

Estudo de Cepas de *Haemophilus influenzae* Isoladas no
Período Pré e Pós-vacinal com a vacina contra o Hib:
Caracterização de Marcadores de Resistência a Antibióticos e
Possíveis Mudanças Genéticas na Região Capsular do Hi.

Alice Aurora Batalha de Jesus

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Antônio Eugênio C.C. de Almeida
Ivano de Filippis

Rio de Janeiro
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo de Cepas de *Haemophilus influenzae* Isoladas no Período Pré e Pós-vacinal com a vacina contra o Hib: Caracterização de Marcadores de Resistência a Antibióticos e Possíveis Mudanças Genéticas na Região Capsular do Hi.

Alice Aurora Batalha de Jesus

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 e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. _____ (USP/São Paulo)
Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

Prof. _____ (IMPPG/UFRJ)
Dra. Lúcia Martins Teixeira

Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ)
Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Orientadores:

Dr. Antônio Eugênio C.C. de Almeida
INCQS/FIOCRUZ

Dr. Ivano de Filippis
INCQS/FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus, Alice Aurora Batalha

Estudo de cepas de *Haemophilus influenzae* isoladas no período pré e pós-vacinal com a vacina contra o Hib: caracterização de marcadores de resistência a antibióticos e possíveis mudanças genéticas na região capsular do Hi./ Alice Aurora Batalha de Jesus. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

xviii, 92f. il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2007. Orientadores: Antônio Eugênio C.C. de Almeida e Ivano de Filippis.

1. *Haemophilus influenzae* 2. Região Capsular 3. Marcadores de resistência 4. Antimicrobianos. I- Título

Study of *Haemophilus influenzae* Strains Isolated During the Pre and Post Hib Vaccination Era: Characterization of Antibiotic Resistance Markers and Possible Genetic Changes within the Capsular Region

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e à minha irmã, pessoas que sempre fazem parte das minhas conquistas me incentivando, dando orientação quer no campo intelectual ou campo emocional. Agradeço a Deus por elas fazerem parte da minha vida.

Aos meus queridos orientadores, Prof. Eugenio e Ivano, por terem me aceito como sua orientanda, pelos momentos engraçados, pela confiança depositada em mim, pela paciência, por respeitarem minhas idéias, por terem me ensinado o que é o mundo da pesquisa. Por tudo isso, vocês estarão sempre presentes na história da minha vida. Obrigada de coração.

À Dra. Keyla Belízia Feldman Marzochi por ter participado do primeiro seminário deste trabalho, pelo incentivo dado e pelas sugestões ao longo desta dissertação.

À Dra. Maysa Mandetta Clementino pelo clima amigo e descontraído e por me defender das “pegadinhas” dos meus orientadores, que sempre ficarão como boas lembranças.

A todos do Setor de Coleções de Culturas por terem me recebido tão bem e em especial a Cátia Chaia por me apoiar em todas as horas, a Claudia Andrade pelas horas de brincadeiras e muitos sorrisos e ao Carlos Eduardo por ter me aceito como sua amiga.

Não posso jamais esquecer da pequena “Natty”, Nathalia Caldeira, de um grande coração, por ter me aturado nestes dois anos no Setor de Vacina de Hib.

A Letícia, do Setor de Vacina de Hib, que me ajudou e participou no início desta minha caminhada.

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

A todos as instituições através do seu corpo técnico e científico que participaram doando as cepas de *Haemophilus influenzae* permitindo assim, que este trabalho fosse realizado.

Ao Programa CNPq que, através da concessão de bolsa, viabilizou a realização desta pesquisa.

À Direção do INCQS, anterior e a atual, pelo apoio, incentivo e colaboração para realização desta dissertação.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária pela atenção com que sempre me receberam.

Ao Setor da Plataforma de Sequenciamento/PDTIS da FIOCRUZ, em especial a Aline e a Andressa, meus sinceros agradecimentos, sobretudo pela postura gentil com que me receberam.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Libera Maria Dalla Costa, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, e a Carmen Antonia Sanches Ito, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela sensibilidade e pela generosidade ao socializarem informações de pesquisa que contribuíram para este trabalho.

*Ao meu companheiro e amigo, Flávio Antônio,
por sempre me apoiar e acreditar em mim.
Agradeço todos os dias a Deus por estarmos juntos nesta vida.*

“Se, em cada semana de nossas existências, ajudássemos apenas uma pessoa, uma única – com o estímulo de nosso abraço, de nosso sorriso, de uma palavra amiga –, no final da existência teríamos transformado meio mundo, pois, se algo de certo há em nossas vidas, é que o bem contagia”.

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

A bactéria *Haemophilus* da espécie *influenzae*, pode causar no homem diversas infecções, invasivas ou não. O *H. influenzae* do tipo b (Hib), antes da introdução da vacina conjugada contra Hib, associava-se a infecções como epiglote, artrite séptica, bacteriemia, pneumonia septicemia e meningite, principalmente em crianças. As outras espécies tipáveis (a,c,d,e,f) e não tipáveis estavam associadas a infecções do trato respiratório adquiridas na comunidade. Após a introdução dessa vacina, houve redução expressiva das doenças causadas pelo Hib em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil. Atualmente, outros tipos da espécie *H. influenzae* (Hi) que não o Hib estão sendo isoladas não somente em crianças, causando infecções graves. O ressurgimento de casos por Hib, em crianças vacinadas, tem sido reportado como possível falha vacinal. Esses fatos preocupam a Saúde Pública no mundo, demonstrando que mudanças epidemiológicas podem estar ocorrendo devido à seleção de cepas após a introdução da vacina. Neste estudo, mudanças genéticas na região capsular do Hi foram encontradas em cepas isoladas nos períodos pré e pós-vacinal de três estados brasileiros. Através do estudo de susceptibilidade foram encontradas cepas produtoras de β -lactamase (BLA⁺) e não produtoras resistentes a ampicilina (BLNAR). A análise de redução da susceptibilidade às quinolonas foi avaliada utilizando-se o ácido nalidíxico como marcador, confrontando-se a resistência deste antibiótico com os marcadores moleculares das regiões determinantes de resistência a quinolonas (QRDRs) através do sequenciamento dos genes *gyrA* e *parC* que codificam a síntese das proteínas GyrA e ParC. Os resultados obtidos demonstraram que o ácido nalidíxico é o antibiótico mais indicado desse grupo para detectar a redução da sensibilidade. O presente estudo mostra a necessidade de que os laboratórios de rotina e de pesquisa avaliem e desenvolvam métodos simples e rápidos, capazes de indicar as possíveis mudanças capsulares e o surgimento de cepas resistentes auxiliando a Vigilância Epidemiológica e a Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The bacteria specie *Haemophilus influenzae* can cause several infections on men, either invasive or not. Before the introduction of conjugated vaccine against type b *H. influenzae* (Hib), it was associated to infections like epiglottitis, septic arthritis, bacteremia, pneumonia, septicemia and meningitis, occurring mostly in children. The other typeable species (a,c,d,e,f) and not typeable (NT) were associated to infections of respiratory tract acquired in the community. After introducing this vaccine, expressive reduction of diseases caused by Hib has been observed worldwide, including Brazil. Recently, different types of *H. influenzae* species other than Hib have been isolated in children and adults, causing severe infections. The reemergence of Hib cases in vaccinated children has been reported as a possible vaccine failure. These facts are a concern to public health departments around the world showing that epidemiologic changes may happen due to the selection of strains after vaccine introduction. In this study, genetic changes in the capsular region of Hib were found in isolated strains in the pre and post vaccinal periods in three Brazilian states. Through susceptibility studies, β -lactamase producer strains were found as well as non producer resistant to ampicillin (BLNAR). Analysis of susceptibility reduction to quinolones was evaluated by using nalidixic acid as a marker, and comparing the resistance to this antibiotic to molecular markers of the determining regions of resistance to quinolones (QRDRs) through sequencing of *gyrA* and *parC* genes that codify the synthesis of GyrA and ParC proteins. The results show that nalidixic acid is the most suitable antibiotic of this group able to detect susceptibility reduction to quinolones. This study shows that there is a need for routine and research laboratories to evaluate and develop simple and quick methods to indicate possible capsule changes and emergence of resistant strains, to help epidemiological and sanitary surveillance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de vacinação dos quatro tipos de vacinas com suas respectivas composições antigênicas.....	9
Tabela 2: Perfil bioquímico e biotipagem do <i>Haemophilus influenzae</i>	24
Tabela 3: Critérios de interpretação dos testes de susceptibilidade empregados no presente estudo.....	29
Tabela 4: Critérios de interpretação de testes de susceptibilidade ao ácido nalidíxico de <i>Haemophilus influenzae</i> empregados no presente estudo.....	30
Tabela 5: Iniciadores empregados para a determinação de tipos capsulados, a caracterização de marcadores de resistências a quinolonas e de variações capsulares de <i>Haemophilus influenzae</i>	32
Tabela 6: Distribuição e classificação das cepas de <i>Haemophilus influenzae</i> estudadas.....	37
Tabela 7: Classificação de cepas de <i>H. influenzae</i> procedentes de materiais clínicos.....	38
Tabela 8: Fenótipos de resistência a antimicrobianos entre amostras de <i>H. influenzae</i> de acordo com os resultados de testes de difusão a partir de discos e da produção de β -lactamase.....	39
Tabela 9: Substituições dos aminoácidos na região QRDRs de <i>Haemophilus influenzae</i> seqüenciados com os respectivos CIMs do ácido nalidíxico e da ciprofloxacina.....	46
Tabela 10: Distribuição do genótipo I e II em Hi nos períodos pré e pós-vacinal.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado do <i>locus cap</i> do <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b.....	4
Figura 2: Diluição seriada da solução estoque da ampicilina	27
Figura 3: Esquema de organização da cápsula de <i>H. influenzae</i> apresentando a localização dos iniciadores utilizados por Schouls e colaboradores (2008) e a região dos iniciadores específicos (Cap-1 e Cap-2) desenhados para este estudo..	34
Figura 4: Comparação entre os halos de inibição em mm (DD) e as CIMs em µg/mL (AD) obtidos para amostras de <i>Haemophilus influenzae</i> frente a ampicilina.....	41
Figura 5: Comparação entre os halos de inibição em mm (DD) e as CIMs em µg/mL (AD) obtidos para amostras de <i>Haemophilus influenzae</i> frente a ciprofloxacina.....	42
Figura 6: Comparação entre os halos de inibição em mm (DD) e as CIMs em µg/mL (AD) obtidos para amostras de <i>Haemophilus influenzae</i> frente ao ácido nalidíxico.....	43
Figura 7: Produto de amplificação dos dois tipos distintos de variantes entre os <i>Haemophilus influenzae</i> genótipo I e genótipo II.....	47
Figura 8: Análise filogenética de sequência de nucleotídeos das 28 amostras de <i>Haemophilus influenzae</i>	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μg	- micrograma
μL	- microlitro
AD	- Ágar diluição
AMC	- Amoxicilina e ácido clavulanato
AMP	- Ampicilina
ATCC	- American Type Culture Collection
<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	- Caldo de brain heart infusion
BLA ⁺	- β -lactamase positiva
BLNAR	- Resistência a ampicilina, não produtora de β -lactamase
BLNAS	- Sensível a ampicilina, não produtora de β -lactamase
BLPACR	- Resistência a ampicilina ou a amoxicilina associadas ao ácido clavulanato, produtora de β -lactamase
BLPAR	- Resistência a ampicilina, produtora de β -lactamase
BSAC	- British Society for Antimicrobial Chemotherapy
<i>cap</i>	- cassete responsável pela síntese e transporte do polissacarídeo
CAP-1,2	- iniciadores para cápsula do <i>H. influenzae</i>
CAT	- Enzima cloranfenicol acetiltransferase
CDC	- Centers for Disease Control and Prevention
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CIP	- Ciprofloxacina
CLO	- Cloranfenicol

CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
CRM ₁₉₇	- Proteína mutante de <i>C. diphtheriae</i>
CRO	- Ceftriaxone
DD	- Disco de difusão
dn/ds	- Razão de substituições não silenciosas (dn) pelas substituições silenciosas (ds)
DTP	- Difteria Tétano e Pertussis/Coqueluche
Fab e Fc	- fragmentos da IgA
FDA	- Food Drug Administration
<i>ftsI</i>	- gene que alteram as PBPs
<i>gyrA</i>	- gene que codifica a proteína GyrA
GyrA	- Subunidade A da DNA girase
<i>gyrB</i>	- gene que codifica a proteína GyrB
GyrB	- Subunidade B da DNA girase
HbOC	- Vacina conjugada com a proteína carreadora CRM ₁₉₇
<i>hcsA,B</i>	- genes da região III do <i>H. influenzae</i>
Hemo	- Hemocultura
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
<i>hifA,B,C,D,E</i>	- genes das organelas fimbrias ou pili
HiNT	- <i>Haemophilus influenzae</i> não tipáveis

HTM	- <i>Haemophilus</i> test médium
I	- Intermediário
IgA	- Imunoglobulina de secreções corporais
IgG	- Imunoglobulina monomérica - Anticorpo
IgM	- Imunoglobulina pentamérica - Anticorpo
IL-1	- Interleucina
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
KDO	- Ácido 2-ceto-3-desoxioctulosônico
L. pleural	- Líquido pleural
L. sinov.	- Líquido sinovial
LCR	- Líquido cefalorraquidiano
LEV	- Levofloxacina
LOM	- Lomefloxacina
LOS	- Lipooligossacarídeo
Low-BLNAR	- Resistente à baixa concentração de ampicilina, não produtoras de β -lactamase
LPS	- Lipolissacarídeo
MEGA	- Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mL	- mililitro
mm	- milímetro
MOX	- Moxifloxacina
MS	- Ministério da Saúde
N/D	- Não determinado
NACI	- National Advisory Committee on Immunization
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAL	- Ácido nalidíxico

NaOH	- Hidróxido de sódio
Nasal	- Nasofaringe
NEG	- Negativo
NV	- Não vacinado
<i>parC</i>	- gene que codifica a proteína ParC
ParC	- Subunidade C da topoisomerase IV
<i>parE</i>	- gene que codifica a proteína ParE
ParE	- Subunidade E da topoisomerase IV
pb	- Pares de base
PBP3	- Proteínas ligantes de penicilina 3
PBPs	- Proteínas ligantes de penicilina
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PE	- Pernambuco
PNI	- Programa Nacional de Imunizações
POS	- Positivo
PRP	- Polirribosil-ribitol-fosfato
PRP-D	- Vacina conjugada com a proteína carreadora toxóide diftérico
PRP-OMP	- Vacina conjugada com a proteína carreadora do complexo protéico da membrana externa da <i>N. meningitidis</i> grupo B
PRP-T	- Vacina conjugada com a proteína carreadora toxóide tetânico
QRDR	- Região determinante de resistência às quinolonas
R	- Resistente
RJ	- Rio de Janeiro
ROB-1	- Enzima β -lactamase codificada pelo gene <i>bla</i> _{ROB-1}
S	- Sensível
SAL	- Teste de soro aglutinação em lâmina

SC	- Santa Catarina
Sec. traqueal	- Secreção traqueal
SESA	- Secretaria de Estado da Saúde
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNPs	- Polimorfismos de nucleotídeo único
SUT	- Sulfametoxazol e trimetoprim
TEM-1	- Enzima β -lactamase codificada pelo gene <i>bla</i> _{TEM}
TNF	- Fator de necrose tumoral
TSA	- ágar tripticase-soja
UFC	- Unidade formadora de colônia
Vac	- Vacinado
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Gerais.....	1
1.2. Histórico.....	2
2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO <i>H. influenzae</i>	2
3. FATORES DE VIRULÊNCIA	3
3.1. Cápsula.....	3
3.2. Outras fatores de virulência	5
3.2.1. <i>Fímbria</i>	5
3.2.2. <i>IgA1 protease</i>	6
3.2.3. <i>Lipooligossacarídeo – LOS</i>	6
4. HISTÓRICO DA VACINA.....	7
4.1. Vacina no Brasil.....	9
5. ANTIBIÓTICOS EMPREGADOS NAS INFECÇÕES CONTRA O HI	10
5.1. Betalactâmicos	10
5.2. Cloranfenicol	11
5.3. Quinolonas	12
5.4. Macrolídeos	13
5.5. Sulfametoxazol e trimetoprim	14
5.6. Rifampicina.....	15
6. EPIDEMIOLOGIA	15
6.1. Situação Atual.....	17
7. JUSTIFICATIVA	19
8. OBJETIVOS	20
8.1. Objetivo Geral.....	20
8.2. Objetivos específicos	20
9. METODOLOGIA	21
9.1. Cepas bacterianas.....	21
9.2. Identificação e sorotipagem	21
9.3. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	25
9.3.1. <i>Método disco de difusão – DD (Kirby-Bauer)</i>	25

9.3.2. Método ágar diluição - AD.....	25
9.3.3. Análise da interpretação do resultado dos testes de susceptibilidade	29
9.3.4. Teste de detecção de β -lactamase.....	30
9.4. Métodos moleculares	31
9.4.1. Extração e purificação do DNA genômico	31
9.4.2. Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
9.4.3. Caracterização molecular da região <i>cap</i>	33
9.4.4. Sequenciamento dos fragmentos obtidos pela PCR	34
9.4.5. Caracterização molecular da região <i>QRDR</i> de resistência às quinolonas.....	35
9.5. Aplicação de métodos de bioinformática.....	35
9.5.1. Montagem das sequências	35
9.5.2. Tradução das sequências.....	35
9.5.3. Alinhamento das sequências	35
9.5.4. Análises filogenéticas	36
10. RESULTADOS	37
10.1. Caracterização das amostras	37
10.2. Teste de susceptibilidade pelo método disco de difusão e CIM	39
10.3. Sequenciamento das QRDRs dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	44
10.4. Sequenciamento dos genes da região capsular	47
11. DISCUSSÃO	52
12. CONCLUSÕES	60
13. PERSPECTIVAS.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A-LISTAGEM DAS AMOSTRAS E SUAS CARACTERÍSTICAS	73
APÊNDICE A-ARTIGO PUBLICADO.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

O gênero *Haemophilus* pertence à família *Pasteurellaceae* que também inclui os gêneros *Actinobacillus* e *Pasteurella* (MANNHEIM, 1984; MYGHRVOLD *et al.*, 1992). É uma bactéria Gram-negativa, imóvel, que não forma esporos, e que pela microscopia, sua morfologia pode ser de cocobacilo Gram-negativo ou de bastonete curto, sendo por isso os *Haemophilus* também referidos como bacilos pleomórficos. 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. paraphrophaemolyticus*, *H. haemoglobinophilus*, *H. ducreyi* e *H. pittmaniae* (JORDENS & SLACK, 1995; EUZÉBY, 2010).

A espécie *Haemophilus influenzae* (Hi) é a mais importante e inclui diversos sorotipos capsulares (a-f) bem como cepas não tipáveis. As doenças causadas por esse microrganismo compõem um leque de infecções, de caráter agudo, que acometem, sobretudo o Sistema Nervoso Central (SNC) e os tratos respiratórios alto e baixo, francamente predominantes em crianças e associadas principalmente ao *Haemophilus influenzae* do tipo capsular b ou Hib (MURPHU *et al.*, 1993).

Os *H. influenzae* são classificados de acordo com os antígenos específicos de suas cápsulas em sorotipos de **a** até **f**, descritos originalmente por Pittman em 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 tipáveis (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) (CDC, 2006).

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 (CAMPOS, 1999).

Os Hi necessitam de dois fatores para o seu crescimento *in vitro*, o fator X (hemina) e o fator V (Nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD), e não produzem hemólise. O meio de cultura mais usado no isolamento destes microrganismos é o ágar chocolate suplementado.

1.2. Histórico

O *Haemophilus influenzae* (Hi) foi descrito pela primeira vez por Pfeiffer, em 1892. A denominação do gênero foi devido à necessidade da hemina (fator X) para o seu crescimento, que é encontrada no sangue de alguns mamíferos. O nome da espécie foi dado erroneamente, pois acreditava-se que era o microrganismo causal da gripe, epidêmica na época (MARRS *et al.*, 2001). Mais tarde, foi descoberto que o agente da gripe era o vírus influenza e que o Hi era o responsável por infecções secundárias (CDC, 2006).

2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO *H. influenzae*

O *Haemophilus influenzae* é, no homem, o agente responsável por diversas infecções, invasivas ou não, que atingem ainda principalmente crianças. O Hi tem como porta de entrada no ser humano 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, 2006).

Das espécies tipáveis, o Hib até a década de 90, era o patógeno que mais causava infecções como epiglotite, artrite séptica, bacteriemia, pneumonia, sepse, celulite e meningite (GRANOFF & CATES, 1985; MURPHU *et al.*, 1993). As espécies não tipáveis, bem como os outros sorotipos, são responsáveis por infecções do trato respiratório, adquiridas muitas vezes em áreas coletivas, causando pneumonia, otite média e sinusite (WARD, 1996; PERIC *et al.*, 2003).

Apesar de causar várias doenças invasivas, apenas a meningite é enquadrada entre as doenças de notificação compulsória no Brasil (BEPA, 2004), sendo considerada até os dias atuais um problema de saúde mundial, embora desde 1986 seja passível de controle através de imunização eficaz (WHO, 2007).

Na América do Norte, antes da introdução da vacina conjugada contra Hib (*Haemophilus influenzae* tipo b), este agente era encontrado em até 95% das culturas de líquido e sangue e apenas 10% dos casos ocorriam em crianças maiores que 10 anos de idade (WARD, 1996), com situação semelhante ocorrendo em outros países tais como Inglaterra, Holanda, Finlândia e Brasil (ADAMS *et al.*, 1993; DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

3. FATORES DE VIRULÊNCIA

3.1. Cápsula

A cápsula de polissacarídeo dos Hi é o principal fator de virulência entre os seis sorotipos (a-f), sendo o Hib mais freqüente nos quadros infecciosos. A sua cápsula é constituída de polirribosil-ribitol-fosfato (PRP), que o faz ser menos vulnerável aos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, protegendo-o contra a fagocitose, ao impedir a fixação de anticorpos e a lise bacteriana pela fixação do complemento (TRABULSI & MARTINEZ, 2004). Além destes mecanismos de defesa, a cápsula, presente também em outros microrganismos, pode prevenir a desidratação da célula bacteriana no ambiente em que se encontra, o que facilita a transmissão entre os hospedeiros. É composta de uma longa cadeia de polissacarídeos consistindo de unidades repetidas menores. Sua biossíntese ocorre no citoplasma e o polissacarídeo é transportado através da membrana citoplasmática para o periplasma, atravessando a membrana externa e ancorando-se na superfície bacteriana (SUKUPOLVI-PETTY *et al.*, 2006).

No Hi os genes envolvidos na expressão da cápsula são os maiores determinantes de virulência. Eles codificam a síntese das proteínas responsáveis pelo transporte do polissacarídeo e estão arranjados em forma de cassete (locus *cap*). Este elemento possui um tamanho de 18 kb (nucleotídeo). São divididos em três regiões distintas, denominadas regiões I, II e III (KROLL *et al.*, 1991). Esta organização é

comum a todos os seis tipos de Hib capsulados. A região II é específica para cada um dos sorotipos e está situada entre a região I e III (KROLL *et al.*, 1989). O cassete do Hib é formado por 10 genes localizados em um único locus. A primeira região contém quatro genes *bex* (*bexA*, *bexB*, *bexC*, *bexD*) que estão envolvidos na exportação da cápsula de polissacarídeo, a região II contém quatro genes *bcs* (*bcs1*, *bcs2*, *bcs3*, *bcs4*) envolvidos na síntese do polissacarídeo específico e a última região (III) possui 2 genes *hcs* (*hcsA*, *hcsB*) envolvidos na exportação do polissacarídeo para a superfície da célula (SATOLA *et al.*, 2003; SUKUPOLVI-PETTY *et al.*, 2006). Os isolados 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 um deles apresenta uma deleção de 1.2 kb na porção *bex A* e no IS 1016 (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). A figura 1 demonstra de maneira simplificada o locus *cap* do Hib.

