

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

Ingrid de Menezes Brasil

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* COM  
SUSCEPTIBILIDADE REDUZIDA AOS ANTIMICROBIANOS E DE PERFIS  
GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA NO PERÍODO PÓS-VACINAL**

Rio de Janeiro

2020

Ingrid de Menezes Brasil

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* COM  
SUSCEPTIBILIDADE REDUZIDA AOS ANTIMICROBIANOS E DE PERFIS  
GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA NO PERÍODO PÓS-VACINAL

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

Orientadores:

Dr. Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Brasil, Ingrid de

Avaliação epidemiológica de haemophilus influenzae com susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos e de perfis genéticos de resistência no período pós-vacinal. / Ingrid de Brasil. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

80 f. : fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientador: Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida. Co-orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso.

1. Haemophilus influenzae. 2. Suscetibilidade aos antimicrobianos. 3. Vacina conjugada. 4. Meningite. 5. Tipagem de Sequências Multilocus.  
I. Título.

Epidemiological evaluation of haemophilus influenzae with reduced susceptibility to antimicrobials and genetic resistance profiles in the post-vacinal period.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

Ingrid de Menezes Brasil

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* COM  
SUSCEPTIBILIDADE REDUZIDA AOS ANTIMICROBIANOS E DE PERFIS  
GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA NO PERÍODO PÓS-VACINAL

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

Aprovada em: 26/11/2020

BANCA EXAMINADORA

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Sergio Eduardo L. Fracalanza (Doutor)

Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Suely Aparecida Pimenta Fracalanza (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Celia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Felipe Piedade G. Neves (Doutor)

Universidade Federal Fluminense.

ORIENTADOR(ES)

Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

*“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta,  
aperfeiçoamento sem sacrifícios, assim como  
não existe tranquilidade sem paciência”*

*Chico Xavier.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado determinação para superar os momentos difíceis e sabedoria para seguir as melhores escolhas durante essa dura jornada;

Agradeço aos meus pais Luzia e Sidnei por sempre apoiar minhas escolhas e me encorajar a acreditar em mim mesma, especialmente a minha mãe, por todo o auxílio nos estudos durante minha vida escolar.

Ao meu namorado Igor, por estar comigo tanto nos momentos difíceis como nos alegres mas, especialmente, em todos os momentos importantes da minha vida;

A Thaís Santos pela amizade e momentos de descontração;

Aos meus queridos orientadores Dr. Eugenio e Dr. Ivano de Filippis, pela orientação, oportunidade de ingresso na FIOCRUZ e confiança;

A Cláudia Andrade e Nathália Caldeira, que foram essenciais neste período. Muito obrigada pela importante ajuda com os experimentos e pelo apoio;

A Kayo Bianco pelas dicas e sugestões inestimáveis durante os testes moleculares;

A Ana Paula (Aninha) por toda a ajuda que me deu e paciência de me explicar novamente quando não entendia, pelas dicas e pela gentileza;

À professora, Maysa Beatriz Mandetta Clementino, pelas importantes sugestões durante a elaboração deste estudo e por acreditar no meu potencial;

A todos do Setor de Meios de Cultura, Mônica, Will, Marcos, Pedro Paulo e Jorge por me acolherem com tanta naturalidade, sem vocês tudo teria sido mais difícil;

A todos do Setor de Esterilização, pela compreensão, gentileza e paciência;

Agradeço a Débora, Ana Carolina, Lucas, Mariana, Andressa e Gabriel, por terem me ajudado de diferentes formas durante a realização do projeto;

Aos amigos do INCQS Fábio, Danielle, Rayssa e Éder, pelos momentos divertidos durante o almoço;

À madrinha Luzinete, que mesmo distante, sempre torceu pelo meu sucesso, obrigada pelo carinho e incentivo;

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

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

## RESUMO

As bactérias do gênero *Haemophilus* pertencem à família *Pasteurellaceae*, sendo oito espécies pertencentes a este gênero, conhecidas como agentes de infecções ou de colonização no homem, dentre as quais se destaca a espécie *H. influenzae* (Hi). Hi é classificada em seis sorotipos designados de a-f e os não-tipáveis (HiNT). No período pré-vacinal o sorotipo b era o principal causador de infecções invasivas, como meningite, pneumonia e bacteremia, em crianças, provocadas por Hi. No entanto, após o emprego da vacina, nos dias atuais, os HiNT destacam-se sendo frequentes causadores de infecções localizadas, tais como: Conjuntivite, otite média e sinusites em crianças, apesar que, nos últimos anos foram relatados a ocorrências de infecções invasivas, em adultos, principalmente idosos, provocadas por HiNT vem se tornado cada vez mais frequentes, ao redor do globo. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a resistência aos antimicrobianos, mais utilizados, no tratamento de infecções invasivas, provocadas por Hi, no Brasil e, caracterizar marcadores de resistência. Concomitantemente, realizar um estudo epidemiológico, a partir de relações clonais (MLST), de amostras com susceptibilidade reduzida a antibióticos, após duas décadas do uso da vacina. Entre as 69 amostras estudadas, foi observada uma taxa de colonização, em crianças e adolescentes, de 55% e 21,7% em adultos, sendo os HiNT mais frequentes em todas as faixas etárias e o biotipo mais encontrado foi o III. Foi observada uma resistência à ampicilina de 24,6%, 13% à Sulfametoxazol+trimetoprim e 4,3% à Amoxicilina+Ácido clavulânico, onde os HiNT apresentaram maior resistência. Os demais antimicrobianos testados inibiram o crescimento microbiano, sendo considerados, ainda, uma boa opção para o tratamento de infecções provocadas por Hi. A produção de  $\beta$ -lactamase foi o principal mecanismo de resistência, tendo sido o gene *bla<sub>TEM</sub>* detectado em 23,1% das amostras enquanto o gene *bla<sub>ROB</sub>*, não foi observado. Dezoito cepas apresentaram alteração no gene *ftsI*, principalmente, na posição 526N→526K. Dentre os 21 isolados (HiNT) com perfis alélicos completos de MLST, dezenove novos STs foram descritos no presente estudo, confirmando o que outros autores já descreveram sobre a heterogeneidade dos não-tipáveis, sendo apenas o ST-1355, já descrito no banco de dados e observado apenas em cepas brasileiras até o momento. O desenvolvimento deste estudo nos permitiu acompanhar as alterações do perfil de cepas Hi para determinação de suas relações genóticas e ocorrência de possíveis clones epidêmicos. Além disso, foi confirmada a eficácia da vacina contra o Hib, mesmo após vinte anos de sua implantação, apontando para a necessidade de vigilância contínua para os HiNT,

