cepas positivas foram indicadas pela mudança de cor; amarelo para vermelho (LEDEBOER, 2011).

## RESULTADOS

Das 16 amostras de Hi testadas, 12(75%) foram não tipáveis(NT), seguido dos sorotipos a, b, c e f, que apresentaram percentuais iguais a 6,25%, (uma cepa de cada sorotipo). Todos os tipos sorológicos foram confirmados a tipagem molecular de cada cepa, pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (FALLA, 1994).

Na biotipagem, 50% (oito) foram do biotipo II, 37,5% (seis) eram do biotipo III e 12,5% (duas) do biótipo I

Os resultados do antibiograma realizado pelo método de difusão do disco em ágar evidenciaram a sensibilidade de 50% (n=8) das cepas a todos os antibióticos testados. A resistência encontrada nas outras oito cepas (50%) foi distribuída desta forma: Duas (12,5%) ao CRO, quatro (25%) ao AMC+Ac e todas ao SUT. Observou-se que dessas, apenas uma cepa foi resistente ao AMC+Ac+SUT+AMP. Ao se realizar o MIC, (técnica do E-test) para as cepas resistentes ao SUT e AMC+Ac, esta foi confirmada apenas para o SUT (> 32 µg/ml) e somente esta também apresentou-se β- lactamase positiva.

## DISCUSSÃO

O alto percentual de cepas Hi não tipável (HiNT) encontrado nas infecções é um fato que deve ser considerado o que já constitui sendo atualmente uma preocupação mundial. Com a ampla utilização da vacina conjugada contra o Hib, o número de infecções pelo tipo b, antes o mais frequente diminuiu drasticamente (SCHUMACHER, *et al.* 2012). O tipo b era

também o mais frequente nas infecções oftálmicas (EPLING & SCHUMACHER, *et al.* 2012). Nossos resultados mostram que a presença hoje nas infecções pelo Hi é predominante do HiNT (EPLING, 2010). A resistência apresentada aos antimicrobianos testados, mostra a tendência já encontrada em outros tipos de infecções (LEDEBOER & JONES, 1999). Com isso o uso indiscriminado de antibióticos deve ser considerado. Por outro lado a implementação das culturas bacteriológicas com o antibiograma, valorizando-se o controle de qualidade dos meios de cultura, os antissoros para tipagem sorológica e os antibióticos empregados, são de fundamental importância para diagnóstico seguro e confiável. A técnica do MIC, quando possível, deve ser implementada, pela sensibilidade e exata concentração dos antimicrobianos empregados. A tipagem molecular realizada através da técnica da PCR (FALLA & SCHUMACHER, 2012) é uma excelente e imprescindível ferramenta para confirmação do tipo capsular, de fundamental importância na epidemiologia das doenças por *Haemophilus influenzae*.

## CONCLUSÕES

Apesar do número amostral reduzido (16 cepas) podemos sugerir a importância de todos os isolados de Hi visto que os NT (FELMINGHAM & GRUNENBERG, 2000) são, atualmente, responsáveis pela maioria das infecções graves por *Haemophilus influenzae*, mesmo com a existência da vacina conjugada, por ser cápsula-específica, só protege para o tipo b (Hib). Desta forma, os antibióticos são a grande arma no combate destas infecções. A resistência bacteriana aos mesmos é uma realidade. Os resultados revelados aos antibióticos testados neste estudo sinalizam a necessidade do monitoramento epidemiológico constante, por consequência, tratamento eficaz para determinada infecção ocular que poderá ser sugerido, proporcionando ao pacientes melhores resultados evitando, assim, complicações e tratamentos mais agressivos.

## AGRADECIMENTOS

CNPq/PAPES/FIOCRUZ-INCQS

## REFERÊNCIAS

MEDEIROS, E. A. *et al.* Infecção hospitalar em pacientes cirúrgicos de um Hospital Universitário. Revista Acta Cirúrgica Brasileira. v.18, supl 1, p.158,2003.