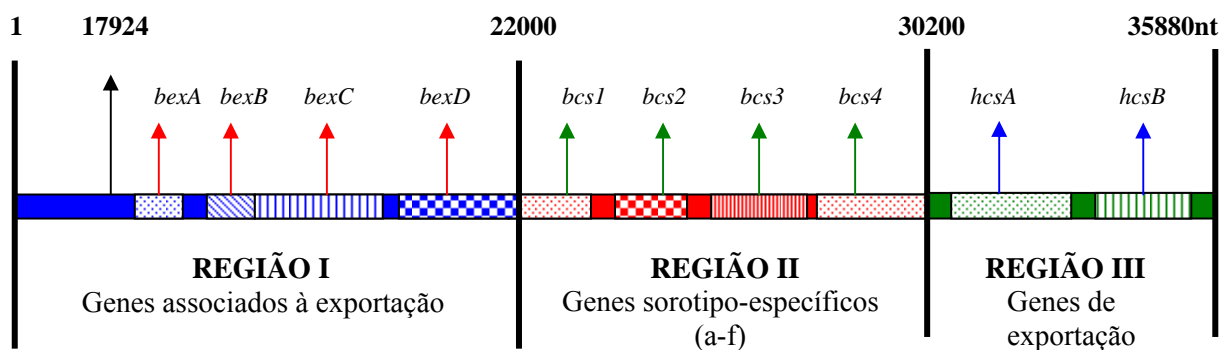


Figura 1: Esquema simplificado do locus *cap* do *Haemophilus influenzae* do tipo b

A maioria das amostras dos Hib sorotipos (a-f) possui apenas uma cópia do *cap*, ao contrário do sorotipo b, em que mais de 98% das suas amostras clínicas apresentam duas cópias (TRABULSI & MARTINEZ, 2004). A presença de múltiplas cópias do *cap* de Hib isolado de quadros infecciosos de crianças vacinadas com a vacina conjugada contra Hib, foi relatado por Cerquetti e colaboradores (2005). No estudo foram analisadas 90 cepas de Hib isoladas de crianças vacinadas e

139 cepas de crianças não vacinadas. Os autores concluíram que as cepas isoladas das crianças vacinadas apresentavam a região *cap* com mais cópias do que as cepas das crianças não vacinadas, sugerindo, portanto, que a amplificação do *cap* poderia contribuir para a falha da vacina, tema este que é bastante pesquisado atualmente.

3.2. Outras fatores de virulência

3.2.1. Fímbria

Fímbrias ou pili são organelas filamentosas que se encontram na superfície bacteriana. Estão envolvidas no mecanismo de aderência às células epiteliais do hospedeiro prevenindo contra a remoção natural de bactérias pelo organismo. Os Hi também possuem fímbrias cuja principal função parece ser a capacidade de aderência à superfície mucosa permitindo facilmente a colonização do trato respiratório. Estas fímbrias são proteínas complexas contendo uma subunidade maior codificada pelo gene *hifA* e duas subunidades menores codificadas pelos genes *hifD* e *hifE*. Outros dois conjuntos de genes *hifB* e *hifC* são requeridos pelo Hi para a formação da fímbria (GILSORF et al., 1997). Deste modo, estas organelas têm contribuído para a virulência tanto de Hi capsulados (tipáveis) como de não capsulados (não tipáveis). Em um estudo realizado por Nakamura e colaboradores (2006) foi analisada a distribuição do gene *hifA*, através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em 167 cepas de Hi isoladas de pacientes com infecções no trato respiratório. Destas, 163 (97,6%) cepas isoladas eram não capsuladas e 18,4% das cepas isoladas continham o gene *hifA*. Apenas 4 isolados (2,4%) eram cepas de Hi capsuladas, identificados como Hib e não possuíam o gene *hifA*. Os autores sugeriram que as fímbrias podem ter um papel considerável como adesinas em isolados de HiNT. Devido à importância destas organelas em mediar a aderência na superfície mucosa das células humanas, Gilsdorf e colaboradores (1997) pensaram que essas estruturas seriam um caminho para a produção de vacinas contra HiNT, uma vez que a vacina disponível é específica contra o tipo capsular b (Hib) não oferecendo, portanto, proteção contra os outros sorotipos nem também contra os HiNT.

3.2.2. IgA1 protease

A imunoglobulina IgA é encontrada abundantemente na superfície do trato respiratório do homem e nas mucosas em geral. Ela participa do mecanismo de defesa do hospedeiro, impedindo a aderência de bactérias às membranas mucosas. A IgA aglutina as bactérias aprisionando-as ao muco que será expelido pelo organismo através de movimentos mucociliares do trato respiratório (MARRS *et al.*, 2001). A IgA1 protease é uma enzima específica de algumas bactérias que cliva a imunoglobulina humana IgA em dois fragmentos (Fab e Fc); este processo impede a aglutinação bacteriana ao muco e a expulsão destas bactérias do organismo (VITOVSKI *et al.*, 2002).

Essa enzima é secretada por diversos microrganismos como o *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Streptococcus pneumoniae* (MARRS *et al.*, 2001). Os HiNT também produzem esta enzima, mas apresentam um nível de atividade maior quando isolados de pacientes com infecções invasivas, o que certamente facilita o processo infeccioso, diferentemente dos HiNT isolados da orofaringe de pessoas assintomáticas. Reforçando esta linha de investigação, em 2002, Vitovski e colaboradores identificaram a enzima IgA1 protease como um fator de virulência dos HiNT e a consideraram um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas contra esses microrganismos.

3.2.3. Lipooligossacarídeo – LOS

Os Hi, por fazerem parte do grupo de bactérias Gram-negativas, apresentam em sua membrana externa uma estrutura similar ao lipopolissacarídeo (LPS). Esta estrutura é chamada de lipooligossacarídeo (LOS), sendo formado pelo lipídeo A e por oligossacarídeos que incluem glicose, lactose, galactose, heptose, fosfocolina e ácido siálico em suas cadeias laterais. O lipídeo A e os oligossacarídeos estão unidos por um ácido 2-ceto-3-desoxioctulosônico (KDO), e variam em quantidade de cepa a cepa e também em gerações diferentes de uma mesma cepa (KONEMAN *et al.*, 2001). O LOS possui a mesma atividade biológica da endotoxina LPS das enterobactérias e também outras propriedades de virulência como adesão às células

do homem e resistência ao poder bactericida do soro (TRABULSI & MARTINEZ, 2004).

Nos processos infecciosos, a endotoxina é liberada pelo Hi mediante a lise bacteriana, o que ocorre quando o paciente está em uso de determinados antibióticos, podendo levar a uma piora do quadro do paciente, e melhorando à medida que a endotoxina é degradada. A liberação de endotoxinas também pode ocorrer devido à fagocitose dos Hi pelos macrófagos, que produzem a interleucina-1 (IL-1), a qual é transportada pelo sangue ao hipotálamo, aumentando a temperatura do corpo, decorrendo a febre. Os macrófagos secretam um polipeptídeo denominado fator de necrose tumoral (TNF) que, ao se ligar aos tecidos do corpo, altera o seu metabolismo. O Hib, por exemplo, quando presente no líquido, levado por via hematogênica, pelos macrófagos do sangue, provoca a liberação de IL-1 e TNF pelas células fagocíticas enfraquecendo, assim, a barreira hematoencefálica que protege o sistema nervoso central (SNC) contra infecções facilitando desta forma a infecção invasiva (TORTORA *et al.*, 2000).

4. HISTÓRICO DA VACINA

Os trabalhos pioneiros realizados por Fothergill e Wright em 1933 mostraram que existia algum fator no sangue humano que protegia contra Hib. Mais tarde descobriram que a proteção era devida à produção de anticorpos contra a cápsula (polissacarídeo) do Hib e estava relacionada com a idade do paciente. Esta observação explica a forte associação de crianças na idade entre 2 meses e 2 a 3 anos com risco de meningite por este microrganismo, pois os recém-nascidos são protegidos pelos anticorpos que atravessam a placenta e as crianças acima de 2-3 anos ou mais já podem estar protegidas por anticorpos naturais (MARRS *et al.*, 2001). A observação do polissacarídeo da cápsula do Hib estimulando o organismo a produzir anticorpos específicos contra esta bactéria serviu como guia para o desenvolvimento, na década de 1970, da primeira vacina desenvolvida contra Hib composta basicamente da cápsula polissacarídica purificada, ou seja, o polirribosil-ribitol-fosfato (PRP) purificado (ADAMS *et al.*, 1993). Na Finlândia, em 1974, verificou-se que esta vacina era eficaz em crianças a partir de 18 a 71 meses de idade (WHO, 2006). A resposta imunológica conferida pela vacina ativava os linfócitos B,

produzindo imunoglobulina IgM, sem a intervenção dos linfócitos T, o que não permitia estimular a resposta de células de memória. Crianças com até a idade de 18 meses possuem os linfócitos B em estado de maturação insuficiente para permitir uma resposta imune adequada sem a intervenção dos linfócitos T (CDC, 1991).

Com o objetivo de aumentar a proteção em crianças menores de 18 meses de idade e tendo o conhecimento que o PRP é um antígeno timo-independente, tornou-se necessário acoplar o PRP a uma proteína carreadora, esta timo-dependente, desenvolvendo assim a vacina conjugada. Desta forma, esta vacina permite que o sistema imune estimule a produção de linfócitos T, que ativarão os linfócitos B produzindo precocemente, a partir do segundo mês de vida da criança, anticorpos contra o PRP, como a imunoglobulina IgM e a imunoglobulina IgG. Também os linfócitos T são diferenciados em células de memória permitindo que o sistema imune responda rapidamente ao entrar em contato novamente com o antígeno capsular (PRP) do Hib (SCHNEERSON *et al.*, 1980).

O PRP tem sido conjugado a vários tipos de proteínas carreadoras como a proteína de mutante de *C. diphtheriae* (CRM₁₉₇) (HbOC), o toxóide diftérico (PRP-D), o toxóide tetânico (PRP-T) e a proteína de membrana externa de *N.meningitidis B* (PRP-OMP), disponibilizando-se, assim, quatro tipos de vacina com o mesmo princípio imunogênico (PRP) contra Hib, que estão licenciadas, para serem aplicadas em crianças a partir de 6 semanas. Esta variedade de vacinas contra Hib tem sido desenvolvida para ajudar a diminuir o número de doses administradas nas crianças e verificar os diversos resultados dos títulos de anticorpos produzidos em menores de 1 ano de idade (MARRS *et al.*, 2001).

A vacina com o PRP-D foi a primeira licenciada em 1987, mas não apresentou uma resposta imune eficiente em crianças menores de 18 meses; e atualmente não está mais disponível nos Estados Unidos (CDC, 2006). A tabela 1 apresenta os quatro tipos de vacinas contra Hib disponíveis e o esquema das doses recomendadas:

Tabela 1: Esquema de vacinação dos quatro tipos de vacinas com suas respectivas composições antigênicas.

Vacina	2 meses	4 meses	6 meses	12-15 meses
HbOC ¹	1ª dose	2ª dose	3ª dose	Dose Reforço
PRP-T ²	1ª dose	2ª dose	3ª dose	Dose Reforço
PRP-OMP ³	1ª dose	2ª dose	-----	Dose Reforço
PRP-D ⁴	-----	-----	-----	1ª dose

¹ vacina conjugada com proteína carreadora CRM¹⁹⁷ ² vacina conjugada com a proteína carreadora toxóide tetânico ³ vacina conjugada com a proteína carreadora do complexo protéico da membrana externa da *N. meningitidis* grupo B ⁴ vacina conjugada com a proteína carreadora toxóide diftérico

Fonte: Adaptação CDC, 2006.

4.1. Vacina no Brasil

Os processos infecciosos associados ao Hib são preveníveis, desde o final da década de 80, com a introdução da vacina conjugada nos Estados Unidos e Europa (ROSSI *et al*, 2007). Na América Latina, o Uruguai, em 1994, e o Chile, em 1996, foram os primeiros países que introduziram a vacina contra Hib obtendo redução importante na incidência da meningite. A partir de 1997, a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) recomendou a aplicação desta vacina em todo o território da América Latina (BEPA, 2004). Em nosso país, foi introduzida em 1999 como parte do 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. Atualmente a apresentação deste imunobiológico está na forma combinada Hib + DTP (Difteria, Tétano e Pertussis/Coqueluche), que tem como vantagem a aplicação única, sendo produzida no Instituto Tecnológico Bio-Manguinhos/Fiocruz (FIOCRUZ, 2007).

Poucos trabalhos na área são realizados no Brasil, sendo que os de Ribeiro e colaboradores (2003) e De Almeida e colaboradores (2005) mostraram que após a

introdução da vacina conjugada (Hib) no país houve uma redução expressiva das doenças invasivas pelo tipo sorológico b bem como dos portadores (assintomáticos) colonizados em nasofaringe por este microrganismo, em diversas partes do mundo (PELTOLA *et al.*, 1999). Por outro lado, esta redução parece que abriu espaços para o surgimento de infecções com outros sorotipos, os não b (RIBEIRO *et al.*, 2003; DWORKIN *et al.*, 2007).

Na prevenção contra Hib, além da vacina conjugada recomendado pelo 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 (BRASIL, 1998).

5. ANTIBIÓTICOS EMPREGADOS NAS INFECÇÕES CONTRA O HI

Os antibióticos 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 reflete na prática a não eficácia do antibiótico. 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 antibióticos, como betalactâmicos, quinolonas, cloranfenicol, macrolídeos, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprim. Isto é importante para nortear o uso adequado e emergencial que muitas vezes se faz necessário na clinica médica, sobretudo quando não há proteção vacinal, como para os Hi não b (Hinb) e para os HiNT (BRYSKIER, 2005^a).

5.1. Betalactâmicos

Os betalactâmicos atuam na parede celular bacteriana, inibindo a síntese da camada de peptidoglicano (WAXMAN & STROMINGER, 1983; MCDOWELL &

REED, 1989). A resistência dos *H. influenzae* à ampicilina, pertencente ao grupo de beta-lactâmicos, pode ocorrer por dois mecanismos: não enzimáticos ou enzimáticos.

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 *ftsI*, são denominadas de cepas resistentes a ampicilina não produtoras de betalactamase (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 betalactâmicos (UBUKATA *et al.*, 2001; SANBONGI *et al.*, 2006).

O mecanismo de resistência enzimático ocorre em cerca de 30% das cepas de Hi e são denominadas betalactamases positivas (BLA+) (FELMINGHAM *et al* 2000). Dentro destas resistências enzimáticas, se conhece a betalactamase TEM-1, codificada pelos genes *bla*_{TEM} responsáveis por 90 a 95% de resistências encontradas no Hi, e a betalactamase ROB-1 codificada pelos genes *bla*_{ROB-1} responsável por 5 a 10% de resistências nas cepas de Hi (KARLOWSKY *et al.*, 2000). No estudo de Farrell e colaboradores (2005), o Brasil participou com 779 cepas de Hi e destas apenas 81 (10.4%) foram BLA+ com a seguinte prevalência: 97.5% foram TEM-1 e 2.5% foram ROB-1. As cepas de Hi que apresentam este mecanismo enzimático e resistência a ampicilina são denominadas de betalactamase positiva e resistência a ampicilina (BLPAR) (KARLOWSKY *et al.*, 2000).

Amostras de Hi isoladas com ambos mecanismos de resistência (betalactamase e PBP3), que apresentam betalactamase positiva e resistência à ampicilina ou à amoxicilina associadas ao ácido clavulanato, são denominadas BLPACR (SANBONGI *et al.*, 2006, GARCÍA-COBOS *et al.*, 2007).

5.2. Cloranfenicol

O cloranfenicol foi, por muito tempo, o antibiótico de escolha para o tratamento em doenças invasivas causadas pelo Hi (ISTRE *et al.*, 1984). O mecanismo de ação bacteriostática do cloranfenicol é por inibição da síntese protéica através da subunidade 50S do ribossomo (YAO & MOELLERING, 1995). A resistência mais freqüente dos Hi ao cloranfenicol está normalmente associada com a

produção da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) codificada pelo gene *cat* plasmidial, inativando este antibiótico. Um outro mecanismo é devido a mutações no cromossomo que resultam na diminuição da permeabilidade da membrana externa da célula (QUINTILIANI & COURVALIN, 1995).

O conhecimento de sua toxicidade, que pode causar depressão medular, trombocitopenia, anemia aplástica, leucopenia e a síndrome cinzenta do recém-nascido (FEDER *et al.*, 1981; YAO & MOELLERING, 1995), e também pelo aparecimento de cepas resistentes, inclusive no Brasil (DE ALMEIDA *et al.* 2006), levou a que sua utilização não seja priorizada.

5.3. Quinolonas

O ácido nalidíxico foi o primeiro antibiótico do grupo de quinolonas, desenvolvido inicialmente como um antisséptico urinário. Novas quinolonas têm sido sintetizadas a partir da modificação da estrutura original do ácido nalidíxico. Esses novos antibióticos foram denominados fluoroquinolonas devido à adição na sua fórmula estrutural de derivados de flúor. Encontram-se neste novo grupo de quinolonas: a norfloxacin, a ciprofloxacina, a levofloxacina, a lomefloxacina, a moxifloxacina e outros (YAO & MOELLERING, 1995).

Excluindo o ácido nalidíxico e a norfloxacin que são indicados para tratamento das infecções do trato urinário, o restante desse grupo de antibióticos citado acima apresenta atividade contra o Hi no tratamento oral para infecções do trato respiratório. A maioria dos estudos de vigilância da resistência dos Hi demonstra uma percentagem <1% de resistência às quinolonas. Na Europa, vem sendo encontradas cepas de Hi isoladas do trato respiratório com diminuição da sensibilidade à ciprofloxacina e outras quinolonas, tornando-se um problema clínico e de saúde pública em países como a Espanha onde ocorre um alto nível de resistência a esses antibióticos por patógenos responsáveis por infecções respiratórias crônicas, o que é explicável pelo uso repetitivo de quinolonas por via oral (PÉREZ-VAZQUEZ *et al.*, 2003).

As quinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano, atuando sobre duas enzimas, a DNA girase que é um tipo de topoisomerase II (CABRAL *et al.*, 1997) e

topoisomerase IV, interferindo na replicação do DNA e conseqüentemente na reprodução bacteriana (DRLICA & ZHAO, 1997).

A enzima DNA girase controla o processo de superespiralização do DNA e alivia o estresse topológico proveniente da transcrição e replicação do DNA. A topoisomerase IV está envolvida no processo de separação das fitas filhas de DNA após a duplicação do cromossoma. Ambas enzimas são necessárias para os processos de crescimento e de divisão celular (DRLICA & ZHAO, 1997). Estas enzimas são inter-relacionadas, sendo ambas tetraméricas com pares de duas subunidades diferentes. A GyrA e a GyrB são subunidades da DNA girase, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente e homólogas a ParC e a ParE que são subunidades da topoisomerase IV, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente (HOOPER, 2001).

O principal mecanismo de resistência dos Hi à fluoroquinolona ocorre pela substituição de aminoácidos nas proteínas (GyrA e ParC) localizados numa região conhecida como determinante de resistência às quinolonas (QRDR), que é o sítio receptor deste grupo. Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) sugerem que a subunidade A da topoisomerase II (GyrA) e a subunidade C da da topoisomerase IV (ParC) podem ser o primeiro e segundo alvo de ação das quinolonas nos Hi, respectivamente. Além deste mecanismo, dois novos mecanismos associados podem explicar o aumento do nível de resistência dos Hi a este grupo de antibiótico, que são: o aumento de efluxo, que é o bombeamento das fluoroquinolonas localizadas no citoplasma bacteriano para fora da célula e a perda de porina que reduz a entrada das fluoroquinolonas no citoplasma bacteriano (PÉREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2007).

Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) mostraram que a diminuição da susceptibilidade dos Hi às quinolonas está normalmente associada com alterações de aminoácidos na região QRDRs da GyrA e ParC e sugerem que o ácido nalidixico e as outras fluoroquinolonas orais podem ser usadas em rotinas laboratoriais com teste de screening para detectar a diminuição da susceptibilidade às quinolonas nos Hi.

5.4. Macrolídeos

Os macrolídeos (claritromicina e azitromicina) são atualmente recomendados para o tratamento de pneumonias adquiridas nas comunidades e bronquites crônicas,

sendo agentes alternativos à levofloxacin e à moxifloxacin (BOGDANOVICH *et al.*, 2006). Este grupo de antibióticos liga-se à subunidade 50S impedindo o movimento de translocação do ribossomo. Os macrolídeos são, portanto, inibidores da síntese protéica (PERIC *et al.*, 2003; TRABULSI & MARTINEZ, 2004).

A telitromicina é um novo antibiótico semissintético derivado da eritromicina que pertence à classe cetolídeo. Seu uso é indicado no tratamento de infecções do trato respiratório como pneumonia, bronquite, faringite e sinusites (Telitromicina, 2005). No Japão, a telitromicina foi aprovada em dezembro de 2003 e no ano seguinte com o uso deste antibiótico nas infecções do trato respiratório houve o surgimento rápido de resistência em cepas de *H. influenzae* (HORII *et al.*, 2007). Já no Brasil, o Centro de Farmacovigilância do Ceará (CEFACE) liberou um informe, em janeiro de 2006, sobre o risco no uso da telitromicina devido a reações adversas hepáticas e biliares. Também a Food Drug Administration (FDA) colocou restrições ao seu uso, limitando-a para o tratamento de pneumonia adquirida na comunidade de gravidade leve a moderada.

5.5. Sulfametoxazol e trimetoprim

Estes antibióticos, ainda muito utilizados em infecções respiratórias, agem sinergicamente e são inibidores do metabolismo do ácido fólico. Interferem no metabolismo celular e na sua replicação bloqueando a produção do tetraidrofolato; inibindo a produção do tetraidrofolato, previnem a síntese da timidina, impedindo a replicação do DNA (TRISTAM *et al.*, 2007).

No Brasil, a prevalência de isolados de Hib resistentes a sulfametoxazol e trimetoprim (SUT) aumentou de 32.6% no período 1990 a 1999 (antes da introdução da vacina contra Hib) para 65.8% durante o período de 2000 a 2003 (após a introdução da vacina contra Hib). Entre estes isolados, 10% foram resistentes à ampicilina, 12.5% foram resistentes ao cloranfenicol, e a resistência para rifampicina foi detectada em 8.2% e 9.7% dos isolados nos dois períodos, respectivamente (DE ALMEIDA *et al.*, 2006).

5.6. Rifampicina

A rifampicina é indicada para o tratamento das diversas formas de tuberculose e hanseníase mesmo que em associação com outros antibacterianos, na tentativa de diminuir a resistência. É também o fármaco de escolha no tratamento de possíveis portadores nasofaríngeos de *Neisseria meningitidis*, indivíduos de qualquer idade que mantiveram contato com pacientes de meningite meningocócica, bem como para a quimioprofilaxia de crianças pequenas e sem imunização específica que tiveram contato familiar ou em enfermaria com meningite pelo Hib (HINRICHSEN, 2004). Sua atuação é inibindo o processo de transcrição (BRYSKIER, 2005^b).

6. EPIDEMIOLOGIA

O Hi é um microrganismo encontrado no trato respiratório do homem e sua transmissão ocorre através da inalação de gotículas da nasofaringe. Embora causem diversas infecções invasivas são frequentemente encontrados na orofaringe e nasofaringe de indivíduos saudáveis (portadores), sendo estes disseminadores deste microrganismo (WHO, 2006). Cerca de 20 a 80% das crianças menores de 5 anos podem incluir, em algum momento, o Hi na microbiota da nasofaringe, sendo os microrganismos adquiridos desde os primeiros dias de vida, oriundos da mãe, de familiares e da equipe médica hospitalar (HARABUCHI *et al.*, 1994). Essa aquisição funciona na maioria como uma imunidade naturalmente adquirida ao Hi.

No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006) as doenças invasivas como pneumonia e meningite causadas pelo Hib em crianças jovens, ainda são um problema de saúde pública em diversas partes do mundo onde a vacinação não foi implementada em grande escala. Pelo menos 3 milhões de casos de infecções graves causadas pelo Hib e com aproximadamente 386.000 mortes, acontecem a cada ano. A maioria dos casos de morbidade e mortalidade ocorrem nos países em desenvolvimento. Tratando-se de meningite bacteriana, cerca de 3 a 20% dos pacientes morrem mesmo com um rápido atendimento e o tratamento adequado. Em locais com um atendimento médico precário, a taxa de letalidade nos casos de meningite pode ser muito mais elevada, e cerca de 30 a 40% dos que sobreviverem

poderão apresentar sequelas neurológicas graves. Outras manifestações de infecções por Hib incluem epiglottites, osteomielite, artrite séptica, celulite e septicemia.