já que os mesmos apresentaram alto percentual de colonização independente da faixa etária, resistência a alguns antimicrobianos e mutações significativas no gene *ftsI*.

Palavra- chave: *Haemophilus influenzae*. Meningites. Vacina conjugada. Suscetibilidade aos antimicrobianos. MLST.



## ABSTRACT

The Bacteria of the genus *Haemophilus* belong to the *Pasteurellaceae* family, with eight species grouped in this genus known as agents of invasive infections or colonization in man, among which the specie *H. influenzae* (Hi) stands out. Hi is classified into six serotypes named *a* to *f* and non-typable (HiNT). In the pre-vaccination period, serotype b was the main cause of invasive infections, such as meningitis, pneumonia and bacteremia caused in children by Hi. However, after the introduction of the conjugate vaccine, HiNT has been reported as a frequent cause of localized infections, such as: conjunctivitis, otitis media and sinusitis in children, although, in recent years, reports of invasive infections in adults, mainly the elderly, caused by HiNT have become increasing frequency world wide. The main objective of this work was to evaluate the susceptibility to the most used antimicrobials in the treatment of invasive infections caused by Hi in Brazil and to characterize resistance markers. Concomitantly, carry out an epidemiological study based on clonal relationships (MLST) of resistant samples after two decades of vaccine introduction. Among the 69 samples studied, was observed a colonization rate in children and adolescents of 55% and 21.7% in adults, with HiNT being the most frequent in all age groups and the most found biotype was III. The samples showed 24.6% decreased susceptibility to Ampicillin, 13% to Sulfamethoxazole + trimethoprim and 4.3% to Amoxicillin + Clavulanic acid, where HiNT played a prominent role. The other antimicrobial tested inhibited microbial growth and are still considered a good option for treating infections caused by Hi. The production of  $\beta$ -lactamase was the main mechanism of resistance, with the *bla<sub>TEM</sub>* gene being detected in 23.1% of the samples while the *bla<sub>ROB</sub>* gene was not observed. Nineteen strains showed alteration in the *ftsI* gene mainly at position 526N  $\rightarrow$  526K. Among the 21 isolates (HiNT) with complete MLST allelic profiles, nineteen new STs were described in the present study, confirming what other authors have already described about the heterogeneity of non-typable strains, with only ST-1355 already described in the database, which has been only reported in Brazilian strains so far. The development of this study was important to monitor changes in the profile of Hi strains to determine their genotypic relationships and to investigate clonal relationships, in addition, it was confirmed the effectiveness of the vaccine against Hi after twenty years of its implantation and points to the need for continuous surveillance for HiNT, since they showed a high percentage of colonization regardless of age, resistance to some antimicrobials and significant mutations in the *ftsI* gene.

Keyword: *Haemophilus influenzae*. Meningitis. Conjugate vaccine. Susceptibility to antimicrobials. MLST.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <i>adK</i>               | Adenilato-quinase   |
| AMC                      | Amoxicilina e ácido clavulanato   |
| AMP                      | Ampicilina  |
| ATCC                     | American Type Culture Collection  |
| <i>atpG</i>              | Subunidade gama F1 ATP sintase  |
| <i>bexA,B,C,D</i>        | Genes da região I do <i>H. influenzae</i>   |
| <i>bla<sub>TEM</sub></i> | Gene plasmidial codificador de $\beta$ -lactamase   |
| <i>bla<sub>ROB</sub></i> | Gene plasmidial codificador de $\beta$ -lactamase   |
| BHI                      | Brain Heart Infusion  |
| BLN                      | Não produtora de $\beta$ -lactamase   |
| BLP                      | Produtora de $\beta$ -lactamase   |
| BLNAR                    | Resistência a ampicilina, não produtora de $\beta$ -lactamase   |
| BLPAR                    | Resistência a ampicilina, produtora de $\beta$ -lactamase   |
| BLPACR                   | Resistente a amoxicilina + ácido clavulânico, produtora de $\beta$ -lactamase com alteração no gene <i>ftsI</i> |
| <i>cap</i>               | Cassete responsável pela síntese e transporte do polissacarídeo   |
| CIM                      | Concentração Inibitória Mínima  |
| CIP                      | Ciprofloxacina  |
| CLO                      | Cloranfenicol   |
| DHFR                     | di-hidrofolato redutase   |
| DNA                      | Deoxyribonucleic acid   |
| DTP+Hib                  | Vacina tetravalente   |
| EDTA                     | Ácido etilenodiamino tetra-acético  |
| EUCAST                   | <i>European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases</i>  |