CREDE CSF. The prevention of ocular inflammation in the newborn. Die Verhütung der Augenentzündung der Neugeborenen, Archiv fur Gynaekologie;17:50, 1881.

VEIRA, L. A.; LIMA, A. L. H.; CUNHA, M.; MASCARO, V. Conceitos básicos e clínicos de doenças externas e córnea. In: LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C. N.; ALVES, M. R. Doenças externas oculares e córnea. Rio de Janeiro: Cultura Médica; p.6-9, 1999.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- EPLING, J.- Bacterial conjunctivitis. *Clinical Evidence* (online) –Mar 15, pii: 0704, (BMJ Publishing Group Ltd. 2010), 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Guia de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 523p.1998.
- KONEMAN, E. W. *et al.* *Haemophilus*. In: Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: MEDSI, p.373-396, 2001.
- DE ALMEIDA, A. E. C. C. *et al.* Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Brazilian Journal Medical Biological Research*. V.38, n.5, p.777-781, 2005.
- LEDEBOER, N. A & DOERN, G. V- *Haemophilus*. In: Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, Cap.34, p. 588-602, 2011.
- ADAM, H. J. *et al.* Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontário, Canada: Evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. *Vaccine*. v.28, p.4073 – 4078, 2010.
- ZGHEREA, D. *et al.* Bronchoscopic Findings in Children With Chronic Wet Cough. *Pediatrics*. Jan, p.1-8, 2012
- FELMINGHAM, D.; GRUNEBERG, R. N. The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.45, n.2, p.191-203, 2000.
- GARCÍA-COBOS S. *et al.* Ampicillin-Resistant Non- $\beta$ -Lactamase-Producing *Haemophilus influenzae* in Spain: Recent Emergence of Clonal Isolates with Increased Resistance to Cefotaxime and Cefixime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.51, n.7, p.2564-2573, 2007.
- FUNASA—<http://www.funasa.gov.br> - Boletim Eletrônico Epidemiológico-12/06/2003.
- BROWN, V. M. *et al.* Invasive *Haemophilus influenzae* disease caused by non-type b strains in Northwestern Ontario, Canada, 2002–2008. *Clin Infect Dis* 49:1240–3, 2009.
- 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.
- CDC - Centers For Disease Control. *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 ACIP. [S.l.], [1991]. p.8. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00041736.htm> Acesso em: 28 maio 2008.
- CDC - Centers For Disease Control. *Haemophilus influenzae* type b. [S.l.], [2006].p.14. Disponível em <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pink-book/downloads/hib.pdf> . Acesso em: 14 maio 2008.
- MANNHEIM, W. Family III. Pasteurellaceae. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., p.550-575, 1984.
- WARD, J. L. Invasive infections due to *Haemophilus influenzae* serotype f (Hif) – is Hif an emerging pathogen? *Clinical Infectious Diseases*. v.22, n.6, p.1077-1081, 1996
- UBUKATA, K. *et al.* Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. v.45, n.6, p.1693-1699, 2001.
- SANBONGI, Y. *et al.* Molecular Evolution of  $\beta$ -Lactam-Resistant *Haemophilus influenzae*: 9-Year Surveillance of Penicillin-Binding Protein 3 Mutations in Isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.50,n.7, p.2487-2292, 2006.
- 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.
- BRYSKIER, A. Epidemiology of Resistance to Antibacterial Agents. In: *Antimicrobial Agents: Antibacterials and antifungals*. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.39-92, 2005.
- JONES, R. The impact of antimicrobial resistance: Changing epidemiology of community acquired respiratory-tract infections. *Am J Health Syst Pharm* 56:S4–S11, 1999.
- FALLA, T. J. *et al.* PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *Journal Clinical Microbiology*, v.32, n.10, p. 2382-2386, 1994.
- SCHUMACHER, S. K., *et al.* Prevalence and genetic diversity of nontypeable *Haemophilus influenzae* in respiratory tract of infants and primary caregivers. *Pediatr. Infect Dis. J.* Feb; 31 (2): 145-9, 2012.