Por outro lado, os países que implementaram a vacina conjugada Hib em seus calendários de imunizações infantis, obtiveram uma redução drástica de infecções graves causadas por este microrganismo. Na Inglaterra, a incidência anual era aproximadamente de 30 casos/100.000 em crianças menores de 5 anos de idade tendo uma redução de 90% dos casos após a introdução da vacina em 1992 (HARGREAVES *et al.*, 1996). Nos Estados Unidos, o Hib era o agente mais comumente responsável por meningite em crianças menores de 5 anos de idade, onde, após a introdução da vacina em 1988, ocorreu uma diminuição de 98% no número de casos (CDC, 1991). No Canadá, que teve a introdução da vacina contra Hib em 1988, a incidência diminuiu de 2,6 (686 casos)/100.000 indivíduos para 0,3 (81 casos)/100.000 indivíduos em 2004, com redução nesse período, de 97% dos casos em crianças menores de 5 anos de 526 para 17 casos (NACI, 2006).

Antes da introdução da vacina no Brasil, no período de 1990 a 1999, a taxa média de incidência da meningite bacteriana causada pelo Hib em menores de 1 ano de idade foi de 22,3 casos/100.000 e em crianças de até 4 anos foi de 8,8 casos/100.000. A taxa de letalidade nestes grupos foi de 19,9% e 17,1 respectivamente. Após a inclusão da vacina conjugada contra Hib pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) no calendário de rotina da rede pública de serviços de saúde, no segundo semestre de 1999, ainda que limitada aos menores de 1 ano, levou à redução de 93,8% dos casos de meningites, decrescendo de 1616 em 1999 para 100 casos em 2005 (MS, 2006). Em Salvador um estudo de vigilância realizado após a introdução da vacina mostrou que do ano 1999 ao ano de 2004 a incidência de meningites em menores de 1 ano reduziu-se de 60,9 a 3,1 casos/100.000 e na população em geral de 2,39 a 0,06 casos/100.000 habitantes, sendo observado, porém um aumento discreto de meningites causadas pelo Hia (RIBEIRO *et al.*, 2007). No Estado do Espírito Santo, a Secretaria de Estado da Saúde (SESA, ES) constatou que antes de 1993 a 1999 e após de 2000 a 2004 a introdução da vacina contra Hib em menores de 1 ano, houve uma redução média de 50,57 a 4,88 casos de meningites/100.000 habitantes, enquanto na faixa etária de 1 a 4 anos a redução foi de 8,43 a 0,86 casos/100.000 habitantes (MARTINS, 2005).

6.1. Situação Atual

Nos países que implementaram a vacina conjugada contra Hib verificou-se amplamente uma redução das doenças invasivas por este microrganismo. No entanto, vários estudos vêm sugerindo uma mudança de comportamento epidemiológico do *Haemophilus influenzae* tipo b, antes francamente predominante em crianças, e atualmente sendo substituído por outros tipos sorológicos não b (**a**, **c**, e **f**) e os não tipáveis (HiNT) que estão causando infecções graves também em indivíduos de faixas etárias maiores (CAMPOS *et al.*, 2004; DE ALMEIDA *et al.*, 2005; ARACIL *et al.*, 2006; HOWIE *et al.*, 2007; TSANG *et al.*, 2007; DWORKIN *et al.*, 2007).

O primeiro relato de artrite séptica no Brasil, causado por *H. influenzae* tipo a (Hia) foi reportado recentemente por De Almeida e colaboradores (2008) em uma criança de 3 anos de idade vacinada contra Hib. O isolamento do Hia causando infecção relevante e a habilidade destas cepas de colonizarem crianças vacinadas expressa a importância do papel da vigilância epidemiológica para as outras espécies não b, que podem se tornar importantes patógenos após a introdução da vacina.

Um outro fato que já preocupa a Saúde Pública no mundo e logicamente no Brasil é o ressurgimento de casos de meningites por *H. influenzae* tipo b em crianças que haviam recebido pelo menos uma dose da vacina contra Hib. Dentre estes, houve um detectado em criança que recebera todas as doses da vacina contra Hib e não apresentava deficiência imunológica, descrito por Simões e colaboradores (2004) em um estudo sobre o impacto da vacinação no Estado de Goiás.

Casos de falha vacinal também têm sido reportados em crianças que receberam todas as doses da vacina contra Hib em vários países do mundo. Em Gâmbia, país da África Ocidental que introduziu a vacina em 1997, foram detectados, no período de 2005 a 2006, cinco casos de infecções invasivas por *H. influenzae* do tipo b, e também um caso invasivo por HiNT (HOWIE *et al.*, 2007). Na Inglaterra e na Irlanda, também foram observados casos de falha vacinal em 90 amostras de crianças com todas as doses da vacina aplicadas, sendo que os resultados das análises destas cepas de *H. influenzae* tipo b sugerem uma modificação em sua estrutura capsular (CERQUETTI *et al.*, 2005). Na Holanda, Schouls e colaboradores (2005) relataram que o aumento dos números de casos de falha da vacina contra Hib

em crianças vacinadas com idade de 0 a 4 anos, em 2002, triplicou se comparado com os anos de 1996 a 2001. Nesta linha de pesquisa, Schouls e colaboradores (2008), preocupados com esse aumento, analisaram os genes presentes na cápsula das cepas dos *H. influenzae* tipo b isolados de crianças vacinadas e não vacinadas, conseguindo identificar dois tipos distintos de variantes entre os Hib, denominando-os de Hib do tipo I e Hib do tipo II. O tipo II foi isolado apenas antes da introdução da vacina e o tipo I foi encontrado antes e após o período vacinal. Os Hib do tipo II exibiam menor expressão capsular do que o tipo I.

Outra consideração importante na área de Vigilância Epidemiológica e Sanitária Brasileira é o recente aumento da resistência aos antimicrobianos envolvidos em diferentes infecções tendo como agente o Hi, sobretudo nas do trato respiratório (DE ALMEIDA *et al.*, 2006). Em outros países do mundo têm sido descritos isolamentos de cepas de Hi resistentes a fluoroquinolonas (PEREZ-VAZQUEZ *et al.*, 2007). Casos de falhas terapêuticas no tratamento de pneumonia com levofloxacina pelo Hi foram considerados por Bastida e colaboradores (2003). Para cepas de Hi isoladas no Brasil, nos diferentes processos infecciosos, pouco se conhece sobre a resistência aos antibióticos utilizados e até dos marcadores de resistência existentes para as quinolonas e outros antibióticos indicados nas infecções pelo Hi.

7. JUSTIFICATIVA

A proposta desse estudo, continuando uma linha de investigação no INCQS, está associada à necessidade de, sob diferentes aspectos, monitorar as características de Hi circulante no país, tomando por marco divisório a inclusão da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS), a partir de agosto de 1999. A necessidade do rastreamento de cepas mais virulentas ou multiresistentes, e o monitoramento do impacto da vacina requerem a aplicação de metodologias que permitam avaliar a evolução biológica e adaptação da espécie. Nossa proposta, portanto, é avaliar as características fenotípicas e moleculares das cepas de *H. influenzae* circulantes antes e após a vacinação. Este estudo permitirá uma melhor avaliação de um possível novo papel eco-epidemiológico e clínico dos sorotipos b e não b do Hi, o que certamente será de importância para a Vigilância Epidemiológica do país e, conseqüentemente, para a área da Vigilância Sanitária referente aos imunobiológicos utilizados atualmente no Brasil.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo Geral

Ampliar os conhecimentos epidemiológicos sobre o *Haemophilus influenzae* tipo b e não b através da análise por métodos fenotípicos e moleculares de cepas isoladas de quadros infecciosos, no período pré e pós-vacinação contra o Hib, visando detectar a resistência a antibióticos e possíveis mudanças na região capsular do Hi.

8.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os tipos capsulares e biotipos de isolados clínicos de *Haemophilus influenzae* por metodologias sorológicas, bioquímicas e moleculares.
- Avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por *Haemophilus influenzae*, detecção de cepas produtoras de β -lactamase (BLA+) e de cepas BLNAR.
- Caracterizar com métodos moleculares, os marcadores de resistência às quinolonas através da detecção de mutações nos genes de *Haemophilus influenzae* que codificam a síntese das proteínas GyrA e ParC.
- Determinar a variação genética da região capsular *cap* de *Haemophilus influenzae* através de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do gene *hcsA*.

9. METODOLOGIA

9.1. Cepas bacterianas

As cepas bacterianas, que foram utilizadas no presente estudo, fazem parte da Coleção de Pesquisa do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram selecionadas aleatoriamente para análise 59 cepas de Hi isoladas no período 1990 a 2007 de crianças e adultos de três Estados do Brasil (Pernambuco, Santa Catarina e Rio de Janeiro) e se encontram conservadas por liofilização no INCQS. Destas 59 cepas, 43 foram obtidas do líquido, 5 de hemocultura, 1 de líquido sinovial, 1 da nasofaringe, 6 de escarro, 2 de aspirado traqueal e 1 do líquido pleural. (Anexo A - Listagem das amostras e suas características)

9.2. Identificação e sorotipagem

Para a preparação do ágar chocolate suplemento, foi adicionado à base ágar Mueller-Hinton (Oxoid) aquecida a 70°C, 10% de sangue, desfibrinado e estéril, de cavalo e 1% de IsoVitalex (BBL). A incubação da placa de ágar chocolate foi feita em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 35-37°C por 24 a 48 horas (KONEMAN *et al.*, 2001; DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

O teste para confirmar a dependência dos fatores de crescimento (X e V) foi realizado em ágar Mueller-Hinton, empregando-se discos de papel de filtro impregnados com os fatores V, X e XV (Oxoid). Foram consideradas as cepas capazes de crescer somente ao redor do disco XV e entre os discos X e V (CAMPOS, 1999).

A identificação bioquímica dos Hi foi realizada através de testes de fermentação em caldo dos carboidratos produzidos no Setor de Meios de Cultura do INCQS como glicose, sacarose, lactose, manose, frutose, ribose e xilose. 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 10µg/mL de NAD (fator V) e hemina (fator X). A inoculação dessas provas bioquímicas foram feitas com o auxílio de alça bacteriológica de cultura pura de Hi, incubados a 35-37°C por 24

horas. O resultado é considerado positivo quando apresenta a coloração amarela (CAMPOS, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001).

A biotipagem foi realizada através de três testes bioquímicos que foram produzidos no Setor de Meios de Cultura do INCQS que são eles: Teste da Ornitina descarboxilase, da Urease e do Indol. A atividade da enzima ornitina descarboxilase foi verificada em uma base de Moeller (Difco) acrescido de 1% de L-ornitina, ajustado o pH em 6,0 com a utilização de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 1N e esterilizado por autoclavagem. Foi adicionado aproximadamente 1mL de óleo mineral estéril no tubo da ornitina, após a inoculação com o Hi a ser estudado.

A produção da urease foi realizada através da solução composta pelo vermelho de fenol (indicador) e uma solução aquosa da uréia. Esta solução foi esterilizada por filtração.

Para a produção do Indol foi utilizado o substrato L-tryptophan (0,1%, Sigma) em tampão fosfato, esterilizado por filtração. Após o tempo de incubação necessário com a cepa de Hi a ser testada, foi adicionado 0,5ml do Reagente de Kovac's® para fazer a leitura final.

Os controles de qualidade dos testes bioquímicos e da biotipagem foram realizados no setor em que foi produzido do INCQS de acordo com os requisitos da qualidade implementada.

Devido ao inóculo equivalente a uma alça calibrada 10µL do Hi a ser biotipado, estes testes podem ser lidos após 4 horas de incubação, sendo que o teste da ornitina pode requerer uma incubação adicional de 18 a 20 horas (CAMPOS, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001). A tabela 2, a seguir, mostra as características biológicas e bioquímicas dos diferentes biotipos de Hi.

A sorotipagem das cepas de Hi foi realizada através do teste de soro aglutinação em lâmina (SAL) adquirido comercialmente, marca Difco (Difco *Haemophilus influenzae* Antisera). Foram utilizadas colônias de cultura pura do Hi a ser testado com os antissoros (a-f), colocando-se uma gota do antissoro (Difco), previamente reidratado com 1mL de água purificada e totalmente dissolvido, em uma lâmina de vidro. Com auxílio de um bastão de plástico (ou vidro) colocou-se mais de uma colônia do Hi isolado na gota de antissoro e misturou-se bem. Homogeneizou-se

segurando a lâmina de vidro com movimentos de rotação por 1 minuto e em seguida, verificou-se a presença de aglutinação, o que indicou resultado positivo. As cepas que não aglutinaram com nenhum dos seis sorotipos foram identificadas como HiNT.

Tabela 2: Perfil bioquímico e biotipagem do *Haemophilus influenzae*

Biotipo	Fatores de crescimento					Identificação bioquímica										Biotipagem	
	Hemólise	X	V	Gli	Sac	Lac	Fru	Rib	K1	Man	Indol	Urease	Orn				
<i>H. influenzae</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+				
Biotipo I	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-				
Biotipo II	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-				
Biotipo III*	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-				
Biotipo IV	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+				
Biotipo V	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+				
Biotipo VI	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+				
Biotipo VII	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-				
Biotipo VIII	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-				
Biogrupo <i>aegyptius</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+				

X:hemina; V:nicotinamida adenina dinucleotídeo; Gli:glucose; Sac:sacarose; Lac:lactose; Fru:frutose; Rib:ribose; Xil:xilose; Man:manose; Orn:ornitina descarboxilase; -: reação negativa; +:reação positiva; *: as reações da biotipagem são idênticas as do Hi biogrupo *aegyptius*, mas as cepas do biogrupo *aegyptius* são xilose-negativas; +1: reação fracamente positiva.
 Fonte: Adaptada de Koneman *et al.*, 2001.

9.3. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

9.3.1. Método disco de 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 15µg/mL de hemina (fator X), 15µg/mL de dinucleotídeo de nicotinamida adenina –NAD (fator V) 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 McFarland e inoculada com um “swab” estéril com haste de plástico em uma placa de 90 mm contendo o meio HTM. Quinze minutos após as placas serem inoculadas com a suspensão bacteriana, os discos de antibióticos foram distribuídos na superfície do meio com auxílio de uma pinça estéril. Três discos de antibióticos foram colocados por placa e estas foram incubadas em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂, a 35-37°C, por 16 a 18 horas. Foram testados 11 discos de antibióticos para cada cepa bacteriana que são: ampicilina (AMP – 10µg), amoxicilina-ácido clavulânico (AMC – 20/10µg), ceftriaxone (CRO – 30µg), cloranfenicol (CLO – 30µg), ciprofloxacina (CIP – 5µg), levofloxacina (LEV – 5µg), lomefloxacina (LOM – 10µg), moxifloxacina (MOX – 5µg), ácido nalidíxico (NAL – 30µg), rifampicina (RIF – 5µg) e sulfametoxazol-trimetoprima (SUT – 1.25/23.75µg); todos os discos de antibióticos foram adquiridos comercialmente da empresa Cefar Diagnóstica Ltda. A cepa de *H. influenzae* (ATCC 49247) foi utilizada como controle de qualidade como recomenda o documento CLSI M2-A9, 2006.

9.3.2. Método ágar diluição – AD

A ampicilina, o ácido nalidíxico e a ciprofloxacina foram também utilizados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente às amostras testadas de Hi. A ampicilina foi selecionada por ser indicada sua inclusão nos testes de rotina laboratorial servindo como representante do grupo das penicilinas (CLSI, 2008). O ácido nalidíxico foi selecionado por ser utilizado como marcador de

resistência às quilononas (PÉREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2004) e a ciprofloxacina por ser considerada um antibiótico alternativo quando as cepas de *Hi* são resistentes aos antibióticos de primeira escolha (CLSI, 2008). Os resultados dos CIMs destes antibióticos foram comparados com os resultados encontrados no método de difusão (DD). Diferentes concentrações destes antibióticos foram incorporadas ao meio de cultura HTM. As concentrações de cada antibiótico permitem a classificação das amostras nas categorias sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) de acordo com a referência do método de diluição do CLSI M7-A7, 2006.

Os antibióticos foram dissolvidos em solventes apropriados para fazer as soluções estoque. A concentração da solução estoque utilizada foi de 6400 μ g/mL para AMP, de 1600 μ g/mL para CIP e de 25600 μ g/mL para NAL. O solvente utilizado para AMP foi tampão fosfato com pH 8,0 a 0,1mol/L e seu diluente foi o tampão fosfato com pH 6,0 a 0,1mol/L; para CIP o solvente foi água ultrapura e para o NAL foi 1/2 volume de água ultrapura adicionado gotas de 1mol/L de NaOH até dissolvê-lo. A ampicilina e o ácido nalidíxico foram adquiridos comercialmente da empresa Sigma Chemical, St. Louis, MO e a ciprofloxacina cedida pelo Laboratório de Substâncias Químicas de Referência do INCQS. As soluções estoque foram esterilizadas por membrana filtrante de 0,22 μ de diâmetro (Millipore®), divididas em alíquotas e estocadas a -20°C.

A solução estoque foi diluída na proporção 1:10, e a partir desta solução foram feitas diluições seriadas na proporção de 1:2 dos antimicrobianos testados. As concentrações para a ampicilina foram de 0,5 a 64 μ g/mL, para o ácido nalidíxico de 0,125 a 256 μ g/mL e para a ciprofloxacina de 0,016 a 16 μ g/mL. A figura 2 mostra a título ilustrativo, o esquema com a diluição seriada da AMP realizada neste estudo.

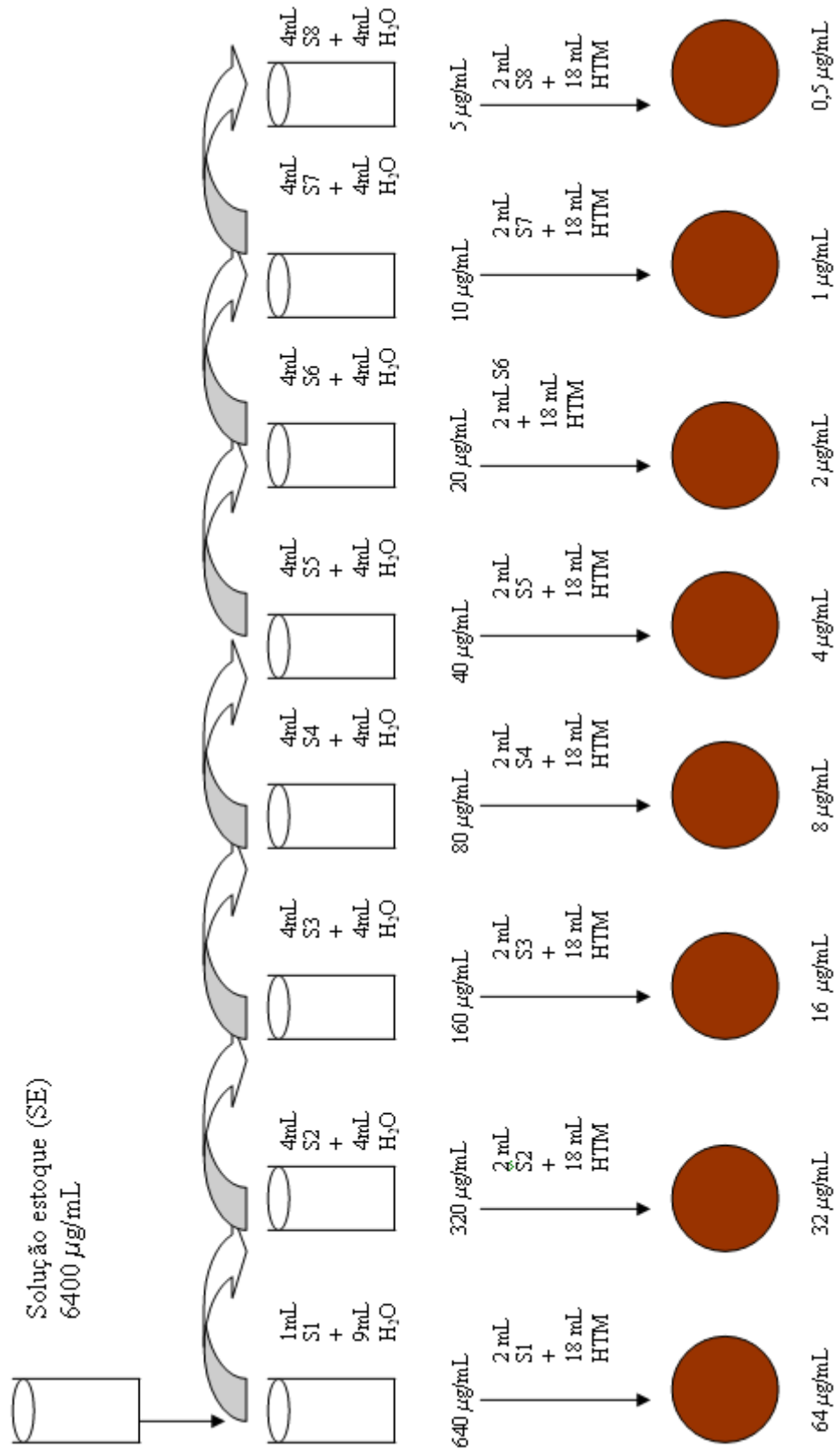


Figura 2: Diluição seriada da solução estoque da ampicilina

Um volume de 2mL de cada concentração dos antibióticos foi incorporado a 17,2mL de meio HTM em tubo liquefeito e resfriado em banho-maria até 60°C sendo também adicionado um volume de 0,8mL de suplemento (IsoVitalex), totalizando 20mL, volume necessário para atingir a espessura preconizada de 3-4mm do ágar. Após a homogeneização, o meio foi distribuído em placas de petri estéreis de 90mm que foram incubadas a 35-37°C, por 24 horas, para controle de esterilidade. Além das placas com meio contendo as concentrações dos antibióticos, também foram preparadas duas placas com meio sem antibióticos, para controles do crescimento microbiano, que foram denominadas de Pré e de Pós.

A suspensão bacteriana foi preparada de forma semelhante à utilizada no disco de difusão (item 9.3.1), sendo que a concentração final do “spot” foi de 10^4 UFC. Para obter esta concentração, o inóculo inicial foi diluído na proporção 1:10 em solução salina estéril, obtendo-se a concentração de 10^7 UFC/mL. Desta concentração foram inoculados 2 μ l de cada amostra com micropipeta (Eppendorf Research®) sobre a superfície do HTM (JORGENSEN *et al.*, 1990). As amostras foram inoculadas inicialmente em uma placa controle contendo meio sem antibiótico (Pré), e em seguida procedeu-se a sequência da inoculação das placas com as menores concentrações do antibiótico até as placas com as maiores concentrações do antibiótico, e por último inoculou-se na outra placa controle contendo meio sem antibiótico (Pós). Este procedimento permite verificar a viabilidade da cepa na suspensão bacteriana e possíveis erros de pipetagem.

As placas foram mantidas dentro do fluxo laminar por no máximo 20 minutos para secagem e após este período incubadas em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂, a 35-37°C, por 24 horas.

Para o controle de qualidade foi utilizada a cepa ATCC 49247 (*Haemophilus influenzae*) para o teste da AMP, da CIP e do NAL. A cepa ATCC 25922 (*E. coli*) foi incluída para o controle do NAL em ambos os testes de susceptibilidade como recomenda o CLSI M7-A7, 2006.

9.3.3. Análise da interpretação do resultado dos testes de susceptibilidade

Os halos de inibição foram interpretados de acordo com o documento M2-Disk Diffusion *Haemophilus* spp (CLSI M2-A9, 2006) e a interpretação do CIM foi feita de acordo com o documento M7-MIC *Haemophilus* spp.(CLSI M7-A7, 2006) da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), conforme apresenta a tabela 3, a seguir.

Tabela 3: Critérios de interpretação dos testes de susceptibilidade empregados no presente estudo.