|             |   |
|-------------|---|
| FIOCRUZ     | Fundação Oswaldo Cruz                                 |
| <i>frdB</i> | Subunidade ferro-enzofre fumato-redutase              |
| <i>ftsI</i> | Gene codificador da subunidade 3 da PBP               |
| <i>fucK</i> | Fuculo-kinase   |
| <i>gyrA</i> | Gene codificador da subunidade A da enzima DNA-gyrase |
| Hap         | Proteína de Haemophilus de Aderência e penetração     |
| Hi          | <i>Haemophilus influenzae</i>                         |
| Hia         | <i>Haemophilus influenzae</i> tipo a                  |
| Hib         | <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b                  |
| Hic         | <i>Haemophilus influenzae</i> tipo c                  |
| Hid         | <i>Haemophilus influenzae</i> tipo d                  |
| Hie         | <i>Haemophilus influenzae</i> tipo e                  |
| Hif         | <i>Haemophilus influenzae</i> tipo f                  |
| Hinb        | <i>Haemophilus influenzae</i> não b                   |
| HiNT        | <i>Haemophilus influenzae</i> não Tipáveis            |
| HIV         | Vírus da imunodeficiência humana                      |
| HTM         | Haemophilus test médium                               |
| IgA         | Imunoglobolína Humana A                               |
| IgG         | Imunoglobolína Humana G                               |
| IgM         | Imunoglobulina humana M                               |
| INCQS       | Instituto Nacional de Controle de Qualidade           |
| LCR         | Líquido cefalorraquidiano                             |
| LOS         | Lipooligossacarídeo                                   |
| LPS         | Lipopolissacarídeo                                    |
| <i>mdH</i>  | Malato-desidrogenase                                  |

|             |   |
|-------------|---|
| MLST        | <i>Multilocus Sequencing Typing</i>                           |
| NAD         | Nicotinamida adenina dinucleotídeo                            |
| NC          | Não capsulado   |
| NT          | Não-tipável   |
| OMP         | Proteína de Membrana Externa                                  |
| <i>parC</i> | Gene codificador da Topoisomerase IV                          |
| PBP         | Penicillin Binding Proteins                                   |
| PCR         | Reação em Cadeia da Polimerase                                |
| <i>pgI</i>  | Glicose-6-fosfato Isomerase                                   |
| PHiD-CV     | Vacina Pneumocócica 10-valente conjugada à proteína D do HiNT |
| PRP         | Polirribosil-ribitol-fosfato                                  |
| <i>recA</i> | Proteína RecA   |
| RNA         | Ácido ribonucleico  |
| <i>rpoB</i> | Codificadora subunidade $\beta$ da RNA polimerase             |
| SAL         | Soroaglutinação em Lâmina                                     |
| SMX         | Sulfametaxazol  |
| SNC         | Sistema nervoso central                                       |
| ST          | Sequencetype  |
| SUT         | Sulfametaxazol + Trimetropim (cotrimoxazol)                   |
| TMD         | Trimetropim   |

## LISTA DE FIGURAS

|          |   |       |
|----------|---|-------|
| Figura 1 | Microscopia em lâmina de <i>H. influenzae</i> colorado através da técnica de coloração Gram.....                | de 18 |
| Figura 2 | Estruturas dos seis tipos de capsulas polissacarídicas de Hi.....   | 21    |
| Figura 3 | Alterações encontradas nas posições 437, 441, 452 e 454 na amostra P5680 e na posição 449 da amostra P6363..... | 49    |
| Figura 4 | Minimum Spanning Tree (MST) com os 2324 ST depositados no banco de MLST de Hi.....                              | 53    |
| Figura 5 | MST com destaque para o grupo de novos ST descritos nesse estudo, formado a partir do ST1355.....               | 54    |
| Figura 6 | MST com destaque para a alocação do novo ST2287 descrito nesse estudo.....                                      | 54    |
| Figura 7 | MST com as cepas isoladas no Brasil.....  | 55    |
| Figura 8 | MST com as cepas isoladas no Brasil.....  | 56    |

## LISTA DE GRÁFICO

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Gráfico 1 | Distribuição quantitativa de cepas oriundas de casos clínicos estudadas por ano e estado ..... | 33 |
| Gráfico 2 | Biotipos encontrados neste estudo.....   | 41 |
| Gráfico 3 | Sorotipos encontrados neste estudo.....  | 41 |
| Gráfico 4 | Distribuição de sorotipos encontrados de acordo com a faixa etária.....                        | 42 |

## LISTA DE TABELAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1  | Classificação do <i>H. influenzae</i> em biótipos, segundo reações bioquímicas.....                        | 19 |
| Tabela 2  | Iniciadores utilizados para a tipagem molecular <i>Haemophilus influenzae</i> .....                        | 37 |
| Tabela 3  | Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes <i>ftsI</i> , <i>bla-TEM</i> e <i>bla-ROB-1</i> ..... | 38 |
| Tabela 4  | Iniciadores utilizados no MLST.....  | 39 |
| Tabela 5  | Distribuição de cepas por faixa etária.....  | 40 |
| Tabela 6  | Distribuição de sorotipo de acordo com o material de origem e faixa etária.....                            | 43 |
| Tabela 7  | Percentuais de resistência para cada antimicrobiano.....   | 44 |
| Tabela 8  | Amostras de Hi resistentes os três tipos de antimicrobianos.....   | 45 |
| Tabela 9  | Percentual de sorotipos de cepas resistentes distribuídos por biótipo encontrado .....                     | 45 |
| Tabela 10 | Alterações de aminoácidos detectadas no sequenciamento do gene <i>ftsI</i> de 18 amostras .....            | 48 |
| Tabela 11 | Perfil clonal dos 19 novos tipos sequenciais que foram sugeridos ao banco                                  | 50 |
| Tabela 12 | MLST de cepas clínicas e de portadores agrupadas em ST e CC utilizadas nesse estudo.....                   | 51 |