Antibióticos	Disco de difusão (mm)			CIM (µg/mL)		
	S ^a	I ^b	R ^c	S	I	R
AMP	≥22 ^d	19-21 ^e	≤18 ^f	≤1 ^d	2 ^e	≥4 ^f
AMC	≥20	--	≤19	≤4/2	--	≥ 8/4
CRO	≥26	--	--	≤2	--	--
CLO	≥29	26-28	≤25	≤2	4	≥8
CIP	≥21	--	--	≤1	--	--
LEV	≥17	--	--	≤2	--	--
LOM	≥22 --	--		≤2	--	--
MOX	≥18	--	--	≤1	--	--
RIF	≥20	17-19	≤16	≤1	2	≥4
SUT	≥16	11-15	≤10	≤ 0,5/9,5	1/19-2/38	≥ 4/76

^a Sensível; ^b Intermediário; ^c Resistente; ^d valores do halo de inibição e CIM sensíveis; ^e valores do halo de inibição e CIM intermediários; ^f valores do halo de inibição e CIM resistentes; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulante; CRO: ceftriaxone; CLO: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; LOM: lomefloxacina; MOX: moxifloxacina; RIF: rifampicina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim; -- sem valores de interpretação.

Fonte: CLSI M2-A9, 2006 & CLSI M7A7, 2006.

Estes documentos não apresentam padronização do ácido nalidíxico para Hi, que foi categorizado de acordo com o proposto por Pérez-Vázquez e colaboradores (2004), que sugerem halos de inibição e faixa do CIM associados a alterações nos aminoácidos da GyrA e ParC, como mostra a tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Critérios de interpretação de testes de susceptibilidade ao ácido nalidíxico de *Haemophilus influenzae* empregados no presente estudo.

Antibiótico	Disco de difusão (mm)			Ágar diluição - CIM (µg/mL)		
	S ^a	I ^b	R ^c	S	I	R
ácido nalidíxico	≥32 ^d	19-31 ^e	≤18 ^f	≤2.0 ^d	4.0-16 ^e	≥32 ^f

^a Sensível; ^b Intermediário; ^c Resistente; ^d valores do halo de inibição e CIM que não apresentam alterações nos aminoácidos; ^e valores do halo de inibição e CIM que podem apresentar uma modificação ou nenhuma na GyrA; ^f valores do halo de inibição e CIM com duas modificações uma na GyrA e outra na ParC.

Fonte: Pérez-Vázquez e colaboradores, 2004.

9.3.4. Teste de detecção de β -lactamase

Todas as amostras 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 da ATCC 29213 (*S. aureus* = β -lactamase positiva), ATCC 25923 (*S. aureus* = β -lactamase negativa) e uma cepa de Hi de isolado clínico, do Setor de Vacinas Hib, classificada β -lactamase positiva e utilizada como controle interno positivo.

9.4. Métodos moleculares

9.4.1. *Extração e purificação do DNA genômico*

Após o cultivo da cepa de Hi em meio de ágar chocolate suplementado, com o auxílio de uma alça bacteriológica de 10µL, foi transferido o equivalente a uma alça de colônias para um microtubo de 1,5mL contendo tampão específico da Qiagen para a extração e purificação do DNA genômico seguindo as etapas do protocolo da Qiagen DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc.Valencia, Calif.). O DNA extraído e purificado foi armazenado a -20°C.

9.4.2. *Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

Os tipos capsulares foram determinados pela PCR de acordo com Falla e colaboradores (1994), que descreveram iniciadores específicos para detectar cada um dos 6 tipos capsulares do Hi. Este método é considerado referência para a determinação dos tipos capsulares como confirmação do método sorológico. A utilização desta técnica permitiu também diferenciar amostras de cepas com deficiência capsular (b⁻) de outras amostras não capsuladas de Hi. Os iniciadores foram desenhados para a região II, comum a todas as cepas de Hi e onde estão localizados os genes específicos para a síntese das proteínas envolvidas na produção dos polissacarídeos dos tipos a–f.

Para análise dos marcadores de resistência às quinolonas GyrA e ParC foram utilizados os iniciadores descritos por Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) no estudo em que associam a diminuição da susceptibilidade a esses antibióticos com mutações na sequência de aminoácidos localizados na região conhecida como determinante de resistência às quinolonas (QRDR) das proteínas GyrA e ParC.

Para a detecção das duas variantes entre os Hib (tipo I e tipo II) foram utilizados os iniciadores “*hcsA*-PCR” descritos por Schouls e colaboradores (2008). Todos os iniciadores utilizados neste estudo estão na tabela 5, a seguir.

Tabela 5: Iniciadores empregados para a determinação de tipos capsulados, a caracterização de marcadores de resistências a quinolonas e de variações capsulares de *Haemophilus influenzae*.

Iniciadores	Programa	Gene alvo	Produto (bp)	Referência
Hi-1 5'-CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC-3' Hi-2 5'-TGATGAGGTGATTGCAGTAGG-3'	94° C – 7 min. 94° C – 1 min. 60° C – 1 min. 72° C – 1 min. 72° C – 10 min.	— 35x —	Gene <i>bexA</i>	343 Falla <i>et al.</i> , 1994
Hib-1 5'-GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC-3' Hib-2 5'-GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA-3'	94° C – 7 min. 94° C – 1 min. 60° C – 1 min. 72° C – 1 min. 72° C – 10 min.	— 35x —	Gene <i>bcs</i>	480 Falla <i>et al.</i> , 1994
Hia-1 5'-CTACTCATTGCAGCATTTC-3' Hia-2 5'-GAATATGACCTGATCTTCTG-3'	94° C – 7 min. 94° C – 1 min. 60° C – 1 min. 72° C – 1 min. 72° C – 10 min.	— 35x —	Gene <i>acs</i>	250 Falla <i>et al.</i> , 1994
GyrA-F 5'-CCGCCGCTACTATTCTCAAT-3' GyrA-R 5'-GTTGCCATCCCCACCGCAATACCA-3'	95° C – 5 min. 94° C – 1 min. 50° C – 1 min. 72° C – 2 min. 72° C – 10 min.	— 35X '	Gene <i>gryA</i>	400 Pérez-Vázquez <i>et al.</i> , 2004
ParC-F 5'-TCTGAACTTGGCTTAATTGCC-3' ParC-R 5'-GCCACGACCTTGTCTATAAAT-3'	95° C – 5 min. 94° C – 1 min. 50° C – 1 min. 72° C – 2 min. 72° C – 10 min.	— 35X '	Gene <i>parC</i>	565 Pérez-Vázquez <i>et al.</i> , 2004
HiHcsA12667F-I 5'-GTAAGTGCATTGACCAAACCTTT-3' HiHcsA13116R-I 5'-GGTATATTGAAAGTATGCTGCAT-3'	95° C – 5 min. 95° C – 30sec 52° C – 1 min. 72° C – 1 min. 72° C – 10 min.	— 35X	Gene <i>hcsA</i>	450 Schouls <i>et al.</i> , 2008
HiHcsA12668F-II 5'-TGCTTGTTCATCGATCAAA-3' HiHcsA13484R-II 5'-ACTAAAGAAAGGGGTGCAA-3'	95° C – 5 min. 95° C – 30sec 53° C – 1 min. 72° C – 1 min. 72° C – 10 min.	— 35X —	Gene <i>hcsA</i>	817 Schouls <i>et al.</i> , 2008
†Cap-1 5'-TGTGTCGAAGGCTGATTCTG-3' †Cap-2 5'-TAGTTCATCCACGGCATTGA-3'	95° C – 5 min. 95° C – 1 min. 50° C – 1 min. 72° C – 2 min. 72° C – 10 min.	— 30X —	Gene <i>hcsA</i>	1606 Este estudo
*Cap-1S-F 5'-TTTTCGCCAAATGAA-3' *Cap-1S-R 5'-TTCATTTGGCGAAAA-3' *Cap-2S-F 5'-ATGCTAAAGCGCATA-3' *Cap-2S-R 5'-TATGCGCTTTAGCAT-3'				Este estudo Este estudo

† iniciadores para PCR e sequenciamento; * iniciadores para o sequenciamento

9.4.3. Caracterização molecular da região *cap*

Iniciadores adicionais foram desenhados para a amplificação da região do *cap locus* envolvida na produção da cápsula (Cap-1 e Cap-2). Estes iniciadores foram desenhados para que pudessem amplificar a região adjacente àquela que determina as variantes de Hib (I e II) citadas por Schouls e colaboradores (2008). Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

A amplificação da região *cap locus* foi realizada com os iniciadores específicos (Cap-1 e Cap-2) usando o Master Mix Promega (12,5µL) em um volume total da reação de 25µL com 1µL do DNA genômico e 50pmol de cada iniciador. As etapas da PCR foram desenvolvidas da seguinte forma: 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR com 1606pb foram analisados em um gel a 1% de agarose (Sigma Aldrich, MO, USA) contendo 0,5 µg/mL brometo de etídio (Promega).

Um esquema da organização genética da cápsula (*cap locus*) do Hi, a localização dos iniciadores utilizados por Schouls e colaboradores (2008) e a região dos iniciadores específicos (Cap-1 e Cap-2) desenhados para este estudo são apresentados na figura 3, a seguir.

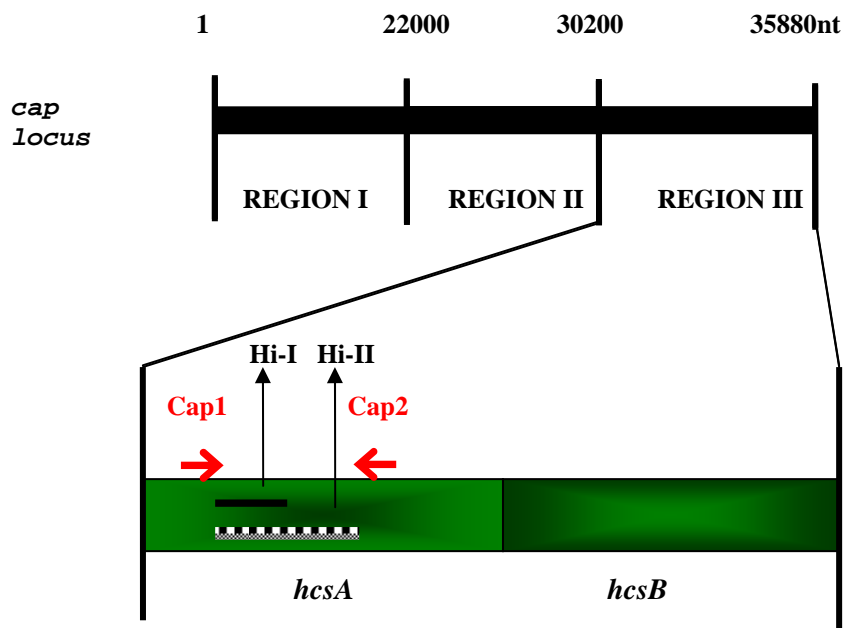


Figura 3: Esquema de organização da cápsula de *H. influenzae* apresentando a localização dos iniciadores utilizados por Schouls e colaboradores (2008) e a região dos iniciadores específicos (Cap-1 e Cap-2) desenhados para este estudo.

9.4.4. Sequenciamento dos fragmentos obtidos pela PCR

Os fragmentos gerados na PCR do gene *hcsA* usando os iniciadores específicos (Cap-1 e Cap-2) foram sequenciados usando os iniciadores da PCR (Cap-1 e Cap-2) e os iniciadores internos Cap-1S e Cap-2S (tabela 5).

As sequências de DNA da região do *cap locus* utilizadas para distinguir as variantes de Hi (I e II) foram depositadas no GenBank sob os números de acessos GQ457912-GQ457939.

9.4.5. Caracterização molecular da região QRDR de resistência às quinolonas

Os fragmentos gerados na reação da PCR, de acordo com Pérez-Vázquez (2004) para verificar as mutações de aminoácidos nas regiões QRDRs da *gyrA* e *parC* foram sequenciados utilizando os iniciadores GyrA-F, GyrA-R e ParC-F, ParC-R, respectivamente (tabela 5). As sequências da região QRDRs dos genes *GyrA* e *ParC* deste estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acessos HM113381 – HM113464.

As reações de sequenciamento foram desenvolvidas usando o ABI-PRISM BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e as sequências foram determinadas no seqüenciador automático ABI-3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

9.5. Aplicação de métodos de bioinformática

9.5.1. Montagem das sequências

A montagem das sequências obtidas (até 3 repetições de sequências “forward” e “reverse”) e obtenção dos “contigs” para posterior análise foram realizadas com o auxílio dos programas BioEdit (freeware) (HALL, 1999) e Sequencher ® 4.9 (Gene Codes Corporation).

9.5.2. Tradução das sequências

A tradução das sequências consenso de nucleotídeos em aminoácidos foi realizada com o programa on-line “Emboss/Transeq” (<http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss/transeq/index.html>).

9.5.3. Alinhamento das sequências

O alinhamento das sequências de aminoácidos para a análise da diversidade genética da região *cap locus* e dos SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) dos genes *gyrA* e *parC* foi realizado com o software BioEdit (HALL, 1999).

9.5.4. Análises filogenéticas

A análise das sequências de DNA da região do *cap locus* foi realizada utilizando-se o software MEGA versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007). A árvore filogenética foi construída utilizando-se o algoritmo Neighbor-Joining.

10. RESULTADOS

10.1. Caracterização das amostras

As amostras foram agrupadas de acordo com o período de isolamento, pré e pós-vacinal, a região geográfica (Estado), a quantidade de amostras, o status da vacinação do paciente, o material clínico coletado e a tipagem molecular dos Hi encontrados. A tabela 6, abaixo, apresenta estes dados associados às cepas de Hi estudadas nestes períodos.

Tabela 6: Distribuição e classificação das cepas de *Haemophilus influenzae* estudadas.

Período de isolamento	Estado de origem	Nº de cepas	Status vacinal do paciente	Fonte de isolamento	PCR tipo capsular
Pré-vacinal	PE ¹	6	NV ²	LCR ³	b
	RJ ⁴	6	NV	LCR	b
	SC ⁵	3	NV	LCR	b
	PE	3	NV	LCR	a
	RJ	1	NV	LCR	a
	PE	1	NV	LCR	c
Pós-vacinal	RJ	2	NV	LCR	c
	PE	9	Vac ⁶	LCR	b
	PE	1	NV	LCR	b
	RJ	1	N/D ⁷	LCR	b
	SC	1	NV	LCR	b
	PE	3	Vac	LCR	a
	RJ	2	Vac	LCR	a
	SC	1	Vac	LCR	a
	PE	1	Vac	LCR	c
	PE	1	NV	LCR	NT ⁸
	RJ	1	N/D	LCR	c
	PE	3	Vac	Hemo ⁹	b
	RJ	1	Vac	Hemo	d
	RJ	1	Vac	Hemo	NT
	RJ	1	Vac	L.sinov. ¹⁰	a
	RJ	1	NV	Nasal ¹¹	b
RJ	1	NV	Escarro	b	
RJ	3	NV	Escarro	a	
RJ	2	NV	Escarro	c	
RJ	2	NV	Sec.traq. ¹²	b	
RJ	1	NV	L.pleural ¹³	NT	

¹ Pernambuco; ² Não vacinado; ³ líquido; ^{3, 4} Rio de Janeiro; ⁵ Santa Catarina; ⁶ Vacinado; ⁷ Não determinado; ⁸ Hi não tipável; ⁹ hemocultura; ¹⁰ líquido sinovial; ¹¹ nasofaringe; ¹² secreção traqueal; ¹³ líquido pleural.

Do total de 59 amostras clínicas analisadas, 22 cepas foram isoladas do período pré-vacinal e 37 cepas foram isoladas do pós-vacinal. Neste período, referente aos anos 2002, 2003 e 2007, 13 (22%) cepas procederam de adolescentes e adultos que não foram vacinados (NV).

A partir de líquido, foram isoladas 27 (63%) cepas classificadas como Hib, seguidas por 10 (23,2%) cepas do sorotipo a (Hia), 5 (11,6%) cepas do sorotipo c (Hic) e uma (2,3%) cepa não tipável (HiNT). Das cepas isoladas do sangue, 3 foram classificadas como Hib, uma cepa foi classificada como sorotipo d (Hid) e uma cepa foi HiNT. Do escarro, foram isoladas 3 cepas de Hia, duas cepas de Hic e uma cepa de Hib. Do aspirado traqueal, foram isoladas duas cepas de Hib. Da nasofaringe, foi isolada uma cepa de Hib. Do líquido pleural, foi isolada uma cepa de HiNT e do líquido sinovial foi isolado uma cepa de Hia. Com intuito de visualizar tais dados, segue a tabela 7.

Tabela 7: Classificação de cepas de *H. influenzae* procedentes de materiais clínicos

Materiais clínicos	Hib	Hia	Hic	Hid	Hie	Hif	HiNT	TOTAL (%)
Líquor	27	10	5	--	--	--	1	43 (73)
Sangue	3	--	--	1	--	--	1	5 (8,5)
Escarro	1	3	2	--	--	--	--	6 (10)
Aspirado traqueal	2	--	--	--	--	--	--	2 (3,4)
Nasofaringe	1	--	--	--	--	--	--	1 (1,7)
Líquido pleural	--	--	--	--	--	--	1	1 (1,7)
Líquido sinovial	--	1	--	--	--	--	--	1 (1,7)
TOTAL	34	14	7	1	--	--	3	59
(%)	(57,6)	(23,7)	(12)	(1,7)			(5,08)	(100)

-- não foi isolada esta espécie Hi nesta amostra

Estas amostras indicaram pertencer a diferentes biotipos, sendo que 21 cepas do biotipo I e 4 cepas do biotipo VIII foram encontradas nos três estados estudados, seguidas por 14 cepas do biotipo II, 11 cepas do biotipo III, 4 cepas do biotipo IV encontradas nos estados de Pernambuco e Rio de Janeiro. Duas cepas do biotipo V foram encontradas apenas em Pernambuco, duas cepas do biotipo VI foram encontradas em Pernambuco e a outra em Santa Catarina, uma cepa do biotipo VII foi encontrada apenas no estado do Rio de Janeiro.

10.2. Teste de susceptibilidade pelo método disco de difusão e CIM

Os resultados do antibiograma realizado pelo método de difusão a partir do disco (DD) evidenciaram a sensibilidade de 78% (n=46) das cepas a todos os antibióticos testados e estas cepas não foram produtoras de β -lactamase. Os fenótipos de resistência, pelo método disco de difusão, e o resultado dos testes de detecção da produção de β -lactamase das outras 13 (22%) cepas restantes estão apresentados na tabela 8 a seguir.

Tabela 8: Fenótipos de resistência a antimicrobianos entre amostras de *H. influenzae* de acordo com os resultados de testes de difusão a partir de discos e da produção de β -lactamase.

	AMP*	CRO	RIF	CLO	SUT	AMC	CIP	LEV	LEM	MOX	NAL	β -lact ⁴
P1987	R ¹	R	R	R	R	S ²	S	S	S	S	S	NEG ⁵
P2692	R	S	S	R	I ³	S	S	S	S	S	S	POS ⁶
P2656	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	NEG
P2694	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	POS
P2020	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	NEG
P2675	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	NEG
P2110	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	NEG
P2621	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	NEG
P1439	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	NEG
P2949	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	NEG
P2628	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	NEG
P2674	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	NEG
P3044	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	NEG

*todos antibióticos testados pelo DD;¹Resistente,²Sensível; ³Intermediário;⁴produção de β -lactamase;

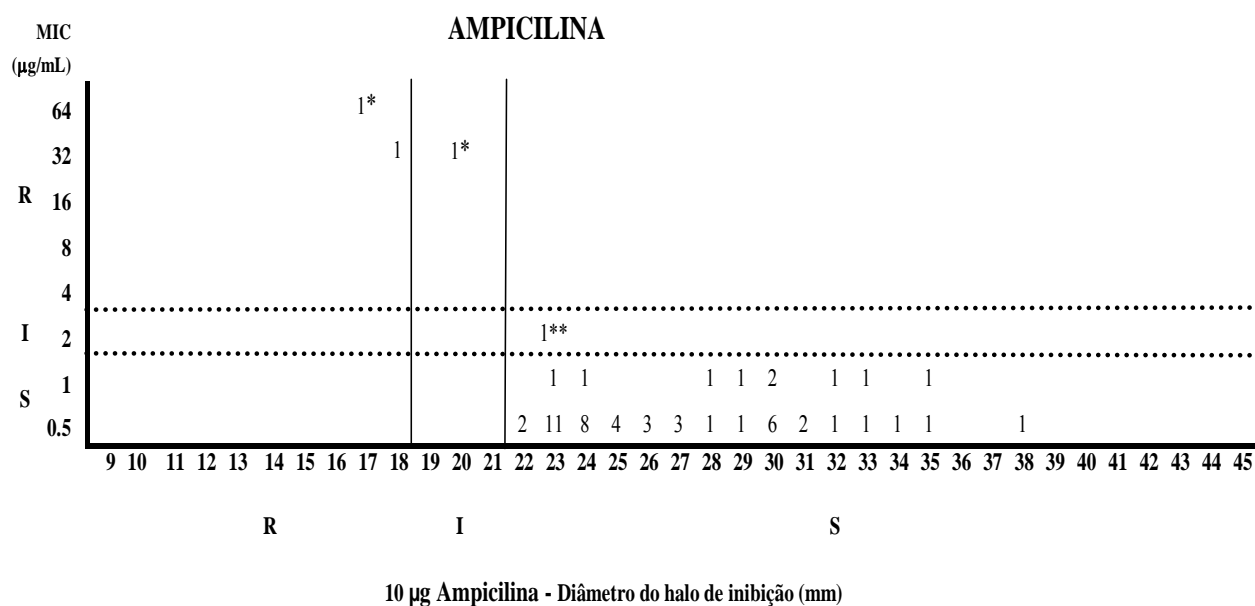
⁵negativo; ⁶positivo

Apenas duas cepas de Hib, uma isolada de líquido com resistência à ampicilina e a outra isolada de sangue com resultado intermediário para a ampicilina foram produtoras de β -lactamase.

Comparando os resultados dos testes de susceptibilidade, pelos métodos realizados neste estudo, a sensibilidade a ampicilina foi observada em 55 cepas de Hi (93,2%) nas concentrações de 0.5 e 1.0 μ g/mL e estas mesmas cepas também foram sensíveis utilizando-se o disco de ampicilina com 10 μ g para método de disco de difusão (DD). Uma cepa de Hib isolada do líquido apresentou o resultado de intermediário pelo método de ágar diluição (AD) na concentração 2.0 μ g/mL e o resultado de sensível com o disco de ampicilina 10 μ g. Uma cepa de Hib isolada de líquido foi resistente à ampicilina na concentração de 32 μ g/mL e pelo método de DD (figura 4). Esta amostra apresentou além da resistência à ampicilina, resistência a outros antibióticos testados como CRO, RIF, CLO, SUT pelo método de DD (tabela 8). Duas cepas de Hib, uma isolada de sangue e a outra de líquido, foram produtoras de β -lactamase. A primeira cepa, isolada do sangue, apresentou resistência por ambos os métodos de susceptibilidade com CIM \geq 64 μ g/mL e a segunda, isolada do líquido, apresentou resultado intermediário pelo método de DD e resistência pelo método de AD com CIM de 32 μ g/mL. Ambas apresentaram resistência pelo DD ao CLO e a cepa isolada do sangue apresentou resultado intermediário a SUT (tabela 8). As amostras resistentes à ampicilina apresentaram resultados de sensibilidade para as fluoroquinolonas testadas neste estudo que são recomendadas pelo CLSI, 2008 (tabela 3).

A figura 4, abaixo, mostra um diagrama de dispersão comparando os resultados encontrados no método de DD como os obtidos no método de AD para ampicilina das 59 cepas de Hi testadas. O eixo da abscissa representa os halos de inibição encontrados utilizando um disco de 10 μ g de ampicilina e o eixo da ordenada representa as concentrações utilizadas no CIM para este mesmo antibiótico. As linhas contínuas verticais correspondem a pontos de corte onde a interpretação dos resultados pelo método de DD indica resultados de resistência (halo de inibição \leq 18 mm), de resultados intermediários (halo de inibição 19-21mm) e de resultados sensíveis (halo de inibição \geq 22mm) ao antibiótico testado. As linhas horizontais tracejadas correspondem a pontos de corte onde a interpretação dos resultados pelo

método de AD indica sensibilidade na concentração $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, resultados intermediários na concentração $2 \mu\text{g/mL}$ e resultados resistentes na concentração $\geq 4 \mu\text{g/mL}$. Estes pontos de corte indicados estão de acordo com a recomendação do CLSI, 2008.



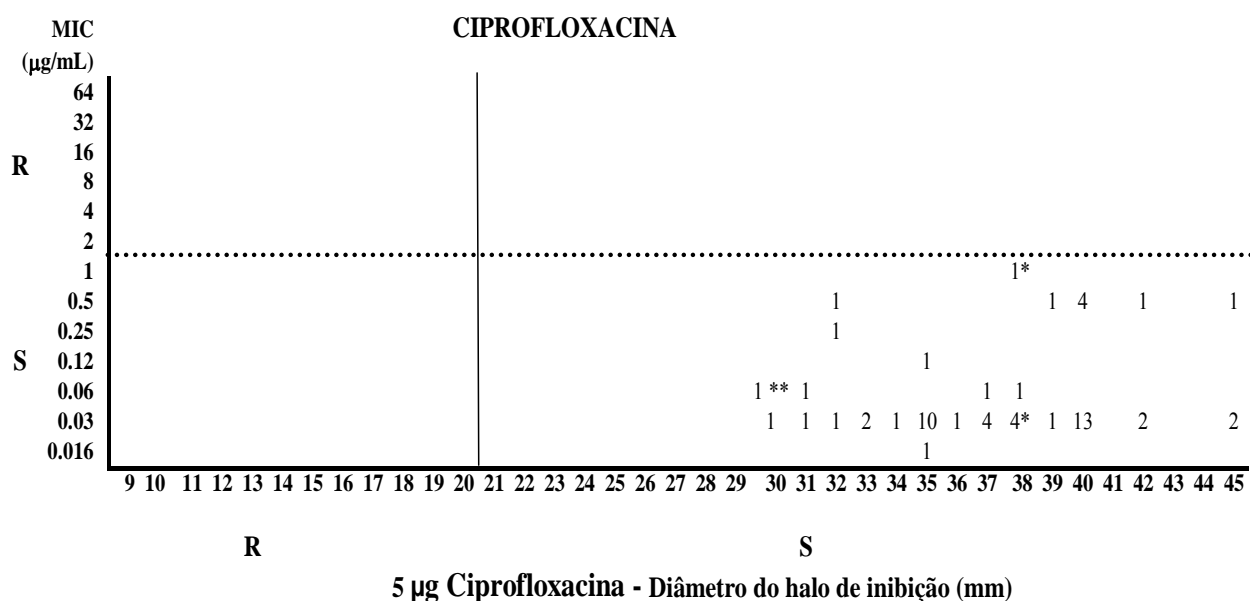
* cepas β -lactamase positivas; ** quantidade de cepas encontradas no DD e CIM.

Figura 4: Comparação entre os halos de inibição em mm (DD) e as CIMs em $\mu\text{g/mL}$ (AD) obtidos para amostras de *Haemophilus influenzae* frente a ampicilina.

Todas as cepas testadas foram sensíveis para ciprofloxacina em ambos os métodos realizados neste estudo de acordo com a interpretação recomendada pelo CLSI, 2008 (tabela 3). As duas menores concentrações de ciprofloxacina ($0,016$ a $0,03 \mu\text{g/mL}$) inibiram 44 cepas testadas, as concentrações de $0,06$ a $0,25 \mu\text{g/mL}$ inibiram 6 cepas, a concentração de $0,5 \mu\text{g/mL}$ inibiu 8 cepas e apenas uma cepa foi inibida na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ equivalente ao ponto de corte de sensibilidade.

O diagrama de dispersão apresentado na figura 5, a seguir, compara os resultados obtidos nos métodos de DD e AD. Este gráfico só apresenta um ponto de corte tanto para o disco de difusão (mm) quanto para o CIM ($\mu\text{g/mL}$), classificando as cepas apenas em sensível. Este fato ocorre devido à rara ocorrência de cepas de Hi

resistentes a ciprofloxacina impedindo a definição de qualquer outro resultado de interpretação que não o de sensível (CLSI, 2008). O eixo abscissa representa os halos de inibição encontrados utilizando um disco de 5µg de ciprofloxacina e o eixo da ordenada representa as concentrações utilizadas no CIM para as 59 cepas de Hi testadas. A linha contínua vertical indica o ponto de corte de resultados interpretados como sensíveis (halo de inibição ≥ 21 mm). A linha horizontal tracejada indica o ponto de corte de resultados de sensibilidade na concentração ≤ 1 µg/mL.

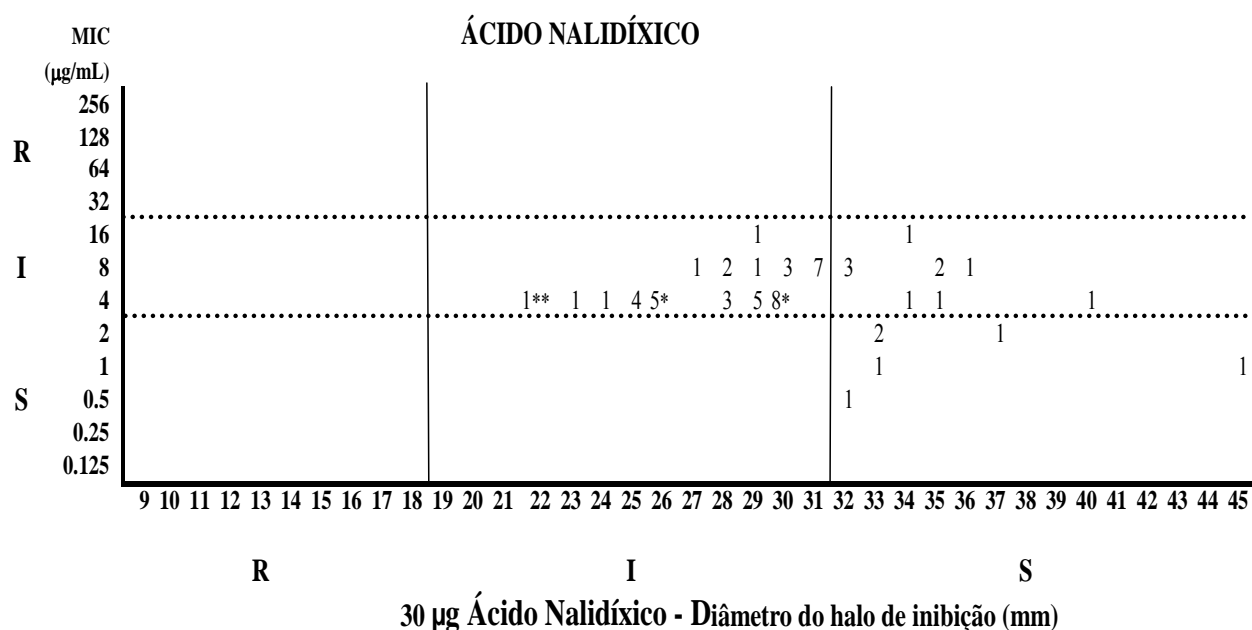


* localização das duas cepas β-lactamase positivas; ** quantidade de cepas encontradas no DD e CIM.

Figura 5: Comparação entre os halos de inibição em mm (DD) e as CIMs em µg/mL (AD) obtidos para amostras de *Haemophilus influenzae* frente a ciprofloxacina.

A interpretação dos resultados com o ácido nalidíxico para a comparação entre ambos os métodos realizados neste estudo foi feita de acordo com Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) como apresentado na tabela 3. Das 59 cepas de Hi testadas, 43 cepas apresentaram resultados intermediários e 6 cepas foram sensíveis em ambos os métodos (DD e AD) e as outras 10 cepas restantes apresentaram resultados discrepantes, ou seja, sensibilidade no método de disco difusão com halos de inibição de 32-40mm e resultado intermediário no método diluição em ágar na faixa do CIM de 4-16µg/mL.

O diagrama de dispersão apresentado, na figura 6 a seguir, compara os resultados encontrados nos métodos de DD e AD para o ácido nalidíxico. O eixo da abscissa representa os halos de inibição encontrados utilizando um disco de 30µg de ácido nalidíxico e o eixo da ordenada representa as concentrações utilizadas no CIM para as 59 cepas de Hi testadas. As linhas contínuas verticais indicam pontos de corte de resultados interpretados como resistentes (halo de inibição ≤ 18 mm), de resultados intermediários (halo de inibição 19-31mm) e de resultados sensíveis (halo de inibição ≥ 32 mm). As linhas horizontais tracejadas indicam pontos de corte de resultados de sensibilidade na concentração $\leq 2\mu\text{g/mL}$, de resultados intermediários na concentração 4-16µg/mL e de resultados resistentes na concentração $\geq 32\mu\text{g/mL}$. Estes pontos de corte indicados estão de acordo com o descrito por Pérez-Vázquez e colaboradores (2004).



* localização das duas cepas β -lactamase positivas; ** quantidade de cepas encontradas no DD e CIM.

Figura 6: Comparação entres os halos de inibição em mm (DD) e as CIMs em µg/mL (AD) obtidos para amostras de *Haemophilus influenzae* frente ao ácido nalidíxico.

10.3. Sequenciamento das QRDRs dos genes *gyrA* e *parC*

Os produtos de amplificação dos genes *gyrA* e *parC* descritos por Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) obtidos das amostras clínicas de Hi apresentaram tamanhos correspondentes aos fragmentos esperados, 400pb para *gyrA* e 565pb para *parC*.

Das 59 cepas de Hi utilizadas nos testes de susceptibilidade pelos métodos de DD e AD para o ácido nalidíxico foram selecionadas 32 cepas em que se obteve resultados interpretados como intermediários e 4 cepas em que se obteve resultados interpretados como sensíveis em ambos os métodos. Também foram incluídas 7 cepas com resultados discordantes entre estes métodos de acordo com Pérez-Vázquez (2004).

Um total de 43 cepas de Hi foi seqüenciado para verificar a existência de alterações de aminoácidos na região determinante de resistência a quinolonas (QRDRs). A análise do sequenciamento do QRDRs da *gyrA* nas posições 83D, 84S, 88D, 142E e 166A mostrou que nas 37 cepas testadas não houve alteração de aminoácidos. Três cepas apresentaram alterações de aminoácidos na posição $^{142}\text{E}\rightarrow\text{K}$ e uma cepa apresentou alteração de aminoácido na posição $^{166}\text{A}\rightarrow\text{T}$. O sequenciamento desta região não foi realizado em duas cepas (tabela 9). Todas as 43 cepas de Hi seqüenciadas para a QRDRs da *ParC* não apresentaram alterações de aminoácidos nas posições 82G, 83D, 84S, 88E, mas dentro dessas cepas seqüenciadas em 26 delas ocorreram alterações em uma mesma posição $^{206}\text{G}\rightarrow\text{R}$. Uma cepa apresentou modificação na posição $^{206}\text{G}\rightarrow\text{K}$. Três cepas mostraram alterações nas posições $^{133}\text{S}\rightarrow\text{A}$, $^{138}\text{N}\rightarrow\text{S}$, $^{208}\text{D}\rightarrow\text{N}$ além da posição $^{206}\text{G}\rightarrow\text{R}$. Duas cepas apresentaram alterações nas posições $^{138}\text{N}\rightarrow\text{S}$ e $^{206}\text{G}\rightarrow\text{R}$. Três cepas apresentaram alterações nas posições $^{113}\text{P}\rightarrow\text{S}$ e $^{206}\text{G}\rightarrow\text{K}$. Duas cepas apresentaram além da alteração $^{206}\text{G}\rightarrow\text{R}$, uma substituição na posição $^{85}\text{A}\rightarrow\text{G}$ e a outra na posição $^{210}\text{V}\rightarrow\text{I}$. Apenas uma cepa apresentou uma substituição na posição $^{133}\text{S}\rightarrow\text{A}$ e uma outra cepa não apresentou nenhuma modificação de aminoácidos na região da *GyrA* e *ParC*. As três cepas que apresentaram alterações de aminoácido na posição $^{142}\text{E}\rightarrow\text{K}$ e a outra cepa com alteração na posição $^{166}\text{A}\rightarrow\text{T}$ na *GyrA* mostraram modificações também na posição $^{206}\text{G}\rightarrow\text{R}$ na *ParC*. Estas alterações dos

aminoácidos nos genes *gyrA* e *parC* e o nível de resistência ao ácido nalidíxico encontrado para as 43 cepas de Hi seqüenciadas foram mostradas na tabela 9 seguinte:

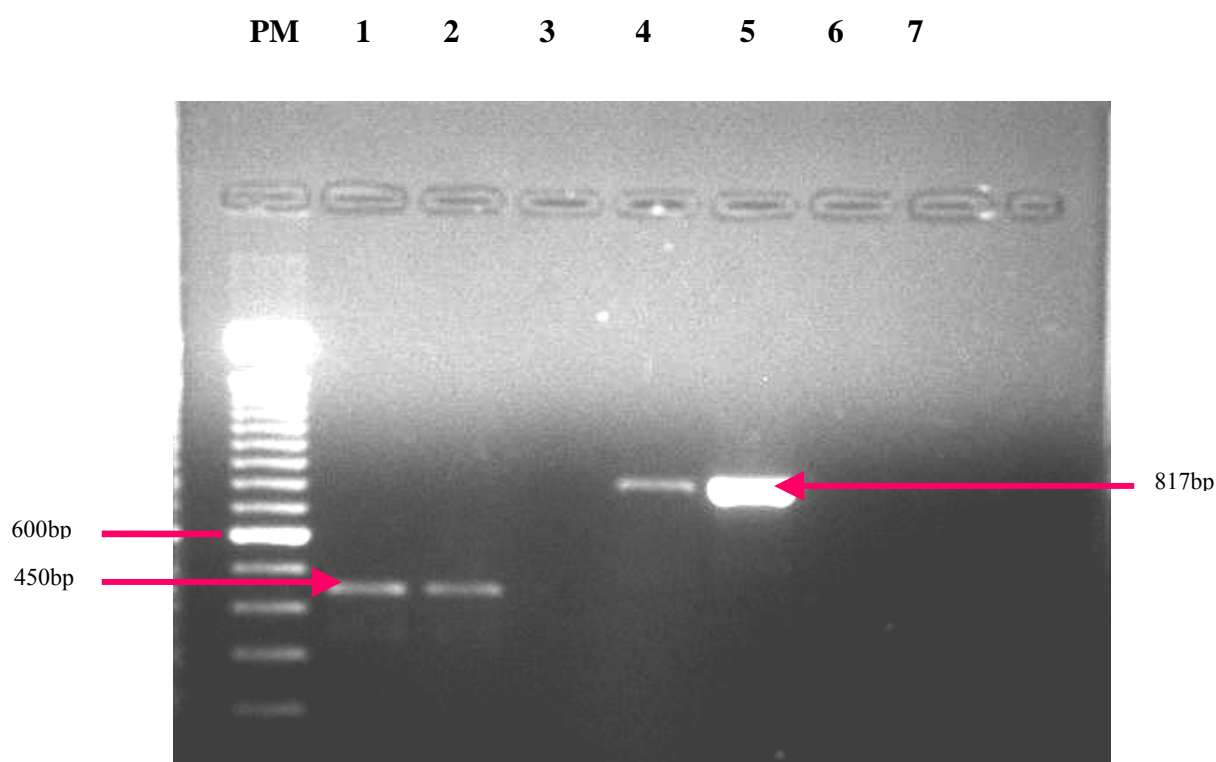
Tabela 9: Substituições dos aminoácidos na região QRDRs de *Haemophilus influenzae* sequenciados com os respectivos CIMs do ácido nalidíxico e da ciprofloxacina.

Nº	Substituições dos aminoácidos													CIM ou					
	ParC													faixa do CIM					
	GyrA													NAL (mm)	CIP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
	83	84	88	142	166	82	83	84	88	85	113	133	138			206	210	208	210
	D	S	D	E	A	G	D	S	E	A	P	S	N	G	D	V			
19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	24-31	4-8	0,03-1
3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	32-33	0,5-2	0,03
3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	35-36	8	0,03
1	*	*	*	*	*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	30	4	0,03
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	26	4	0,03
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	29	4	0,03
2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	S	--	A	--	--	--	--	32-34	8-16	0,03-0,5
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	S	--	--	--	--	--	--	27	8	0,03
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	S	R	--	--	34	4	0,03
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	S	R	--	--	30	4	0,03
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	R	--	--	40	4	0,03
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	R	--	--	30	8	<0,016
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	R	--	--	45	1	0,5
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	R	--	--	33	1	0,03
1	*	*	*	*	*	--	--	--	--	G	--	--	--	R	--	--	26	4	0,5
3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	A	S	R	N	--	25-29	4-16	0,03-0,12
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	R	--	I	29	8	0,03
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	31	8	0,03

GyrA: protéina; ParC: protéina; CIM: concentração inibitória mínima; NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; -- não houve modificação; * não foi realizado; D: ácido aspártico; S: serina; G: glicina; E: ácido glutâmico; T: treonina; V: valina; P: prolina; K: lisina; N: asparagina; A: alanina; R: arginina; I: isoleucina.

10.4. Sequenciamento dos genes da região capsular

A amplificação da região dos genes *hcsA* das amostras clínicas de Hi seguiu o protocolo descrito por Schouls e colaboradores (2008). Os fragmentos obtidos apresentaram tamanhos correspondentes ao esperado sendo 450pb para Hi tipo I e 817 pb para Hi tipo II conforme a figura 7, a seguir.



PM: Peso molecular, 100pb; 1: HibI; 2:HibI; 3: H₂O; 4:HibII; 5:HiaII; 6: H₂O; 7:Hibnegativo

Figura 7: Produto de amplificação dos dois tipos distintos de variantes entre os *Haemophilus influenzae* genótipo I e genótipo II.

Foram analisadas 28 cepas de *H. influenzae* isoladas de amostras clínicas do período pré e pós-vacinal. Durante o período pré-vacinal foram obtidos 15 isolados do líquido (53,6%) sendo 14 classificados como Hib e um como Hia. No período pós-vacinal, foram obtidos 13 isolados do líquido e hemocultura (46,4%) sendo 10 classificados com Hib e 3 como Hia. Estas amostras foram isoladas de crianças e adultos de três regiões do Brasil entre 1990 a 2007 (tabela 10).

Nenhuma das amostras clínicas analisadas neste estudo foi classificada como b⁻ também chamada Hib mutante deficiente de cápsula. Este tipo apresenta o teste de soroaglutinação negativo para o sorotipo b e não há amplificação pela PCR quando são usados os iniciadores para região capsular comum dos Hi (Hi-1 e Hi-2); no entanto, utilizando-se os iniciadores específicos para a região II dos Hib (b1 e b2) ocorre a amplificação do fragmento correspondente ao sorotipo b (Falla *et al.*, 1994). As duas cepas de referência (ATCC 33533 e ATCC 9795) foram classificadas pela ATCC como sorotipos b, mas apresentaram soroaglutinação negativa para o sorotipo b com três kits comerciais diferentes (Becton Dickinson Bioscience; PastorexTM Meningitis BIO-RAD e Slidex meningite-Kit 5). Os resultados da amplificação pela PCR apresentaram fragmentos específicos para o tipo b, o que confirma essas duas cepas como b⁻. A cepa de referência, ATCC 9795, também foi classificada como b⁻ (mutante deficiente de cápsula) por Gonin e colaboradores (2000). Todas as três cepas de referência foram classificadas como variante tipo II usando o iniciador específico *hcsA*-PCR (tabela 9).

Das 15 cepas de Hi isoladas do líquido no período pré-vacinal, 6 Hib foram classificadas como tipo I, 5 Hib foram classificadas como tipo II, sendo que 3 Hib e 1 Hia não foram classificadas nem como tipo I nem como tipo II.

Das 13 cepas de Hi isoladas no período pós-vacinal, 5 Hib foram classificadas como tipo I, sendo uma isolada do líquido de um paciente de 14 anos de idade que não havia sido vacinado contra Hib. Outra amostra foi isolada do líquido de um paciente de 4 meses de idade que recebeu apenas duas doses da vacina. Outras 2 cepas de Hib foram isoladas de sangue e líquido de pacientes que receberam todas as doses da vacina em 2004 e foram classificadas como tipo II e uma cepa de Hib foi isolada do sangue de um paciente de 1 ano de idade sem dados sobre a vacinação, classificada como tipo II. Três cepas de Hia foram isoladas do líquido e classificadas como tipo II, sendo que um paciente recebeu apenas duas doses da vacina, enquanto os outros dois pacientes receberam todas as doses da vacina. Duas cepas de Hib isoladas do líquido, no ano de 2006 e no ano de 2007, de pacientes que estavam com esquema de vacinação completo, não foram classificadas nem como tipo I e nem como tipo II (tabela 10).

A tabela 10 apresenta a distribuição dos genótipos I e II entre as 28 cepas de Hi testadas com os iniciadores descritos por Schouls e colaboradores (2008).

Tabela 10: Distribuição dos genótipos I e II em Hi nos períodos pré e pós-vacinal

Período de isolamento	Nº isolados	Idade	Status vacinação	Material	Ano	Variante capsular (Schouls et al., 2008)	PCR
Pré vacinação	6	-	NV ³	LCR ⁷	1990-1995	I	b
	5	-	NV	LCR	1994-1997	II	b
	3	-	NV	LCR	1990-1995	Negativo (tipo I-A) ⁸	b
	1	-	NV	LCR	1995	Negativo (tipo II-A)	a
Pós vacinação	1	5a ¹	Vac ⁴	Hemo	2004	I	b
	1	7m ²	Vac	LCR	2004	I	b
	1	4m	2 doses ⁵	LCR	2004	I	b
	1	4a	Vac	LCR	2007	I	b
	1	14a	NV	LCR	2007	I	b
	1	1a	ND ⁶	LCR	2002	II	b
	1	9m	Vac	Hemo	2004	II	b
	1	9m	Vac	LCR	2004	II	b
	1	6m	2 doses	LCR	2003	II	a
	1	1a	Vac	LCR	2006	II	a
	1	1a	Vac	LCR	2006	II	a
	1	3a	Vac	LCR	2006	Negativo (tipo I-A)	b
	1	7m	Vac	LCR	2007	Negativo (tipo I-A)	b
Total	28						
Referência	1			ATCC 10211		II	b
	1			ATCC 33533		II	b ⁻
	1			ATCC 9795		II	b ⁻

¹ano; ²meses; ³não vacinado; ⁴vacinado; ⁵dose incompleta; ⁶não determinado; ⁷líquor; ⁸isolados de líquido sequenciado

As amostras com amplificação negativa usando o iniciador específico previamente descritos (*hcsA*-PCR) foram sequenciadas usando novos iniciadores (Cap-1 e Cap-2) descritos na tabela 5. Os iniciadores foram desenhados para anelar em regiões conservadas flanqueando a região compreendida entre os nucleotídeos 30443-32048 da sequência do *locus cap* DQ368335. Nessa região estão localizados os sítios de anelamento dos iniciadores descritos por Schouls e colaboradores (2008) e compreende as regiões tipo I e II. O fragmento amplificado com os novos iniciadores das amostras, previamente negativas pela *hcsA*-PCR, apresentou 1606 pb. Este fragmento foi sequenciado usando os mesmos iniciadores da PCR e iniciadores internos adicionais (tabela 5). As sequências desses fragmentos apresentaram polimorfismo de nucleotídeos na região de hibridização dos iniciadores da *hcsA*-PCR descrito por Schouls e colaboradores (2008), confirmando a impossibilidade de

anelamento desses iniciadores nessas amostras e, portanto, de amplificação dos tipos I e II. Os peptídeos resultantes da tradução das sequências de nucleotídeos em aminoácidos apresentaram polimorfismo em toda sua extensão confirmando as possíveis diferenças ao nível de polissacarídeo dessas amostras com as previamente classificadas como tipos I e II. Amostras pertencentes aos tipos I e II também foram sequenciadas para comparação com as amostras negativas. Um total de 24 sorotipos b e 4 sorotipos a, isolados do líquido e do sangue, foram sequenciados.