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>1.1 Transmissão.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.2 Fatores de virulência.....</b>                                  | <b>20</b> |
| 1.2.1 Cápsula.....   | 20        |
| 1.2.2 Outros fatores de virulência.....                                | 21        |
| <b>1.3 Ocorrência de HI no mundo .....</b>                             | <b>23</b> |
| <b>1.4 Ocorrência de HI no Brasil.....</b>                             | <b>24</b> |
| <b>1.5 Diagnóstico.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>1.6 Tratamento e profilaxia.....</b>                                | <b>26</b> |
| <b>1.7 Mecanismos de ação e de resistência.....</b>                    | <b>27</b> |
| <b>1.8 MLST.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>1.9 Prevenção.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>2 RELEVÂNCIA.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos.....</b>                                  | <b>32</b> |
| <b>4 METODOLOGIA.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.1 Material e métodos.....</b>                                     | <b>33</b> |
| 4.1.1 Seleção de cepas utilizadas no estudo.....                       | 33        |
| 4.1.2 Armazenamento e Caracterização das cepas de origem clínica.....  | 33        |
| 4.1.3 Identificação fenotípica e sorotipagem.....                      | 34        |
| 4.1.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....                  | 35        |
| 4.1.5 Teste de detecção de $\beta$ -lactamase.....                     | 36        |
| <b>4.2 Métodos moleculares.....</b>                                    | <b>36</b> |
| 4.2.1 Extração e purificação do DNA genômico.....                      | 36        |
| 4.2.2 Tipagem molecular pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR)..... | 36        |
| 4.2.3 Multilocus Sequence Typing (MLST).....                           | 38        |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>   | <b>40</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>5.1</b> | <b>Caracterização das amostras.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Susceptibilidades aos antimicrobianos pelo Método Diluição em Agar.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Pesquisa de <math>\beta</math>-LACTAMASE.....</b>                             | <b>46</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Pesquisa dos genes <i>P6</i> e <i>bexA</i>.....</b>                           | <b>46</b> |
| <b>5.5</b> | <b>Detecções dos genes da resistência aos <math>\beta</math>-lactâmicos.....</b> | <b>47</b> |
| <b>5.6</b> | <b>Sequenciamentos dos marcadores de resistência.....</b>                        | <b>47</b> |
| <b>5.7</b> | <b>MLST.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>6</b>   | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>7.1</b> | <b>Conclusões.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>7.2</b> | <b>Perspectivas.....</b>   | <b>69</b> |
|            | <b>REFERÊNCIA.....</b>   | <b>71</b> |

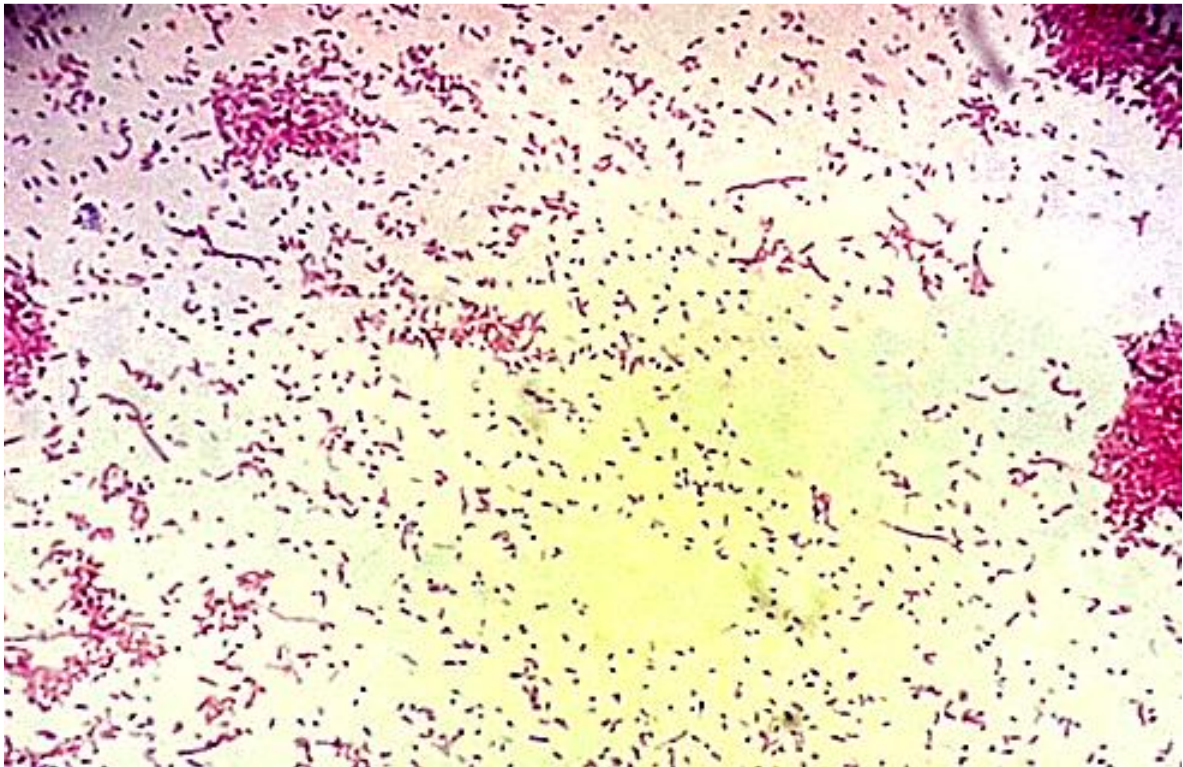
## 1 INTRODUÇÃO

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 ou de bastonete curto, sendo por isso também referidos como bacilos pleomórficos, como mostrado na figura 1. O gênero *Haemophilus* foi inicialmente descrito por Pfeiffer em 1892. A denominação de *Haemophilus* para este grupo de micro-organismo foi sugerida por apresentar crescimento, somente, quando cultivado em meio complexo contendo sangue ou hemácias lisadas (MARRS et al., 2001).