Para determinar a relação filogenética das novas sequências com os tipos I e II, as sequências de nucleotídeos foram cortadas em tamanhos iguais de 413 bp, traduzidas para aminoácido e submetidas à análise filogenética com o auxílio do software MEGA 4.1 (TAMURA *et al.*, 2007) usando o algoritmo de Neighbor-Joining. As sequências de nucleotídeos do *locus cap* DQ 368335 (tipo I) e DQ368334 (tipo II), depositadas por Schouls e colaboradores (2008), foram também processadas da mesma forma e incluídas na análise filogenética. A árvore filogenética obtida apresentou dois grupos distintos, separando os tipos I e II. Entre as amostras que não amplificaram como os iniciadores *hcsA*-PCR, 5 amostras de Hib foram agrupadas no cluster do tipo I, e portanto foram chamadas de “tipo I-A, e 1 amostra de Hia foi agrupada no cluster do tipo II sendo chamada de “tipo II-A” (tabela 10). Estes dois novos tipos foram considerados subtipos do tipo I e tipo II, respectivamente, devido à sua relação genética com as sequências de referência (DQ 368335-tipo I e DQ368334 -tipo II) como pode ser observado na árvore filogenética (figura 8).

A razão *dn/ds* das sequências dos subtipos I-A e II-A foi determinada e comparada com as sequências das referências DQ 368335-tipo I e DQ368334-tipo II respectivamente. Houve variação do valor Z de 0.593 a 1.466 para o tipo I-A ($p=0.277$ e $p=0.073$), enquanto o valor Z foi de 2.803 ($p=0.003$) para o tipo II-A.

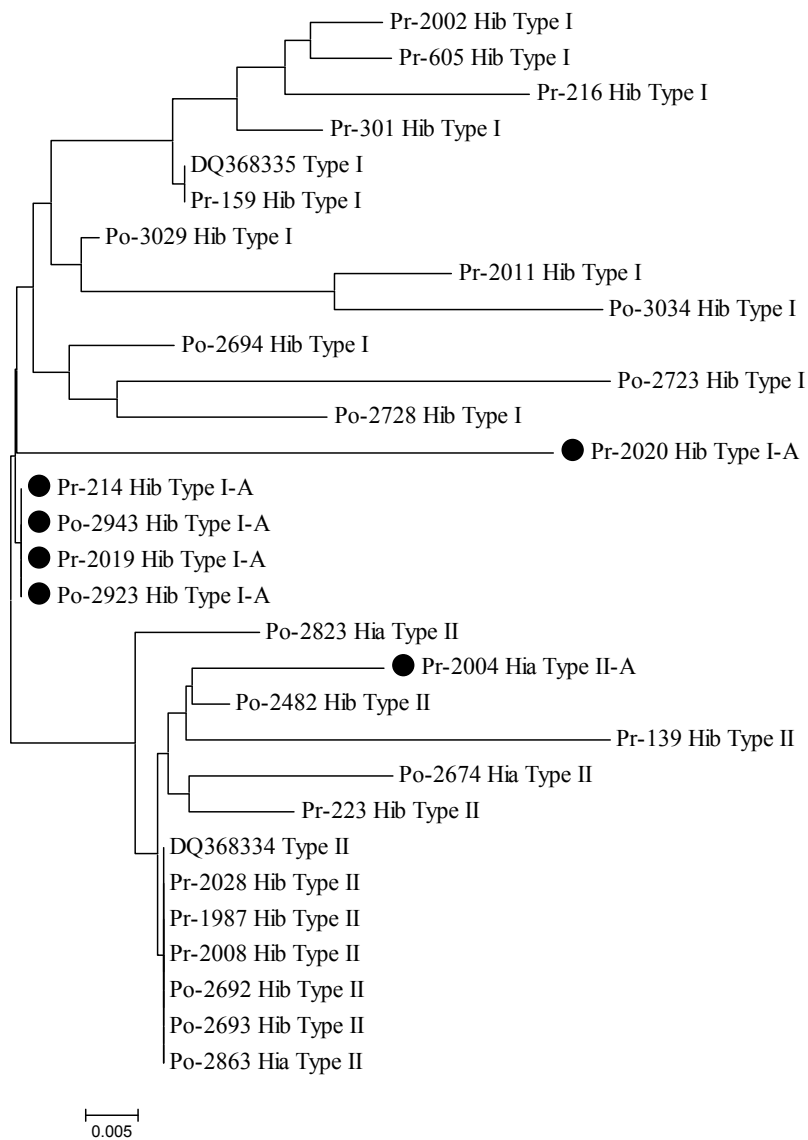


Figura 8: Análise filogenética de sequência de nucleotídeos das 28 amostras de *Haemophilus influenzae*.

Legenda: Pr: período pré-vacinal, Po: período pós-vacinal e o círculo preto (●): novas variantes tipo I-A e tipo II-A.

11. DISCUSSÃO

A ampicilina é um importante antibiótico β -lactâmico utilizado em pacientes com infecções invasivas causadas pelo *H. influenzae* (Hi). Para que ele seja utilizado com eficácia torna-se necessário verificar a susceptibilidade deste microrganismo frente a este antibiótico *in vitro*. O CLSI (2008) recomenda que a detecção da β -lactamase nas cepas de Hi seja feita através do teste de nitrocefina e que a verificação da resistência à ampicilina seja realizada com disco de ampicilina (10 μ g) ou através de determinação da CIM na concentração $\geq 4.0\mu\text{g/mL}$. Para as cepas de Hi β -lactamase negativa e ampicilina resistentes (BLNAR) o laboratório deverá reportar aos médicos como resistentes os seguintes antibióticos: a amoxicilina-clavulanato, a ampicilina-sulbactam e as cefalosporinas (cefaclor, cefprozil, cefuroxima, cefetamet, cefonicid, e loracarbef) apesar de aparentemente serem sensíveis *in vitro*. Os laboratórios de rotina seguem esses procedimentos para detectar cepas BLNAR, porém García-Cobos e colaboradores (2007) demonstraram que quase metade das amostras (49,2% de 354) de Hi BLNAR isoladas na Espanha apresentaram CIM $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$, ou seja, os CIMs apresentaram resultados abaixo do ponto de corte recomendado pelo CLSI. Estas amostras apresentaram mutações no gene responsável por alterações das proteínas ligantes de penicilina (PBPs), o gene *ftsI*. Embora a prevalência das cepas BLNAR seja baixa em diversas partes do mundo, está aumentando no Japão e Espanha (HASEGAWA *et al.*, 2006; GARCIA-COBOS *et al.*, 2007). No Canadá, o surgimento de cepas de Hi resistentes a baixas concentrações de ampicilina (low-BLNAR) foi reportado por SHUEL e colaboradores (2009). Estes autores estudaram 19 cepas de Hi com CIM na faixa de 0,125 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando redução de susceptibilidade a ampicilina e confirmaram isto através do sequenciamento do gene *ftsI*.

Neste estudo, dos 59 isolados de Hi, 45 (76%) das cepas apresentaram CIM $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$, e 8 (13,5%) das cepas apresentaram CIM de 1.0 $\mu\text{g/mL}$, sendo todas interpretadas como sensíveis com o disco de ampicilina (10 μ g). Para os laboratórios de análises clínicas estes resultados devem ser considerados como sensíveis e o tratamento dos pacientes pode ser pela administração da ampicilina, de β -lactâmicos combinados ou de alguma cefalosporina, pois seguem as recomendações do CLSI,

2008. Se analisarmos os resultados de CIM $\leq 1\mu\text{g/mL}$ encontrados para amostras isoladas no Japão, Espanha e Canadá citados acima, não há garantia de que não existam cepas Hi low-BLNAR entre essas 53 cepas brasileiras estudadas. Um estudo do gene *ftsI* deveria ser realizado para verificar se estão ocorrendo alterações das PBPs e conseqüentemente redução de susceptibilidade à ampicilina.

Do total de 59 isolados, uma cepa (1,69%) foi classificada como BLNAR e uma cepa de Hib isolada de líquido apresentou sensibilidade utilizando o disco de ampicilina (10 μg) e resultado intermediário com CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$ pelo método de ágar diluição de acordo com CLSI, 2008. Este fato foi também observado por Kärpänoja e colaboradores (2004) que demonstraram que o disco da ampicilina (10 μg) não discrimina amostras BLNAR de amostras β -lactamase negativa, sensíveis a ampicilina (BLNAS), e que o melhor caminho seria o uso do disco de ampicilina com uma concentração de 2 μg . Reforçando esta linha, Shuel e colaboradores (2009) demonstraram que com o disco de ampicilina na concentração 10 μg não se conseguiu detectar a redução da susceptibilidade a este antibiótico em 6 cepas de Hi e somente com a utilização do disco de ampicilina com 2 μg o resultado intermediário foi encontrado, confirmando a importância do uso de um disco com baixa concentração de ampicilina para detectar as amostras low-BLNAR. Os autores confirmam que o disco de ampicilina com baixa concentração, sugerido por Kärpänoja e colaboradores (2004), é um método mais eficiente para detectar resistência de amostras low-BLNAR. A BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) padronizou para o teste da susceptibilidade de *H. influenzae* o uso apenas do disco da ampicilina de 2 μg (ANDREWS *et al.*, 2007). Este procedimento pode ajudar os laboratórios clínicos a liberar resultados sobre a resistência encontrada nos Hi mais rapidamente aos médicos.

Entre os 59 isolados, apenas duas cepas de Hib (3,4%), foram produtoras de β -lactamase, ambas resistentes à ampicilina na faixa de concentração de 32 - ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, ao cloranfenicol (CLO) pelo método de disco de difusão. Também por este método uma delas apresentou resultado intermediário ao sulfametoxazol-trimetoprim (SUT). É interessante ressaltar que, de acordo com Farrell e colaboradores (2005), isolados com a enzima TEM-1 apresentam uma maior resistência ao cloranfenicol e à tetraciclina, enquanto, isolados com a enzima ROB-1 apresentam resistência ao

sulfametoxazol-trimetoprim. Nenhuma destas duas cepas apresentou resistência a ceftriaxone (CRO), resultado similar ao descrito por Shuel e colaboradores (2009) que encontraram amostras com redução da sensibilidade a cefaclor (cefalosporina de 2ª geração) e que foram totalmente sensíveis a ceftriaxone (CRO – cefalosporina de 3ª geração).

As fluoroquinolonas são recomendadas como terapia alternativa em casos de meningites bacterianas (TUNKEL *et al.*, 2004), sendo também primeira escolha nos casos de pneumonias adquiridas na comunidade e em otites em adultos causadas por *Streptococcus pneumoniae* e *H. influenzae* (YOKOTA *et al.*, 2008). Embora os Hi ainda sejam considerados sensíveis a estes antibióticos, casos de resistência têm sido reportados em pacientes com infecção no trato respiratório e em pacientes acima de 50 anos de idade (BASTIDA *et al.*, 2003; PÉREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2007; YOKOTA *et al.*, 2008). Das 59 cepas testadas, 11 (18,6%) apresentaram CIM na faixa de 0,12 a 1µg/mL para ciprofloxacina, e a maioria das cepas restantes apresentaram CIM na faixa de 0,016 a 0,06. Em nosso estudo todas as cepas foram consideradas sensíveis segundo o CLSI (2008), no entanto Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) consideram que cepas de Hi com CIMs $\geq 0,12\mu\text{g/mL}$ para ciprofloxacina apresentam redução de sensibilidade a este antibiótico. Dentro deste grupo está incluída a cepa de Hib betalactamase positiva (BLA⁺), isolada de hemocultura de uma criança com 9 meses de idade, com CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$ para ampicilina e CIM de 1µg/mL para ciprofloxacina e outra cepa de Hib betalactamase positiva (BLA⁺) isolada do líquido de uma criança com 7 meses de idade com CIM 32 µg/mL da ampicilina, mas com CIM inferior a 0,12 µg/mL para ciprofloxacina. A cepa de Hib BLA⁺ com CIM de 1µg/mL requer mais atenção, pois o uso da ampicilina e amoxicilina não é recomendado por causa da BLA⁺ e devido ao elevado CIM para a ciprofloxacina pode ocorrer resistência cruzada a outras fluoroquinolonas, conforme afirma Pérez-Vázquez e colaboradores, 2003.

Esta resistência cruzada já foi observada por outros autores em outras bactérias Gram-negativas como *Salmonellas* (Hakanen *et al.*, 1999) e em *Neisseria gonorrhoea* (Brenwald *et al.*, 2003), que utilizaram o ácido nalidíxico como teste de triagem (screening) para indicar a redução da susceptibilidade ao grupo das fluoroquinolonas. Apesar da sensibilidade das cepas de Hi à ciprofloxacina

encontrada no nosso estudo, quando foi utilizado o ácido nalidíxico como marcador de redução da susceptibilidade dos Hi observamos em 43 (72,8%) cepas diminuição na sensibilidade pelos dois métodos testados e em 10 (16,9%) cepas a redução só pelo método ágar diluição com CIM na faixa de 4 a 16µg/mL. Em apenas 6 cepas (10%) o resultado foi de sensibilidade a ciprofloxacina pelos dois métodos testados. A discrepância de resultados nas 10 cepas de Hi pode sugerir que para estes microrganismos talvez concentrações inferiores à do disco do ácido nalidíxico (30µg) possam ser mais sensíveis para detectar a redução da susceptibilidade as fluoroquinolonas.

Os estudos de sensibilidade às fluoroquinolonas estão associados a presença de mutações pontuais na região da QRDR dos genes *gyrA* e *parC* que alteram a sequência da proteína impedindo a interação das drogas com as enzimas levando a resistência. Os primeiros estudos neste campo foram realizados por Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) que propuseram valores para o ácido nalidíxico para determinar a ocorrência de mudanças de aminoácido nas QRDRs da GyrA e ParC. Com base naqueles autores, as sequências dos genes envolvidos na resistência a esses antibióticos foram estudadas através da análise do sequenciamento da região GyrA em 34 cepas com resultados do ácido nalidíxico com CIM na faixa de 4 a 16µg/mL (tabela 9). Não foram observadas mudanças nas posições 83D, 84S, 88D onde já foram descritas mutações que levaram a resistência ao antibiótico. Esta região da GyrA (posições 83D, 84S, 88D), de acordo com Georgiou e colaboradores (1996), é o primeiro alvo de ação das quinolonas e também aquele onde mutações são mais comumente encontradas em Hi. Embora tenham ocorrido mudanças dos aminoácidos na posição 142E em três cepas, apenas em duas delas o CIM do ácido nalidíxico foi de 4 a 8µg/mL e na outra cepa o CIM foi de 1µg/mL. A mudança na posição 166A ocorreu em apenas uma cepa com CIM de 1µg/mL. Nas cepas estudadas ocorreram mudanças dos aminoácidos de ácido glutâmico para lisina (posição 142E) e da alanina para treonina (posição 166A) e foram encontradas variações nos valores do CIM interpretadas como sensível e intermediária. Estas mudanças de aminoácidos aparentemente não contribuem para a resistência a este grupo de antimicrobianos.

A região da ParC (posições 82G, 83D, 84S, 88E) é o segundo alvo de ação das quinolonas (GEORGIOU *et al.*, 1996; PÉREZ-VÁQUEZ *et al.*, 2004) e nas 43

cepas sequenciadas não foram observadas mudanças nestas posições, mas apenas na posição 206G, em 42 cepas, onde ocorreu mudança da glicina para arginina ou para lisina, sendo que a maioria apresentou CIM do ácido nalidíxico na faixa 4-16µg/mL. Também ocorreram mudanças de alanina para glicina na posição 85 em uma cepa, da prolina para serina na posição 113 em três cepas e em uma cepa da valina para isoleucina na posição 210 (tabela 9). Alterações nestas posições não foram descritas por nenhum dos autores citados neste trabalho.

Em 4 cepas estudadas ocorreu mudança da serina para alanina na posição 133 e em uma delas o CIM encontrado para o ácido nalidíxico foi de 4 µg/mL. Nas outras 3 cepas o CIM foi mais elevado na faixa de 4-16µg/mL, mas havia mudanças em outras regiões da QRDR da ParC (tabela.9). Pérez-Vázquez e colaboradores (2004) encontraram esta mesma alteração em uma amostra de Hi com CIM de 32 µg/mL para o ácido nalidíxico e Li e colaboradores (2004) também encontraram esta mesma modificação em uma amostra sensível, porém grupos de pesquisadores não associaram esta mudança de aminoácidos com a resistência às fluoroquinolonas.

A mudança de asparagina para serina foi encontrada na região ParC, na posição 138, em 5 cepas estudadas com CIM para ácido nalidíxico de 4 a 16µg/mL. Estas cepas também apresentaram alterações em outras posições (tabela 9). A mudança de asparagina para serina foi associada à resistência das quinolonas em 6 cepas que apresentaram alterações também na região GyrA (posições 84 e 88) isoladas de pacientes em tratamento com fluoroquinolona nos Estados Unidos (LI *et al.*, 2004). Em contrapartida Yokota e colaboradores (2008) encontraram esta alteração em amostras de Hi sensíveis a fluoroquinolonas no Japão e, portanto não associaram a modificação com resistência nesse grupo.

Apesar de não terem sido observadas mudanças nas QRDRs da GyrA e ParC nas posições consideradas análogas (83D, 84S, 88S) através de sequenciamento realizado para este estudo, outras alterações foram encontradas e a utilização do ácido nalidíxico como indicador de resistência sugere que estas cepas poderiam estar sofrendo um novo processo de adaptação, desenvolvendo uma resistência às fluoroquinolonas através de mutações de nucleotídeos em regiões diferentes das QRDRs da GyrA e ParC. Outros alvos como *gryB*, *parE* são descritos como responsáveis pela resistência a quinolonas (GEORGIU *et al.*, 1996; PÉREZ-

VAZQUEZ *et al.*, 2004) e também dois novos mecanismos de resistência a quinolonas, a bomba de efluxo e perda de porina, estão associados ao aumento do índice de resistência (PÉREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2007). Estes mecanismos de resistência não foram objetos de estudo deste trabalho, o que poderá eventualmente vir a contribuir para elucidar a redução de susceptibilidade encontrada ao ácido nalidíxico.

Uma importante colaboração sobre a resistência às fluoroquinolonas foi dada por Bastida e colaboradores (2003) que descreveram o surgimento de resistência a esses antibióticos em pacientes com infecções respiratórias tratados com moxifloxacina, e neste caso podendo ser contraindicado o uso de outras fluoroquinolonas devido à seleção de cepas resistentes. Os autores sinalizaram que a cepa de Hi estudada adquiriu diversas mutações na QRDRs apresentando resistência cruzada a todos os antibióticos do grupo das fluoroquinolonas. Este fato mostra que uma atenção especial deve ser dada ao uso destes antibióticos devido à resistência cruzada encontrada e que os laboratórios de rotina precisam detectar estas resistências utilizando métodos apropriados.

Além das resistências a antibióticos, outro ponto importante no estudo do Hi é o surgimento de doenças invasivas causadas pelo Hib em crianças vacinadas com a vacina conjugada contra Hib, como por exemplo, na Holanda em 2002 (RIJKERS *et al.*, 2003). No Brasil, apesar da redução significativa dos casos de meningites (93.8%), um estudo em Goiás descreveu 4 casos de meningites por Hib em crianças que receberam pelo menos uma dose da vacina conjugada e um caso de uma criança com o esquema completo de vacinação contra Hib que os autores consideraram falha vacinal, porém não explicam este problema de Saúde Pública (SIMÕES *et al.*, 2004). Seria importante estudos de projeção de possibilidades de falhas da vacina conjugada contra Hib utilizada no país.

Schouls e colaboradores (2008) analisaram a sequência da região capsular (região III) onde estão localizados os genes *hcsA* e *hcsB* responsáveis pelo transporte do polissacarídeo capsular e descreveram duas variantes tipo I e tipo II ao analisarem 670 amostras de Hib isoladas nos períodos pré e pós-vacinal. O tipo I foi encontrado em ambos os períodos e o tipo II foi encontrado apenas no período pré-vacinal. Estes

autores concluíram que a variante do tipo II desapareceu após a introdução da vacina conjugada contra Hib.

Em nosso estudo, utilizamos o protocolo sugerido por Schouls e colaboradores (2008) para analisar a sequência da região capsular das amostras isoladas no Brasil. A PCR para as duas variantes (tipo I e tipo II) foi negativa em 6 amostras de Hi. Devido à falta de amplificação destas variantes desenvolvemos um novo protocolo para analisar a sequência da região da região *hcsA*, que apresentou mutações pontuais na região anelamento dos iniciadores “forward e reverse” o que explica a falha na amplificação quando os iniciadores *hcsA*-PCR desenhado por Schouls e colaboradores (2008) para o tipo I e II são utilizados. Além dessas 6 amostras que não apresentaram amplificação, 3 amostras de Hia e 3 amostras de Hib isoladas do líquido e sangue de crianças com meningite durante o período pós-vacinal foram classificadas como tipo II. Este resultado difere daquele supracitado cujo resultado mostrou que a variante tipo II desapareceu após a introdução da vacina conjugada contra Hib. Já os Hi pertencentes a variante tipo I encontrados no Brasil foram isolados em ambos os períodos pré e pós-vacinal como o observado no estudo holandês.

A análise filogenética das sequências de aminoácidos do *locus cap* na região dos genes *hcsA* e *hcsB*, que determinam as variantes dos tipos I e II, e das 6 amostras de Hi que não apresentaram amplificação depois da *hcsA*-PCR, mostrou que destas amostras, 5 cepas de Hib agruparam com cepas do tipo I e 1 amostra de Hia agrupou com as cepas do tipo II. A análise sugere a possível ocorrência de uma alteração gradual nos genes da cápsula dos *H. influenzae* entre as amostras brasileiras isoladas de doenças invasivas.

Esta mesma pesquisa realizada por Schouls e colaboradores (2008) apresentou uma comparação entre a expressão capsular e genética do tipo I e tipo II. De acordo com estes autores, a cápsula do tipo II, somente encontrada no período pré-vacinal, é menos densa que a do tipo I encontrada em ambos os períodos. As amostras de Hi tipo I apresentaram uma produção do polissacarídeo duas vezes maior que a do tipo II, o que pode ter fornecido uma vantagem seletiva para estas amostras após a introdução da vacina na Holanda. Não foi, porém, determinado o nível de expressão de polissacarídeo capsular das amostras brasileiras classificadas

como tipo I e principalmente tipo II que foram encontradas em ambos os períodos. No entanto, o nosso estudo sugere que a variante tipo II não foi eliminada com a introdução da vacinação no Brasil e que pode haver diferenças na composição e na expressão capsular das amostras isoladas na Holanda.

Com o objetivo de avaliar o nível de pressão seletiva responsável pelos eventos relacionados às mudanças ocorridas na região dos genes *hcsA* e *hcsB* envolvidos com a síntese da cápsula, foi realizada uma análise mais detalhada dessa região dos Hi estudados. A pressão seletiva sobre as proteínas pode ser quantificada pela determinação da taxa de mutações silenciosas (sem mudança de aminoácidos) e não-silenciosas (com mudança de aminoácidos). Geralmente é esperado que as mutações não silenciosas sejam eliminadas por seleções “purificadoras” (purifying selection), mas, sob certas condições e de acordo com o nível de seleção, essas mutações podem ser retidas. A determinação do número de mutações silenciosas e não-silenciosas, portanto, pode fornecer informações importantes a respeito do nível de seleção que está operando em um sistema biológico. O cálculo da taxa dn/ds pode ser aplicado permitindo avaliar as diferenças de polimorfismo em uma população de organismos sob um efeito seletivo.

Neste estudo, o valor p encontrado nas análises da razão dn/ds foi de <0.05 , indicando uma significativa seleção purificante, e sugerindo que a variação genética encontrada na amostra do tipo II-A provavelmente não afeta a expressão capsular daquela região. Entretanto, para as 5 amostras do tipo I-A, com valor $p >0.05$ e valor Z tendendo ao 0, pode-se supor que a divergência das sequências do tipo I está sendo provocada por uma seleção positiva mais do que por uma simples alteração. O aumento de eventos desse tipo poderá determinar uma significativa diversidade genética da região capsular do Hi em novos isolados. Embora essa análise não possa esclarecer a ocorrência de possíveis falhas vacinais, demonstra que as amostras circulantes no país apresentam variações genéticas importantes, que deveriam ser estudadas com mais detalhamento.

12. CONCLUSÕES

Após a introdução da vacina conjugada contra Hib, começaram a ser isolados em nosso país, outros tipos capsulares que não b e os *H. influenzae* não tipáveis (HiNT). Neste estudo, foram encontrados todos os oito biotipos de *H. influenzae* citados na literatura e apesar do biotipo I ter sido o mais frequente e isolado nos três estados brasileiros estudados, não foi possível associar o seu isolamento aos materiais clínicos, ao período de isolamento e ao tipo capsular.

As cepas *H. influenzae* produtoras de β -lactamase positiva podem ser detectadas de maneira simples e rápida pelo método de nitrocefina de acordo com o CLSI (2008). Entretanto a utilização do disco de ampicilina na concentração de 10 μ g também recomendado pelo CLSI (2008) não consegue detectar todas as cepas de *H. influenzae* low-BLNAR.

Apesar da resistência a quinolonas ainda ser considerada rara nos *H. influenzae*, neste estudo foram encontradas cepas com sensibilidade reduzida ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, indicando que a seleção de cepas resistentes e consequentemente a resistência cruzada a outros antibióticos do mesmo grupo deve ser avaliada. O ácido nalidíxico foi o antibiótico do grupo das quinolonas mais eficaz para detectar a redução da sensibilidade às cepas de *H. influenzae*.

A observação de cepas brasileiras de *H. influenzae* do tipo b isoladas de pacientes vacinados com a vacina conjugada contra Hib, e com diferenças na composição capsular (tipo II) consideradas eliminadas pela vacina em diversos países, ainda circulam em nosso país também no período pós-vacinal. Além disso, duas novas variantes dos tipos I e II foram encontradas nos períodos pré e pós-vacinal neste estudo, sugerindo que mudanças graduais dos genes da região capsular do *H. influenzae* podem estar ocorrendo e levando ao surgimento de novas variantes entre as cepas brasileiras.

13. PERSPECTIVAS

- 1) Determinar a distribuição de cepas produtoras de β -lactamase (TEM-1 e ROB-1) nos *H. influenzae* das diversas regiões geográficas do Brasil;
- 2) Avaliar a presença de cepas BLNAR através do gene *ftsI* que são responsáveis pela modificação das PBP3 responsáveis pela síntese do peptidoglicano e associar as modificações destes genes aos resultados dos testes de susceptibilidade encontrados nos laboratórios de microbiologia;
- 3) Contribuir para a elucidação da redução de susceptibilidade ao ácido nalidíxico encontrada neste estudo através da análise de outros alvos como *gryB*, *parE*, bomba de efluxo e perda de porina;
- 4) Ampliar as pesquisas de avaliação das mudanças no gene capsular de *H. influenzae* que podem levar ao surgimento de novas variantes isoladas no Brasil.

REFERÊNCIAS

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

ANDREWS J.M. BSAC standardized disc susceptibility testing method. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.60, n.1, p. 20-41, 2007.

ARACIL B. *et al.* Molecular Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Type b Causing Vaccine Failures in the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.5, p.1645-1649, 2006.

BASTIDA T. *et al.* Levofloxacin treatment failure in *Haemophilus influenzae* pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**. v.9, n.11, p.1475-1478, 2003.

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: 30 mar. 2008.

BOGDANOVICH T.; BOZDOGAN F.; APPELBAUM P.C. Effect of Efflux on Telithromycin and Macrolide Susceptibility in *Haemophilus influenzae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, n.3, p.893-898, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, 523p.1998.

BRENWALD N.P. *et al.* Detection of ciprofloxacin resistance in *Haemophilus influenzae* using nalidixic acid and BSAC methodology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.51, n.5, p.1311-1312, 2003.

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

BRYSKIER A. Ansamycins. In: **Antimicrobial Agents: Antibacterials and antifungals**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005^b. p.906-924.

CABRAL J.H.M. *et al.* Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. **Nature**. v.388, p.903-906, 1997.

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

CAMPOS J. *et al.* Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae* Infections after Extensive Vaccination against *H. influenzae* Type b. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n.2, p.524-529, 2004.

CEFACE – Centro de Farmacovigilância do Ceará – Alerta em Farmacovigilância: Risco no uso de Ketek® (Telitromicina). Disponível em: http://www.gpuim.ufc.br/ceface2_arquivos/alertas06/n_39_jan_06.pdf Acesso em: 28 jun 2008.

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/pinkbook/downloads/hib.pdf> . Acesso em: 14 maio 2008.

CERQUETTI M. *et al.* Presence of Multiple Copies of the Capsulation b Locus in Invasive *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) Strains Isolated from Children with Hib Conjugate Vaccine Failure. **The Journal of Infectious Diseases**. v.192, n.5, p.819-823, 2005.

CLSI M2-A9: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Ninth Edition. Wayne, Pennsylvania. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2006.

CLSI M7-A7: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition. Wayne, Pennsylvania. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2006.

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

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.

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. *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.

DRLICA K.; ZHAO X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V.61, n.3, p.377-392, 1997.

DWORKIN M.S.; PARK L.; BORHARDT S.M. The Changing Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Especially in Persons ≥ 65 Years Old. **Clinical Infectious Diseases**. v.44, n.6, p.810-816, 2007.

EUZÉBY JP. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature - Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire - France. [2010]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso em 11 maio 2010.

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

FARREL D.J. *et al.* Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.56,n.4, p.773-776, 2005.

FEDER H.M.; OSIER C.; MADERAZO E.G. Choramphenicol: A Review of Its Use in Clinical Practice. **Reviews of Infectious Diseases**. v.3,n.3, p.479-491, 1981.

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.

FOTHEGILL L.D.; WRIGHT J. Influenzal meningitis: the relation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. **The Journal of Immunology**. v.24, p. 273-284,1933.

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. 2007

GARCÍA-COBOS S. *et al.* Ampicillin-Resistant Non- β -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.

GERORGIOU M. *et al.* Ciprofloxain-Resistant *Haemophilus influenzae* Strains Possess Mutations in Analogous Positions of GyrA and ParC. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.40, n.7, p.1741-1744, 1996.

GILSDORF J.R.; MCCREA 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.

GONIN P.; LORANGE M.; DELAGE G. Performance of a multiplex PCR for the determination of *Haemophilus influenzae* capsular types in the clinical microbiology laboratory. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.37, n.1, p.1-4, 2000.

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

HALL T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.41:95-98.

HAKANEN A. *et al.* Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in Salmonellas and validation of nalidixic acid screening test. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n.11, p. 3572-3577, 1999.

HARABUCHI Y. *et al.* Nasopharyngeal Colonization with Nontypeable Haemophilus influenzae and Recurrent Otitis Media. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 170, n.4, p.862-866, 1994.

HARGREAVES R.M.M.P.E. *et al.* Changing patterns of invasive *Haemophilus influenzae* disease following introduction of the Hib vaccination programme. **British Medical Journal**. v.312, p.160-161, 1996.

HASEGAWA K. *et al.* High prevalence of type b β -lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, n.6, p. 1077-1082, 2006.

HINRICHSEN S.L. **Biossegurança e Controle de Infecções**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. 865p.

HOOPER D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging Infectious Diseases**. v.7, n.2, p.337-341, 2001.

HORII T. *et al.* Emergence of telithromycin resistance in *Haemophilus influenzae* in Japan. **Journal of Medical Microbiology**. v.56, p. 1705-1706, 2007.

HOWIE S.R.C. *et al.* Re-emergence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in The Gambia following successful elimination with conjugate Hib vaccine. **Vaccine**. v.25, n.34, p.6305-6309, 2007.

ISTRE G.R. *et al.* Increasing ampicillin-resistance rates in *Haemophilus influenzae* meningitis. **American Journal of Diseases of Children**. v.138, n.4, p.366-369, 1984.

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, n.5, p.985-988, 1990.

KARLOWSKY J.A. *et al.* Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 45, n.6, p. 871-875, 2000.

KÄRPÄRNOJA P. *et al.* Disc diffusion susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* by NCCLS methodology using low-strength ampicillin and co-amoxiclav discs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.53, n.4, p. 660-663, 2004.

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

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

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

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

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.

LI X. *et al.* Quinolone-Resistant *Haemophilus influenzae* in a Long-Term-Care Facility: Nucleotide Sequence Characterization of Alterations in the Genes Encoding DNA Gyrase and DNA Topoisomerase IV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n.9., p. 3570-3572, 2004.

MANNHEIM W. Family III. *Pasteurellaceae*. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1984. p.550-575.

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

MARTINS R.E. **Impacto da vacinação contra *Haemophilus influenzae* tipo B na incidência de Meningite no Espírito Santo**. Dissertação (Mestrado em Atenção à Saúde Coletiva)- Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2005. Resumo.

MCDOWELL T.D.; REED K.E. Mechanism of penicillin killing in the absence of bacterial lysis . **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 33, n.10, p.1680-1685, 1989.

MS - Ministério da Saúde. Meningite por *Haemophilus influenzae* – Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada, Brasil, 1980 – 2005. Disponível em: [http:// portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/meningite_haemo_2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/meningite_haemo_2006.pdf). Acesso em: 23 out 2007.

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.

MYHRVOLD V.; BRONDZ I.; OLSEN I. Application of multivariate analysis of enzymatic data to classification of members of the *Actinobacillus-Haemophilus-Pasteurella* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.42, n.1, p.12-18, 1992.

NAKAMURA M. *et al.* Occurrence of Fimbria Gene hifA in Clinical Isolates of Nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. **Microbiology and Immunology**. v.50, n.4, p.327-329, 2006.

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

PELTOLA H. *et al.* Perspectiva: A Five-Country Analysis of the Impact of Four Different *Haemophilus influenzae* Type b Conjugates and Vaccination Strategies in Scandinavia. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 179, n.1, p.223-229, 1999.

PELTOLA H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21 st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use 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.* Activities of 13 quinolones by three susceptibility testing methods against a collection of *Haemophilus influenzae* isolates with different levels of susceptibility to ciprofloxacin: evidence for cross-resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, n.1, p.147-151, 2003.

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.

PÉREZ-VAZQUEZ M. *et al.* Fluoroquinolone Resistance in *Haemophilus influenzae* is Associated with Hypermutability. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n.4, p.1566-1569, 2007.

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

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.

QUINTILIANI R.J.; COURVALIN P. Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995. p.1308-1326.

RIBEIRO G.S. *et al.* Prevention of *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) Meningitis and Emergence of Serotype Replacement with Type a Strains after Introduction of Hib Immunization in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**. v.187, n.1, p109-116, 2003.

RIBEIRO G.S. *et al.* *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**. v.25, n.22, p.4420-4428, 2007.

RIJKERS G.T. *et al.* Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. **The Lancet**. v.361, p. 1563-1564, 2003.

ROSSI I.A. *et al.* Introduction of *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) vaccine into national immunization programmes: A descriptive analysis of global trends. **Vaccine**. v. 25, n.41, p.7075-7080, 2007.

SANBONGI 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**. v.50,n.7, p.2487-2292, 2006.

SATOLA S.W.; SCHIRMER P.L.; FARLEY M.M. Complete Sequence of the *cap* Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype b and Nonencapsulated b Capsule-Negative Variants. **Infection and Immunity**. v.71, n.6, p.3639-3644, 2003.

SCHNEERSON R. *et al.* Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide – protein conjugates. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 152, n.2, p.361-376, 1980.

SCHOULS L.M. *et al.* Increase in Genetic Diversity of *Haemophilus influenzae* Serotype b (Hib) Strains after Introduction of Hib Vaccination in The Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.6, p.2741-2749, 2005.

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.

SHUEL M.L.; TSANG R.S.W. Canadian β -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* isolates showing decreased susceptibility toward ampicillin have significant penicillin binding protein 3 mutations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.63, n.4, p. 379-383, 2009.

SIMÕES L.L.P. *et al.* Impacto da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b na redução de meningites, Goiás. **Revista de Saúde Pública**. v.38, n.5, p.664-670, 2004.

SUKUPOLVI-PETTY S. *et al.* 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**. v.188, n.11, p.3870-3877, 2006.

TAMURA K. *et al.*. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v.24, n.8, p.1596-1599, 2007.

TELITROMICINA. In: ANVISA. Compêndio de Bulas de Medicamentos: 2004/2005. v.2. Brasília, 2005. p. 3590-3605.

TORTORA G.J. *et al.* Mecanismos Microbianos de Patogenicidade. In: **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. p.421-439.

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

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

TSANG R.S.W. *et al.* Characterization of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Manitoba, Canadá, 2000-2006: Invasive Disease due to Non-Type B Strains. **Clinical Infectious Diseases**. v.44, n.12, p.1611-1614, 2007.

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

UBUKATA K. *et al.* Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.45, n.6, p. 1693-1699, 2001.

VITOVSKI S. *et al.* Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Carriage and Disease – A Difference in IgA1 Protease Activity Levels. **The Journal of the American Medical Association**.v.287, n.13, p.1699-1705, 2002.

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.

WAXMAN D.J.; STROMINGER J.L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. **Annual review of biochemistry**. v.52, p.852-869, 1983.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – Position Paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Weekly Epidemiological Record** **81**. p.445-452, 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Immunization Surveillance, assessment and monitoring: [2007]. 1p. Disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/Hib/en/index.html . Acesso em: 23 out. 2007.

YAO J.D.C.; MOELLERING R.C. Antibacterial Agents. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 6ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995. p.1281-1307.

YOKOTA S. *et al.* Emergence of Fluoroquinolone-Resistant *Haemophilus influenzae* Strains among Elderly Patients but Not among Children. **Journal of Clinical Microbiology**. v.46,n.1, p. 361-365, 2008.

ANEXO A-LISTAGEM DAS AMOSTRAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

Coleção INCQS	Ano	Estado	Período	Status vacinação	Idade	Material
P159	1990	RJ	PRE	NV	11m	LCR
P214	1990	RJ	PRE	NV	5m	LCR
P216	1990	RJ	PRE	NV	10m	LCR
P301	1991	RJ	PRE	NV	N/D	LCR
P605	1991	RJ	PRE	NV	N/D	LCR
P1343	1992	RJ	PRE	NV	3a	LCR
P1987	1994	RJ	PRE	NV	5m	LCR
P2002	1995	PE	PRE	NV	2a	LCR
P2004	1995	PE	PRE	NV	3a	LCR
P2008	1995	PE	PRE	NV	7m	LCR
P2011	1995	PE	PRE	NV	3m	LCR
P2019	1995	PE	PRE	NV	20a	LCR
P2020	1995	PE	PRE	NV	4m	LCR
P2028	1995	PE	PRE	NV	3a	LCR
P73/96	1997	SC	PRE	NV	N/D	LCR
P139/96	1997	SC	PRE	NV	N/D	LCR
P223/ 96	1997	SC	PRE	NV	N/D	LCR
P1439	1992	RJ	PRE	NV	11m	LCR
P1646	1993	RJ	PRE	NV	N/D	LCR
P2050	1996	PE	PRE	NV	9a	LCR
P2110	1996	PE	PRE	NV	4m	LCR
P2134	1997	PE	PRE	NV	N/D	LCR
P2482	2002	RJ	PÓS	N/D	1a	LCR
P2674	2003	SC	PÓS	VAC	6m	LCR
P2675	2003	PE	PÓS	VAC	7m	LCR
P2680	2004	PE	PÓS	VAC	2a	Hemo
P2692	2004	PE	PÓS	VAC	9m	Hemo
P2693	2004	PE	PÓS	VAC	9m	LCR
P2694	2004	PE	PÓS	VAC	7m	LCR
P2723	2004	PE	PÓS	VAC	5a	Hemo
P2728	2004	PE	PÓS	VAC	4m	LCR
P2734	2004	PE	PÓS	VAC	N/D	LCR
P2823	2006	RJ	PÓS	VAC	1a	LCR

Coleção INCQS	Ano	Estado	Período	Status vacinação	Idade	Material
P2863	2006	PE	PÓS	VAC	1a	LCR
P2923	2006	PE	PÓS	VAC	3a	LCR
P2943	2007	PE	PÓS	VAC	7m	LCR
P3000	2007	PE	PÓS	VAC	5m	LCR
P3029	2007	PE	PÓS	VAC	4a	LCR
P3034	2007	PE	PÓS	NV	14a	LCR
P2522	2002	RJ	PÓS	NV	N/D	Escarro
P2621	2003	RJ	PÓS	NV	N/D	Nasal
P2946	2007	RJ	PÓS	NV	N/D	Sec.traq
P2949	2007	RJ	PÓS	NV	N/D	Sec.traq
P2500	2002	RJ	PÓS	NV	N/D	Escarro
P2502	2002	RJ	PÓS	NV	N/D	Escarro
P2503	2002	RJ	PÓS	NV	N/D	Escarro
P2521	2002	RJ	PÓS	NV	N/D	Escarro
P2504	2002	RJ	PÓS	NV	N/D	Escarro
P2656	2003	SC	PÓS	NV	11a	LCR
P2975	2007	PE	PÓS	NV	21a	LCR
P2980	2007	RJ	PÓS	NV	N/D	L.pleural
P2511	2002	RJ	PÓS	VAC	N/D	Hemo
P2628	2003	PE	PÓS	VAC	6m	LCR
P2862	2006	RJ	PÓS	VAC	1a	LCR
P2925	2006	PE	PÓS	VAC	4a	LCR
P2950	2007	RJ	PÓS	VAC	3a	Liq.sinov.
P2958	2007	RJ	PÓS	VAC	N/D	Hemo
P3028	2007	RJ	PÓS	N/D	RN	LCR
P3044	2007	PE	PÓS	VAC	N/D	LCR

RJ: Rio de Janeiro; PRE: pré-vacinal; PÓS: pós-vacinal; NV: não vacinado; m: meses; LCR: líquido; N/D: não determinado; a: ano; VAC: vacinado; Hemo: hemocultura; L.sinov.: Líquido sinovial; Nasal: nasofaringe; Sec.traq.: secreção traqueal; L.pleural: líquido pleural; PE: Pernambuco; SC: Santa Catarina; RN: recém-nascido.



Changes in *Haemophilus influenzae* capsule locus: possible emergence of novel variants in Brazil

Alice Batalha, Antonio Eugenio Cardoso de Almeida,
Nathalia Gonçalves Santos Caldeira, Ivano de Filippis*

Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saude, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

Received 21 December 2009; accepted 14 May 2010

Abstract

A total of 28 strains of *Haemophilus influenzae* (Hi) a and b isolated from clinical samples before and after the introduction of the Hib conjugate vaccine in Brazil were analyzed to determine variants of the capsular gene. Our results suggest the occurrence of new variants closely related to types I and II previously described elsewhere. Eleven Hib strains belonged to type I, 8 were type II, and 3 Hia strains were type II. Six strains showed negative results after polymerase chain reaction targeting capsule locus; the variable regions were sequenced and compared with types I and II. Phylogenetic analysis showed that 5 Hib strains were actually subtypes of type I (type I-A), whereas 1 Hia strain was a subtype of type II (type II-A). Types I and II strains were present in both periods of vaccination. This study suggests that a gradual change in the capsule genes of *H. influenzae* is probably occurring, and novel variants might be emerging among Brazilian isolates. © 2010 Published by Elsevier Inc.

Keywords: *Haemophilus influenzae*; Capsular locus; Genetic variants; Hib conjugate vaccine

1. Introduction

Haemophilus influenzae (Hi) is responsible for a number of invasive and noninvasive diseases such as meningitis, epiglottitis, septic arthritis, and pneumonia, among others. Hi isolates are classified accordingly to the specific antigens of its capsules in serotypes from “a” to “f”, described originally by Pittman in 1931. Strains reacting with 1 of the 6 antisera (a–f) are capsulated, whereas nonreacting strains are called nontypeable (NTHi) (Satola et al., 2003).

Among the typeable species, *H. influenzae* type b (Hib) has caused a great number of infections until early 1990 (Granoff & Cates, 1985; Murphy et al., 1993). Nontypeable species have been responsible for infections of the respiratory tract acquired in collective areas, causing pneumonia, otitis media, and sinusitis (Peric et al., 2003; Ward, 1996).

The main virulence factor of Hib is the polysaccharide capsule formed by a polymer of ribose ribitol phosphate that

is also the antigen used in the production of the conjugate Hib vaccine. The production and exportation of capsular polysaccharide is coded by 10 genes in a single cassette with 3 distinct regions named regions I, II, and III (Kroll et al., 1991). The first region contains 4 *bex* genes (*bexA*, *bexB*, *bexC*, *bexD*) and encodes an ABC transporter system involved in the exportation of the capsular polysaccharide, the second region contains 4 *bcs* genes (*bcs1*, *bcs2*, *bcs3*, *bcs4*) involved in the synthesis of the specific polysaccharide, and the third region has only 2 *hcs* genes (*hcsA*, *hcsB*) that are responsible for the postpolymerization of the polysaccharide to the surface of the cell (Kroll et al., 1989; Satola et al., 2003; Sukupolvi-Petty et al., 2006).

Introduction of the conjugated capsule polysaccharide vaccine of Hib in several countries has dramatically decreased the number of cases of invasive disease caused by this type of microorganism (CDC, 1991; De Almeida et al., 2005; Hargreaves et al., 1996; NACI, 2006). Nevertheless, the reemergence of meningitis cases caused by Hib in vaccinated children that had received all doses of the vaccine against Hib was reported in several countries as cases of vaccine failure (Cerquetti et al., 2005; Howie et al., 2007; Schouls et al., 2005; Simões et al., 2004). In Brazil, Hib

* Corresponding author. Tel.: +55-21-3865-5236; fax: +55-21-2290-0915.
E-mail address: ivano.defilippis@incqs.fiocruz.br (I. de Filippis).

conjugate vaccine was introduced as part of the routine infant National Immunization Program in 1999. It was administered in children aged <1 year who were scheduled to receive 3 vaccine doses given at 2-month intervals (CVE, 2006).

After the increase of vaccine failures cases in the Netherlands, a study showed that a possible change in Hib population could have occurred after the introduction of the conjugate Hib vaccine in that country. Molecular analysis of the Hib capsule identified 2 distinct variants among the Hib isolated from children and adults, which were called type I and type II (Schouls et al., 2008). In Brazil, few studies evaluate the diversity of Hib capsule. In the present study, we analyzed the capsular diversity of Hi isolates before and after vaccination against Hib in Brazil using the approach described by Schouls et al. (2008) in their analysis of the Dutch strains. Differently from what was found by those authors, our results showed that some postvaccination strains belonged to type II. Moreover, a number of strains did not belong to any of the 2 types described by Schouls et al. (2008). These results led us to analyze the genetic structure of the capsular gene region involved in the genotyping approach previously described, suggesting that novel variants might be emerging among the Brazilian isolates analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

The strains analyzed are part of the research collection of the Laboratory of Reference Microorganisms at the National Institute of Quality Control of Health (INCQS) in the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) where they are preserved by freeze drying. We analyzed 24 Hib strains isolated from 1990 to 2007 randomly selected from 3 Brazilian states, representing 3 important geographic areas of the country: northeast (NE), southeast (SE), and south (S). These samples were isolated from patients during the pre- and postvaccination periods in Brazil. Because of the increase of serotype a in Brazil (Ribeiro et al., 2003), we also analyzed 4 Hia strains from the same period.

Three reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC 33533, ATCC 9795 and ATCC 10211) were included in the analysis. According to the ATCC online catalog, the 3 reference strains were serotype b.

2.2. Identification and serotyping

Clinical samples were streaked onto fresh chocolate agar supplemented with 1% supplement VX (Difco Laboratories, Detroit, MI) and were grown at 37 °C in a 5% CO₂ incubator overnight. Suspected Hi isolates were identified by biochemical conventional methods and serotyped by slide agglutination using *H. influenzae* serotype-specific rabbit antisera (Becton Dickinson Bioscience, Cockeysville, MD, and USA Pastorex™ Meningitis BIO-RAD and Slidex meningite-Kit 5). Strains identified as Hi were preserved by

freeze drying and freezing at –70 °C in 20% glycerol for further characterization.