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 *H. influenzae* é dividida em dois grupos, os capsulados e os não-capsulados (NC), descritos pela primeira vez por Pittman em 1931. A presença de uma cápsula polissacarídica constitui o fator de virulência mais importante, que confere, também, resistência a fagocitose e lise mediada por complemento. Baseado nesta estrutura, existem seis sorotipos designados de a até f, que são classificados de acordo com os antígenos, encontrados nas suas cápsulas. Os sorotipos que não apresentam ou não expressam a cápsula em sua estrutura são denominados não tipificados (NT) ou não capsulados. Devido à sua impossibilidade de serem tipificados pelos métodos sorológicos tradicionais (BUTTLER; MYERS, 2018). Esta classificação ainda é utilizada nos dias atuais em laboratórios clínicos e de pesquisa que isolam e identificam estes microrganismos.

Figura 1 - Microscopia em lâmina de *H. influenzae* colorado através da técnica de coloração de Gram



Fonte: (Do autor, 2019).

Outra classificação, importante, da espécie Hi é em biótipos, podendo ser subdividida em oito, como observado na Tabela 1, de acordo com a combinação de resultados do metabolismo de determinados substratos: produção de indol, presença de urease e atividade de ornitina descarboxilase. A classificação de Hi, de acordo com o biótipo, tem sido usada como meio para avaliar a significância dos isolados clínicos, deste organismo, uma vez que essa subdivisão pode antecipar, mas não definir, a diversidade genética dessas cepas. Os biótipos fornecem informações valiosas para a epidemiologia, pois estão associados a diferentes tipos de infecção, fontes de isolamento, propriedades antigênicas e resistência a antibióticos, como a produção da enzima beta-lactamase, que fornece resistência a ação dos antimicrobianos beta-lactâmicos, cuja presença está relacionada com os biótipos I e II para o sorotipo b. A literatura também mostra que os não-tipificados são em sua maioria pertencentes aos biótipos I, II, III, IV, V e VIII (LOPES et al., 2006; MOJGANI et al., 2011; LEDEBOER; DOERN, 2011).

Tabela 1 - Classificação do *H. influenzae* em biótipos, segundo reações bioquímicas

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

Fonte: (DOERN; CHAPIN, 1987).

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, sendo predominantes em crianças e associadas principalmente ao *Haemophilus influenzae* do tipo capsular b ou Hib.

### 1.1 Transmissão

*Haemophilus sinfluenzae* (Hi) pode existir na microbiota da mucosa do trato respiratório superior humano, que é seu hospedeiro natural, o que, em geral, é considerado benéfico para o hospedeiro devido à estimulação e maturação do sistema imunológico, promoção da estrutura e função da mucosa e propiciando uma 'resistência à colonização' contra invasão de patógenos. No entanto, pode ocorrer progressão para infecções do trato respiratório superior, pneumonia, ou mesmo, sepse e meningite, dentre outras infecções (BOGAERT et al., 2011; KOSIKOWSKA et al., 2015).

A infecção por Hi é disseminada por gotículas nasofaríngeas, com as passagens nasais sendo a principal porta de entrada. O período de incubação, provável, é de dois a quatro dias. O contato direto da face ou dos olhos, das pessoas contaminadas, com toalhas, lenços ou outros objetos compartilhados, entre pessoas, também tem sido descrito como formas de transmissão. A mesma pode ser estabelecida durante todo o período em que o microrganismo está presente e pode ser persistente, mesmo sem secreções nasais (KMETZCH et al., 2003; LOPES et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2013).

Com a introdução da vacina no calendário de vacinação infantil do Brasil, em 1999, que posteriormente foi substituída pela vacina combinada DTP-Hib em 2002, contra Hib, as

doenças causadas pelo mesmo ocorrem, principalmente, em crianças não imunizadas, incluindo comunidades fechadas, em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em indivíduos expostos a tratamentos quimioterápicos (MURPHU et al., 1993; BUTTLER; MYERS, 2018).

## 1.2 Fatores de virulência

### 1.2.1 Cápsula

A espécie *Haemophilus influenzae* elabora seis tipos de polissacarídeos capsulares, assim sendo classificadas de a-f, como mostrado na Figura 2, no entanto, as cepas do tipo “a” e “b” são considerados os tipos mais virulentos (HÄUSER et al, 2018; MOXON; VAUGHN, 1981). A cápsula é um importante fator de virulência pois protege as bactérias encapsuladas contra fagocitose e opsonização, porque a cápsula impede a aderência do fagócito à célula bacteriana (MADGAM et al., 2016).

Os sorotipos “a” e “b” são ambos compostos de um açúcar neutro, um álcool (ribitol) e uma ligação fosfodiéster, mas o tipo “b” é o único dos seis tipos encapsulados que contém uma pentose, como componente da subunidade do carboidrato da cápsula, uma propriedade que pode estar relacionada à virulência.

Os tipos “c” e “f” têm menor resistência ao sistema complemento, baixa virulência e são compostos de um açúcar amino N-acetilado, outro sacarídeo e uma ligação fosfodiéster. Atualmente com a redução de Hib vem sendo relatado um aumento de doenças causadas por Hif.

Já os tipos “d” e “e” têm uma unidade de repetição de uma N-acetilglicosamina, N-acetilmanosamina e ácido urônico (ou ácido manurônico) e são rapidamente lisados pelo complemento (JIN, 2007; HÄUSER et al., 2018).