2.3. Extraction and purification of genomic DNA

A loopful of overnight growth was collected and further processed for DNA extraction and purification according to the Qiagen Dneasy Tissue Kit protocol (Qiagen, Valencia, CA). The amount of DNA extracted was estimated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and comparison with a High-DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) after 0.1 µg/mL ethidium bromide staining (Sigma, St. Louis, MO). Purified DNAs were stored at –20 °C.

2.4. Polymerase chain reaction and primer design

Confirmation of capsulated Hi and serotype prediction for Hib and Hia were performed according to Falla et al. (1994). *hcsA*-polymerase chain reaction (PCR) described by Schouls et al. (2008) was carried out for the detection of the 2 Hib types (I and II). Additional primers (Cap-1 and Cap-2) flanking types I and II regions of the locus *cap* were designed using Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Fig. 1). The fragment generated was sequenced using primers Cap-1S and Cap-2S (Table 1).

Amplification of the locus *cap* region, using Cap-1 and Cap-2, was performed using Master Mix Promega (12.5µL) in a total volume reaction of 25 µL with 1 µL of DNA template and 50 pmol/µL of each primer. PCR was performed as follows: 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 50 °C, and 2 min at 72°C and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel (Bio-Rad, Hercules, CA) containing 0.1 µg/mL ethidium bromide (Sigma).

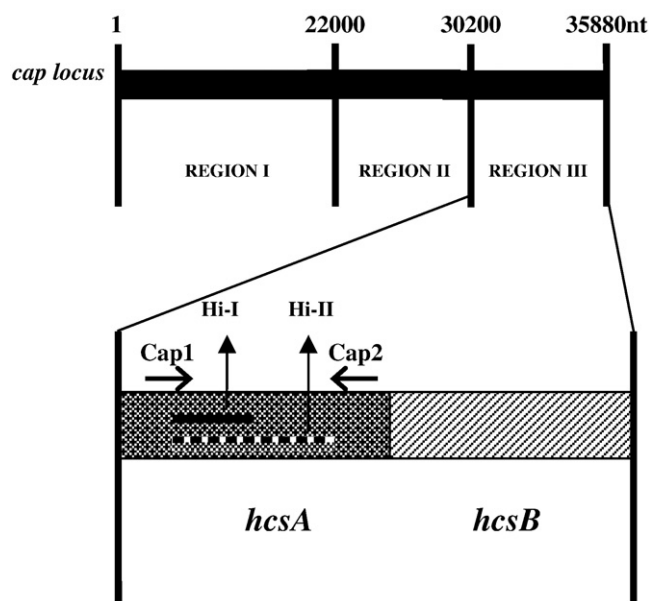


Fig. 1. Genetic organization of the capsule gene locus (*cap locus*) of *H. influenzae*.

t1.1 Table 1

t1.2 Primers used in this study

t1.3	Primer name	Sequence (5'–3')	Product size (bp)	Reference
t1.4	Hi-1	TGTCATGTCTTCAAATGATG	343	Falla et al. (1994)
t1.5	Hi-2	TGATGAGGTGATTGCAGTAGG		
t1.6	b1	GCGAAAGTGAACCTTTATCTCTC	480	Falla et al. (1994)
t1.7	b2	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA		
t1.8	a1	CTACTCATTGCAGCATTGTC	250	Falla et al. (1994)
t1.9	a2	GAATATGACCTGATCTTCTG		
t1.10	HiHcsA12667F-I	GTACTTGTTCATTGACCAAATTT	450	Schouls et al. (2008)
t1.11	HiHcsA13116R-I	GGTATATTGAAAGTATGCTGCAT		
t1.12	HiHcsA12668F-II	TGCTTGTTCATCGATCAAA	817	Schouls et al. (2008)
t1.13	HiHcsA13484R-II	ACTAAAGAAAGGGGTGCAA		
t1.14	Cap-1 ^a	TGTGTGCAAGGCTGATTCTG	1606	This study
t1.15	Cap-2 T ^a	AGTTCATCCACGGCATTGA		
t1.16	Cap-1S-F ^b	TTTTCGCCAAATGAA		This study
t1.17	Cap-1S-R ^b	TTCATTTGGCGAAAA		
t1.18	Cap-2S-F ^b	ATGCTAAAGCGCATA		This study
t1.19	Cap-2S-R ^b	TATGCGCTTTAGCAT		

t1.20 ^a PCR primers.t1.21 ^b Sequencing primers.

141 2.5. DNA sequencing

142 Sequence reactions were performed with ABI-PRISM
143 BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied
144 Biosystems, Foster City, CA) and analyzed on an ABI-3730
145 DNA sequencer (Applied Biosystems). DNA sequences were
146 submitted to GenBank under access numbers GQ457912–
147 GQ457939.

148 2.6. Phylogenetic analysis

149 Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were
150 conducted using *MEGA* version 4 software (Tamura et al.,
151 2007). Phylogenetic tree was constructed using the neighbor-
152 joining algorithm.

153 3. Results

154 A total of 28 isolates of *H. influenzae* were analyzed. The
155 strains were isolated from clinical samples before and after
156 the introduction of the Hib conjugate vaccine in Brazil in
157 1999. Fifteen strains (53, 6%) isolated from CSF of patients
158 with meningitis during the prevaccination period were
159 classified as Hib and 1 sample as Hia. During the
160 postvaccination period, 13 strains (46, 4%) were isolated
161 from CSF and blood from patients with meningitis and
162 septicemia; among these isolates, 10 were classified as Hib
163 and 3 as Hia. These strains were isolated from children and
164 adults from the 3 geographic regions of Brazil, (NE, SE, and
165 S) between 1990 and 2007 (Table 2).

166 None of the clinical strains here analyzed were classified
167 as b⁻ also called type b capsule-deficient mutants. This type
168 shows negative seroagglutination test for serotype b and no
169 amplification after *bexA*-PCR, but it shows positive
170 amplification using specific “serotype b” (b1-b2) primer
171 set (Falla et al., 1994). However, 2 reference strains (ATCC

33533 and ATCC 9795) previously classified as serotypes b
172 showed to be actually b⁻ after PCR analysis as described
173 above. Strain ATCC 9795 was also classified as type b
174 capsule-deficient mutant (b⁻) by Gonin et al. (2000). All 3
175 references strains were characterized as type II using the
176 *hcsA*-PCR (Table 2) and were preserved by freeze drying.
177 One ampoule of each strain was rehydrated and cultured only
178 once for the analysis. Among the 15 Hi strains isolated from
179 CSF in the prevaccination period, 6 Hib strains were
180 classified as type I, 5 Hib were classified as type II, and 3
181 Hib and 1 Hia were classified neither as type I nor as type II.
182 From the 13 isolates of the postvaccination period, 5 Hib
183 strains were classified as type I, but 1 of these strains was
184 recovered from the CSF of a 14-year-old patient with Hib,
185 who was not vaccinated against Hib. Another strain was
186 isolated from the CSF of a 4-month-old patient who
187 received only 2 doses of the vaccine. Other 2 Hib strains
188 isolated from blood and CSF of patients who received all
189 doses of the vaccine in 2004 were classified as type II, and
190 1 Hib strain isolated from the blood of a 1-year old patient
191 with no vaccination information was also classified as type
192 II. Three Hia samples recovered from CSF were classified
193 as type II. One patient received only 2 doses of vaccine,
194 whereas the other 2 received all doses. Moreover, 2 Hib
195 strains isolated from the CSF of patients with complete
196 vaccine coverage in 2006 and 2007 were classified neither
197 as type I nor as type II (Table 2).
198

199 Strains with negative amplification after *hcsA*-PCR were
200 submitted to sequencing analysis using specific primers
201 targeting the capsular region involved in the typing PCR. In
202 order to amplify a common region for both types I and II, a
203 set of primers was designed to target conserved sites,
204 flanking the region from 30443 to 32048 of the cap locus
205 sequence DQ368335 yielding a 1606-bp amplicon. This
206 region encompassed types I and II regions including *hcsA*-
207 PCR primer annealing sites (Fig. 1). The PCR product

t2.1 Table 2

t2.2 Characteristics of the strains used in the study

t2.3	Period of isolation	No. of strains	Age	Vaccination status	Disease	Year of isolation	Geographic source	Capsule ^a locus type	PCR ^b
t2.4	Prevaccination era	6	NI	Nonvaccinated	Meningitis	1990–1995	NE, SE	I	B
t2.5		5	NI	Nonvaccinated	Meningitis	1994–1997	NE, SE, S	II	B
t2.6		3	NI	Nonvaccinated	Meningitis	1990–1995	NE, SE	Negative (type I-A) ^c	B
t2.7		1	NI	Nonvaccinated	Meningitis	1995	NE	Negative (type II-A)	A
t2.8	Postvaccination era	1	5 years	Vaccinated	Septicemia	2004	NE	I	B
t2.9		1	7 months	Vaccinated	Meningitis	2004	NE	I	B
t2.10		1	4 months	2 doses ^d	Meningitis	2004	NE	I	B
t2.11		1	4 years	Vaccinated	Meningitis	2007	NE	I	B
t2.12		1	14 years	Nonvaccinated	Meningitis	2007	NE	I	B
t2.13		1	1 year	ND	Meningitis	2002	SE	II	B
t2.14		1	9 months	Vaccinated	Septicemia	2004	NE	II	b
t2.15		1	9 months	Vaccinated	Meningitis	2004	NE	II	B
t2.16		1	6 months	2 doses	Meningitis	2003	S	II	a
t2.17		1	1 year old	Vaccinated	Meningitis	2006	SE	II	A
t2.18		1	1 year	Vaccinated	Meningitis	2006	NE	II	A
t2.19		1	3 years	Vaccinated	Meningitis	2006	NE	Negative (type I-A)	B
t2.20		1	7 months	Vaccinated	Meningitis	2007	NE	Negative (type I-A)	B
t2.21	Total	28							
t2.22	Reference	1			ATCC 10211		II		B
t2.23		1			ATCC 33533		II		b ⁻
t2.24		1			ATCC 9795		II		b ⁻

t2.25 NI = not informed; ND = not determined.

t2.26 ^a According to Schouls et al. (2008).t2.27 ^b According to Falla et al. (1994).t2.28 ^c CSF isolates sequenced.t2.29 ^d Incomplete dose.

208 yielded was sequenced using the same primers used for PCR
 209 and an additional set of internal primers (Table 1). A total of
 210 24 serotype b and 4 serotype a strains isolated from CSF and
 211 blood were sequenced. Sequence analysis of samples with no
 212 amplification after *hcsA*-PCR showed nucleotide polymorph-
 213 ism within the primer annealing regions, confirming the
 214 failure to amplify types I or II. Deduced amino acid
 215 sequences of these samples showed additional polymorph-
 216 ism throughout the analyzed region (data not shown).
 217 Thus, we considered these strains as different types.

218 In order to determine the phylogenetic relation of the
 219 new sequences with the types already described, nucleotide
 220 sequences were equally trimmed at 413 bp, translated to
 221 amino acid, and submitted to phylogenetic analysis using
 222 neighbor-joining method with MEGA 4.1 (Tamura et al.,
 223 2007). Cap locus nucleotide sequences DQ368335 (type I)
 224 and DQ368334 (type II) were also trimmed at the same
 225 position and included in the phylogenetic analysis. The
 226 resulting tree showed 2 distinct clusters with the type I and
 227 II references sequences in each cluster along with types I
 228 and II sequence samples previously confirmed by PCR
 229 (Fig. 2). A specific set of primers was used to amplify and
 230 sequence the region spanning types I and II of the selected
 231 strains as it is shown in Table 1. Among the negative
 232 samples after *hcsA*-PCR, 5 were serotype “b” clustering
 233 into group I and 1 was a serotype “a” clustering into group
 234 II. All the other serotype “a” type II strains after *hcsA*-
 235 PCR fell into group II. The 5 samples that clustered into
 236 group I were named “type I-A” and the one within group

237 II was named “type II-A”. These 2 new types were
 238 considered subtypes of types I and II, respectively, because
 239 of the related genetic distance to the reference sequences
 240 DQ368335 (type I) and DQ368334 (type II), respectively,
 241 observed in the phylogenetic tree (Fig. 2).

242 We have determined the *dn/ds* ratio for type I-A and II-A
 243 sequences compared to reference sequences DQ368335
 244 (type I) and DQ368334 (type II), respectively. *Z* value varied
 245 from 0.593 to 1.466 for type I-A ($P = 0.277$ and $P = 0.073$),
 246 whereas for type II-A, $Z = 2.803$ ($P = 0.003$).

4. Discussion

247 Infectious diseases caused by Hib can be prevented since
 248 the end of the 1980 decade with the introduction of the
 249 conjugated vaccine in the industrialized countries, with an
 250 efficacy rate higher than 90% in the first months of life
 251 (Peltola, 2000). In the Netherlands, Hib vaccination was
 252 introduced in 1993. In 2002, a small number of fully
 253 vaccinated children have experienced invasive Hib disease
 254 (Rijkers et al., 2003). In Brazil, according to data from the
 255 Brazilian National Health Foundation, following the intro-
 256 duction of Hib conjugate vaccine, the incidence of Hib
 257 meningitis decreased by 93.8% in 7 years, from 1616 cases
 258 in 1999 to 100 cases in 2005 (MS, 2006). Despite this
 259 significant reduction of cases of meningitis, a study in Goiás
 260 (a central state of Brazil) showed 4 Hib cases of meningitis in
 261 children that received at least 1 dose of conjugated Hib
 262

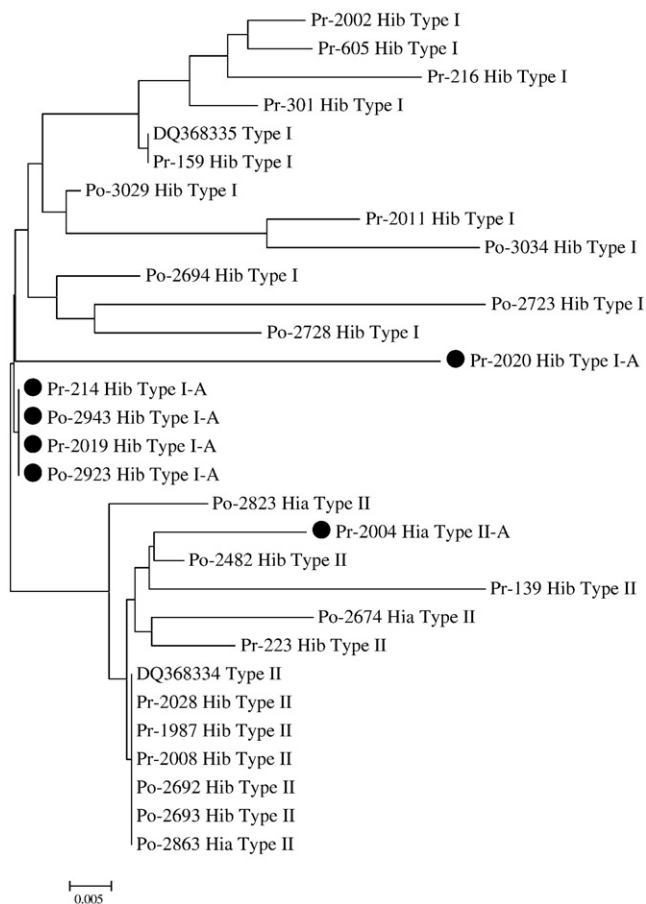


Fig. 2. Phylogenetic analysis of 28 *H. influenzae* strains based on the genetic diversity of deduced amino acid sequences of the *cap* locus region III spanning genes *hcsA* and *hcsB*. Sequences DQ368335 and DQ368334 were deposited as types I and II, respectively, and were used to compare with the sequences of our study. Pr = prevaccination; Po = postvaccination. Full black circles highlight new variants.

263 vaccine, and 1 case of vaccine failure was detected (Simões
264 et al., 2004).

265 The study of Schouls et al. (2008) shows 2 types after
266 sequencing analysis of the capsular region spanning the
267 region where genes *hcsA* and *hcsB* responsible for the
268 polysaccharide capsule transport are located. The presence of
269 the 2 types among the 670 Hib Dutch strains analyzed was
270 associated to the pre- and postvaccination period, because
271 type I was found in both periods and type II only during the
272 prevaccination era. These results led the authors to assume
273 that type II would not be found among strains circulating
274 after the introduction of the conjugate vaccine against Hib.

275 In our study, 6 strains gave negative PCR results for the 2
276 types previously described. The failure to amplify types I or
277 II led us to perform a sequencing analysis of the *hcsA* region
278 targeted by the PCR. The region showed a number of point
279 mutations on the 3' regions of the primer annealing sites
280 (forward and reverse), which could explain the failure to get
281 the expected types I or II amplicons. Moreover, we found
282 that 3 serotype a and 3 serotype b strains isolated from CSF

of children with meningitis during the postvaccination period
283 were classified as type II. Although the Dutch study showed
284 that type II disappeared after the introduction of Hib vaccine,
285 type I strains were found in both pre- and postvaccination
286 periods as well as observed in the Netherlands. 287

A phylogenetic analysis comparing the capsular genes
288 *hcsA* and *hcsB* determining regions of types I, II, and the 6
289 strains that did not show amplification after the *hcsA*-PCR
290 showed that 5 Hib strains were closer to type I and 1 Hia was
291 closer to type II strains. Because of this similarity, we
292 considered these 2 new variants as subtypes of type I and
293 type II. This observation suggests that a gradual change in
294 the capsule genes of *H. influenzae* is happening with the
295 Brazilian strains isolated from invasive disease. The
296 presence of 1 serotype "a" strain in the same cluster of 6
297 serotype "b" strains all belonging to type II may suggest a
298 possible capsule switching. However, we believe that
299 additional sequence analysis of regions I and II should be
300 performed to confirm possible recombination events among
301 strains of the 2 serotypes, because only a small part of region
302 III of the cap locus, which apparently has no influence on the
303 polysaccharide type, was analyzed. 304

Schouls et al. (2008) showed a correlation between the
305 expression of capsule polysaccharide and genetic types I and
306 II. According to that study, the capsular layer of type II cells,
307 which were only found during the prevaccination period,
308 was thinner than type I cells, found in both periods. These
309 findings may support the advantage of variants expressing
310 more capsular polysaccharide against the conjugate Hib
311 vaccine; however, we did not determine the level of capsule
312 expression of type II strains, which were found during both
313 pre- and postvaccination periods. Our results actually
314 suggest that these strains were not eliminated with
315 vaccination in Brazil; thus, they may show a different
316 capsule expression and composition from the type II strains
317 isolated in the Netherlands. 318

Considering that *P* values found for *dn/ds* ratio analysis
319 were <0.05, which indicates significant purifying selection,
320 it is easy to infer that the genetic variation found in the
321 type II-A strain is probably not affecting capsule expression
322 at that region. However, for the 5 type I-A strains, with
323 *P* values >0.05 and *Z* values tending to 0, we might suggest
324 that the divergence of these sequences from type I is
325 probably being operated by a positive selection rather than
326 by a chance alone. The arising of such evolutionary events
327 could eventually lead to a significant genetic diversity of that
328 cap locus region. Although our study could not clarify
329 possible vaccine failures, it shows genetic variations of
330 circulating strains that should be studied in more details. 331

We believe that it would be important to increase
332 *H. influenzae* surveillance and to investigate all Hi strains
333 isolated to shed lights on the understanding of the potential
334 reemergence of cases of meningitis in vaccinated children.
335 The potential changing of capsular genes of *H. influenzae*
336 should be considered in the light of public health concerns,
337 and the assessment of additional studies in this area will
338

surely help to determine the need for a vaccine reformulation to broaden its efficacy.

Acknowledgments

The authors are grateful to the “Plataforma Genômica—Sequenciamento de DNA/ PDTIS-FIOCRUZ”. This work was supported by INCQS/FIOCRUZ. This work was supported by INCQS/FIOCRUZ. The authors are in debt to Nadjla de Souza and Tania Catão from Lacen/PE, Rita Bertoncini from Lacen/SC, and Cléia Cunha from IFF/RJ who provided the Hi isolates.

References

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1991) *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. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 40:1–7.
- Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) (2006) Calendário de vacinação para o Estado de São Paulo. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/imuni/imu_calen04.htm2006.
- Cerquetti M, Cardines R, Atti MLCD, Giufré M, Bella A, Sofia T, Mastrantonio P, Slack M (2005) Presence of multiple copies of the capsulation b locus in invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) strains isolated from children with Hib conjugate vaccine failure. *J Infect Dis* 192:819–823.
- De Almeida AECC, De Filippis I, Abreu AO, Ferreira DG, Gemal AL, Marzochi KBF (2005) Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Braz J Med Biol Res* 38:777–778.
- Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskell D, Kroll S, Moxon ER (1994) PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 32:2382–2386.
- Gonin P, Lorange M, Delage G (2000) Performance of a multiplex PCR for the determination of *Haemophilus influenzae* capsular types in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37:1–4.
- Granoff DM, Cates KL (1985) *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. *J Pediatr* 107:330–336.
- Hargreaves RMMPE, Slack AJ, Howard EC, et al (1996) Changing patterns of invasive *Haemophilus influenzae* disease following introduction of the Hib vaccination programme. *Br Med J* 312:160–161.
- Howie SRC, Antonio M, Akisanya A, Sambou S, Hakeem I, Secka O, Adegdola RA (2007) Re-emergence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in The Gambia following successful elimination with conjugate Hib vaccine. *Vaccine* 25:6305–6309.
- Kroll JS, Zamze S, Loynds B, Moxon R (1989) Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 171:3343–3347.
- Kroll JS, Loynds BM, Moxon ER (1991) The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon. *Mol Microbiol* 6:1549–1560.

- Ministério da Saúde (MS) (2006) Meningite por *Haemophilus influenzae*— Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada, Brasil, 1980–2005. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/meningite_haemo_2006.pdf2006.
- Murphy TV, White KE, Pastor P, Gabriel L, Medley F, Granoff DM, Osterholm MT (1993) Declining incidence of *Haemophilus influenzae* type b disease since introduction of vaccination. *J Am Med Assoc* 269:246–248.
- National Advisory Committee on Immunization (NACI) (2006) *Haemophilus* vaccine. 7th ed. , pp. 172–178.
- Peltola H (2000) Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 13:302–317.
- Peric M, Bozdogan B, Jacobs MR, Appelbaum PC (2003) Effect of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1017–1022.
- Pittman M (1931) Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med* 53:471–492.
- Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM, Lima JBT, Gouveia EL, Petersen M, Salgado K, Silva HR, Zanella RC, Almeida SCG, Brandileone MC, Reis MG, Ko AI (2003) Prevention of *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib Immunization in Brazil. *J Infect Dis* 187:109–116.
- Rijkers GT, Vermeer-de-Bondt PE, Spanjaard L, et al (2003) Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. *Lancet* 361:1563–1564.
- Satola SW, Schirmer PL, Farley MM (2003) Complete sequence of the *cap* locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. *Infect Immun* 71:3639–3644.
- Schouls LM, van der Ende A, van De Pol I, Schot C, Spanjaard L, Vauterin P, Wilderbeek D, Witteveen S (2005) Increase in genetic diversity of *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) strains after introduction of Hib vaccination in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 43:2741–2749.
- Schouls LM, van der Heide H, Witteveen S, Zomer B, van der Ende A, Burger M, Schot C (2008) Two variants among *Haemophilus influenzae* serotype b strains with distinct *bcs4*, *hcsA* and *hcsB* genes display differences in expression of the polysaccharide capsule. *BMC Microbiol* 8:1–11.
- Simões LLP, Andrade ALSS, Laval CA, Oliveira RM, Silva AS, Martelli CMT, Alves SLA, Almeida RM, Andrade JG (2004) Impacto da vacinação contra o *Haemophilus influenzae b* na redução de meningites, Goiás. *Rev Saude Publica* 38:664–670.
- Sukupolvi-Petty S, Grass S, Geme JWST (2006) The *Haemophilus influenzae* type b *hcsA* and *hcsB* gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. *J Bacteriol* 188:3870–3877.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Ward JL (1996) Invasive infections due to *Haemophilus influenzae* serotype f (Hif)—is Hif an emerging pathogen? *Clin Infect Dis* 22:1077–1081.