Figura 2 - Estruturas dos seis tipos de capsulas polissacarídicas de Hi

| Tipo | Estrutura  |
|------|--|
| a    | 4)-β-D-Glc-(1 → 4)-D-ribitol-5-(PO <sub>4</sub> →  |
| b    | 3)-β-D-Rib-(1 → 1)-D-ribitol-5-(PO <sub>4</sub> →  |
| c    | 4)-β-D-GlcNAc-(1 → 3)-α-D-Gal-1-(PO <sub>4</sub> →   |
|      | $\begin{array}{c} \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ R \end{array}$  |
|      | R = OAc (0.8)<br>H (0.8)   |
| d    | 4)-β-D-GlcNAc-(1 → 3)-β-D-ManANAc-(1 →   |
|      | $\begin{array}{c} \uparrow \\ 6 \\ \uparrow \\ R \end{array}$  |
|      | R = L-serine (0.41)<br>L-threonine (0.14)<br>L-alanine (0.41)  |
| e    | 3)-β-D-GlcNAc-(1 → 4)-β-D-ManANAc-(1 →   |
| e'   | 3)-β-D-GlcNAc-(1 → 4)-β-D-ManANAc-(1 →   |
|      | $\begin{array}{c} \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ \beta\text{-D-fructose} \end{array}$ |
| f    | 3)-β-D-GalNAc-(1 → 4)-α-D-GalNAc-1-(PO <sub>4</sub> →  |
|      | $\begin{array}{c} \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ \text{OAc} \end{array}$                               |

Fonte: (JIN, 2007).

### 1.2.2 Outros fatores de virulência

Fímbrias e pili, são estruturas protéicas da superfície da célula bacteriana, que atuam no processo de adesão. Linhagens fimbriadas são, com mais frequência, a causa de infecções quando comparadas as linhagens desprovidas de fímbrias. Os pili, normalmente, são mais longos do que as fímbrias, estão presentes em menor número na superfície celular. Tanto os pili, quanto as fímbrias, atuam na ligação às glicoproteínas da superfície da célula hospedeira, iniciando o processo de aderência (MADGAN et al., 2016).

O cluster Hib consiste de cinco genes, que estão envolvidos na biogênese da fimbria. *hifA* é a principal subunidade fimbrial, os genes *hifB* e *hifC* funcionam codificando proteínas envolvidas na produção das fímbrias e na proteção dessas proteínas, contra possível degradação, durante a exportação para o exterior da célula. Essas proteínas são necessárias na montagem e ancoragem do filamento na parede celular. As subunidades menores de *hifA*, *hifD* e *hifE* codificam subunidades fimbriais menores (VIRKOLA et al., 2000).

As adesinas são encontradas nas cepas encapsuladas tipo b e em 30-40% das cepas não-tipáveis. A Oap (proteína A associada a opacidade), e as proteínas de alto peso molecular HMW1 e HMW2 (encontradas em 70-80% das cepas de HiNT), são responsáveis pela aderência do micro-organismo às células epiteliais respiratórias. As adesinas, também

apresentam mecanismos que evitam a eliminação imunológica, ajustam o tamanho dos poros para evitar a destruição antimicrobiana. Algumas cepas não tipificadas, que carecem das adesinas HMW1/HMW2, possuem outra proteína não fimbrial, denominada Hia, que é sintetizada e secretada na sua forma intacta e permanece associada com a membrana externa da bactéria. A Hia é estruturalmente semelhante à proteína Hsf, uma adesina secundária encontrada em cepas tipo b. Além destas, a Hap (proteína de *Haemophilus* de aderência e penetração) possui atividade adesiva e de protease, está relacionada à IgA protease do Hi (KONEMAN, 2010; ATACK et al., 2018).

Dímeros de IgA estão presentes em fluidos corpóreos como saliva, lágrima, colostro do leite materno e secreções mucosas dos tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário. A espécie Hi tem como um dos seus fatores de virulência a produção de IgA proteases que clivam a região charneira da IgA humana, região localizada entre as cadeias leves e pesadas que confere flexibilidade para a imunoglobulina se adaptar durante a ligação ao antígeno, facilitando a infecção bacteriana (MADGAN et al., 2016; GALLO et al., 2018).

Aproximadamente 75% a 80% das cepas HiNT expressam proteínas homólogas, de alto peso molecular, chamadas HMW1 e HMW2, que medeiam a aderência de alto nível às células epiteliais respiratórias. Presumivelmente, essas proteínas facilitam o processo de colonização e têm sido o principal foco de investigação, destinada a identificar componentes para inclusão em vacinas contra HiNT (GRASS et al., 2015).

O lipopolissacarídeo (LPS) do Hi apresenta uma estrutura lipídica complexa, encontrado na maioria das bactérias Gram-negativas, do Hi, difere dos outros LPS dos microorganismos entéricos e de outros microorganismos, pela ausência das cadeias laterais terminais repetitivas, por conseguinte, é denominado lipo-oligossacarídeo (LOS). Além disso, o LOS de muitas cepas de Hi assemelha-se em nível estrutural e antigênico aos oligossacarídeos humanos. Essa modificação do LOS ajuda o micro-organismo a escapar da opsonização e da fagocitose, ao imitar estruturas moleculares, normalmente, presentes no hospedeiro. O LOS do Hi também está sendo investigado como antígeno potencial para o desenvolvimento de vacinas contra HiNT (KONEMAN, 2010; MADGAN et al., 2016, CDC, 2018).

As cepas Hib também produzem bacteriocinas chamadas hemocina, que inibem ou inativam espécies estreitamente relacionadas. A produção de hemocina pode contribuir para a habilidade do Hib em competir efetivamente com cepas HiNb (*Haemophilus influenzae* não b) e HiNT na colonização da nasofaringe (KONEMAN, 2010; MADGAN et al., 2016).



### 1.3 Ocorrência de HI no mundo

Mesmo após o emprego da vacina (1985 nos EUA e 1999 no Brasil), Hib ainda são responsáveis por uma variedade de doenças invasivas graves como meningite, pericardite, septicemia, artrite séptica e outras como conjuntivite e otite média (MURPHU et al., 1993; DE ALMEIDA et al., 2005). A meningite é uma inflamação das meninges, membranas que revestem o sistema nervoso central, especialmente a medula espinhal e o cérebro. A Septicemia é infecção sistêmica causada pela presença de bactérias na corrente sanguínea (MADGAN et al., 2016).

Apesar do tipo b ser o principal causador de doenças na era pré-vacinal e, ainda, ser um importante agente infeccioso, Hib continua a ser uma das principais causas de ambos meningite e pneumonia em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde a vacinação está indisponível (BUTTLER; MYERS, 2018). O programa de imunização infantil na Inglaterra e no País de Gales aplica no procedimento de rotina três doses da vacina conjugada contra Hib, aos 2, 3 e 4 meses mas, após um aumento de casos infecciosos, causados pelo sorotipo b, em crianças, que logo se expandiu para adultos, foi implementado em 2006 um reforço de 12 meses, diminuindo o número de casos. Contudo, um estudo de 2018, mostrou que, mesmo após o reforço de 12 meses, o número de anticorpos diminui rapidamente, embora a maioria das crianças permaneça protegida contra Hib, a quantidade de anticorpos pode não ser suficiente para impedir a transmissão entre crianças e conseqüentemente para adultos, sendo o monitoramento contínuo essencial (COLLINS et al., 2018).

Países, subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, possuem em seu programa de vacinação uma série de três doses administradas em 6, 10 e 14 semanas de idade, mas não há uma dose de reforço da vacina contra Hib. Esse reforço é muito eficaz para reduzir a incidência de doenças causadas por Hib. Uma dose de reforço para atingir o controle substancial da doença, ainda é discutido por alguns países (HAMMITT et al., 2016). Um estudo recente, realizado no Quênia, mostrou que a imunidade persiste até a idade de maior risco da doença, para a maioria das crianças e as concentrações de anticorpos em crianças, mais velhas, são semelhantes às concentrações relatadas na era pré-vacina. Assim, de acordo com estudos realizados naquele país, não foram encontradas evidências que indiquem a necessidade de se introduzir uma dose de reforço da vacina, contra Hib, no Programa Expandido de Imunização do Quênia (HAMMITT et al., 2016).

Durante o período de vigilância de cinco anos, houve 3.523 casos de Hi confirmados na Inglaterra e no País de Gales, sendo que 2.883 (81,8%) foram sorotipados. Do total, apenas 67 (2,3%) foram identificados como Hib, 363 (12,7%) foram outros sorotipos (4 Hia, 2 Hid, 85 Hie e 272 Hif) e 2.451 (85,0%) foram caracterizados como HiNT (COLLINS et al., 2018).

Um estudo acompanhou crianças do Reino Unido, com falha na vacina contra Hib, que é caracterizada como a ocorrência de doenças invasivas causadas pelo sorotipo b, em qualquer momento, após a aplicação, das três doses, da vacina no primeiro ano de vida. Apesar de Payne e colaboradores apontarem que a maioria das crianças permaneceu protegida contra Hi produzindo altas concentrações de anti-PRP, em longo prazo. Os mesmos autores descobriram que crianças com falhas na vacina, que apresentam baixas concentrações de anti-PRP são mais suscetíveis, do que crianças não vacinadas, a serem infectadas por linhagens mais virulentas de Hib, que possuem múltiplas cópias *capb*. Essa observação, destaca a importância do monitoramento após a vacinação a fim de manter as altas concentrações de anticorpos e conseqüentemente a proteção individual em longo prazo (PAYNE et al., 2016).

Nos dias atuais os HiNT se destacam em casos de infecções. Podem ser isolados do trato respiratório superior de crianças saudáveis, afetando cerca de 80% a 100% destas e são frequentes causadores de infecções localizadas, tais como: conjuntivite, otite média e sinusites em crianças (FOXWEL, 1998; SILVA; MARIN, 2001; CRIPPS et al., 2002). Atualmente, os HiNT são os mais frequentes, dentre os isolados da espécie, sendo a principal causa de doenças invasivas, em todas as faixas etárias, responsáveis por 62,5% dos casos de doenças por Hi em crianças menores que 5 anos (incidência anual de 1,73 por 100.000), após a introdução de vacina contra Hib. Também são causadores de bacteremia em até 75% das infecções invasivas (BUTTLER; MYERS, 2018; LANGEREIS; JONGE, 2015).

#### **1.4 Ocorrência de hi no Brasil**

Segundo relatos de casos na secretaria estadual de saúde, infecções invasivas representavam 98% dos casos identificados no hospital de vigilância da região metropolitana de Salvador entre 1996 e 2004. Estima-se, que o uso da vacina conjugada contra Hib, tenha evitado 360 casos de meningite e 58 mortes em Salvador. Além disso, as vacinas conjugadas impediram as sequelas neurológicas graves, encontradas em mais de 25% dos sobreviventes da meningite por Hib, durante o período pré-vacinal. Estima-se que o número de casos de

meningite por Hib tenha diminuído 82% nos primeiros 2 anos de campanha (RIBEIRO et al, 2007).

No entanto, há necessidade de se conhecer melhor o cenário atual das infecções por Hi, no Brasil e seu perfil de susceptibilidade, para o combate da doença. Em 2012, foi realizado um estudo que descreveu um caso raro de septicemia e meningite pelo sorotipo b (Hib) e um mutante do tipo de cápsula (b<sup>-</sup>) isolado, simultaneamente, do sangue e do líquido cefalorraquidiano (LCR) em uma criança parcialmente vacinada. Não é possível garantir que a cepa Hib mudou para Hib<sup>-</sup> no sangue ou após ter ultrapassado a barreira hematoencefálica, mas é provável que o sistema imunológico tenha desempenhado um papel importante nesse evento enquanto a cepa circulava na corrente sanguínea (CALDEIRA et al., 2013). Esta hipótese seria de grande preocupação, uma vez que poderia acontecer novamente com qualquer criança vacinada reforçando a necessidade de se realizar um monitoramento constante do perfil das cepas circulantes de Hi.

Um estudo realizado no Reino Unido, em 2016 descreveu a ocorrência de doença invasiva por *Haemophilus influenzae*, sorotipo b (Hib), após imunização com a vacina conjugada altamente eficaz contra Hib, semelhante ao que foi descrito no Brasil em 2012.

Um estudo de 2015 avaliou a prevalência de *Haemophilus influenzae* na colonização da nasofaringe de 2.558 crianças saudáveis, observando que a taxa de portadores de HiNT foi de 43% (n = 1.099), sendo significativamente mais frequente na idade de 48 <60 m (51,6%, n = 608) em comparação com a idade de 12 <24 m (35,6%, n = 491) (ZANELLA et al., 2015).

## 1.5 Diagnóstico

É essencial uma suspeita clínica etiológica para o tratamento precoce, o que provavelmente pode levar a evolução favorável do quadro clínico. Desta maneira, é necessário utilizar-se de exames clínicos minuciosos, incluindo a busca de infecções de porta de entrada, como otite, sinusite e pneumonia.

Entre os exames clínicos inespecíficos estão a punção do líquido cefalorraquidiano, no caso de meningite, bem como, sua análise citológica e bioquímica, como por exemplo, proteína C-reativa e dosagem de procalcitonina para contribuir na diferenciação da meningite bacteriana para a viral. Nas meningites bacterianas, o líquido apresenta aspecto purulento, com celularidade acima de 500, predomínio acentuado de neutrófilos, aumento de proteínas e

redução de glicorraquia. Também é realizado uma bacterioscopia onde é possível observar formas de cocobacilos Gram-negativos.

Entre os testes laboratoriais específicos, estão a confirmação da produção de oxidase e crescimento em meio de cultura, enriquecido com nicotinamina adenina dinucleotídeo (NAD) e/ou a hematina chamados de fator V e fator X, uma vez que bactérias do gênero *Haemophilus* apresentam um sistema enzimático, inadequado para crescimento em meio não enriquecido.

A sorotipagem também é um importante exame de identificação, através deste, é possível determinar se o isolado é do sorotipo b, uma vez que, este é o único sorotipo imunoprevenível. Os métodos utilizados para a sorotipagem são: Aglutinação em látex, um método rápido, sensível e específico; contra-imunoeletroforese, sendo semelhante ao método anterior, mas menos sensível e mais demorado; e Identificação molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR), método molecular rápido e sensível, capaz de detectar o DNA da bactéria (LOPES et al., 2006).

## **1.6 Tratamento e profilaxia**

Tratamento e profilaxia são realizados por antibióticoterapia, considerando a sensibilidade do microorganismo. Os antimicrobianos beta-lactâmicos e as fluoroquinolonas são, frequentemente, utilizados como terapia antimicrobiana de infecções do trato respiratório e apresentam boa atividade antibacteriana contra os agentes patogênicos, como o *Haemophilus influenzae*. A resistência à ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico e cefalosporinas de segunda geração, foi relatada em *Haemophilus influenzae* e é, agora, globalmente difundida. Assim, hoje, o uso destas drogas como, linha de frente, para tratamento de infecções por esse patógeno pode se tornar problemática. Sulfametoxazol + trimetopim (TMP-SMX) é uma alternativa para o tratamento de crianças, com otite média aguda, em diferentes partes do mundo, inclusive na América Latina, e é também usado para tratar infecções respiratórias, gastrointestinais e do trato urinário. Para a profilaxia dos contatos o antimicrobiano de escolha é rifampicina. O cloranfenicol é um agente que era utilizado corriqueiramente, devido ao seu amplo espectro de atividade contra muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no entanto, é raramente administrado hoje em dia, devido aos seus efeitos colaterais e ao aumento da incidência de cepas resistentes (CHERKAOUI et al., 2018; ELIAKIM-RAZ et al., 2015; LOPES et al., 2006; SOLEY et al., 2007).

## 1.7 Mecanismos de ação e de resistência

Os  $\beta$ -lactâmicos inibem a síntese do peptídeoglicano, responsável pela integridade da parede celular bacteriana. A resistência à agentes antimicrobianos, produtos elaborados durante o metabolismo microbiano capazes de inibir, parcial ou totalmente, a multiplicação e crescimento de microrganismos, não é um fenômeno recente. A produção das enzimas  $\beta$ -lactamases, sendo os genes responsáveis pela sua produção *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>ROB-1</sub>*, tem sido relatada como um importante mecanismo de resistência aos antibióticos dessa classe, hidrolisando o anel  $\beta$ -lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim, a capacidade de atuação sobre o microrganismo (DU PLESSIS et al., 2008).

Um outro mecanismo de resistência contra  $\beta$ -lactâmicos é a modificação estrutural das Proteínas Ligadoras de Penicilina, as chamadas PBP (“Penicillin Binding Proteins”), que impede a ligação do antibiótico à parede da célula bacteriana, mediada pela PBP III codificada pelo gene *ftsI* (SANBONGI et al., 2006; BERTRAND et al., 2012;).

Os antibióticos da classe das fluoroquinolonas se ligam às enzimas bacterianas DNA topoisomerase II (ou DNA girase) e topoisomerase IV, interferindo na replicação celular. A resistência ocorre quando há alteração estrutural das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, que passa a não sofrer ação do antimicrobiano, podendo ocorrer por mutação cromossômica nos genes *gyrA* e *ParC*, respectivamente, responsáveis pela codificação da síntese das enzimas alvo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018; KONDO et al., 2018).

A rifampicina atua bloqueando a síntese de DNA-RNA dependente, atuando sobre a enzima bacteriana RNA polimerase. A resistência à rifampicina ocorre através de mutações na parte central do gene *rpoB*, que codifica a subunidade  $\beta$  da polimerase de RNA (TAHA et al., 2010), alterando os resíduos de ligação do antibiótico à RNA polimerase, resultando na diminuição da afinidade da rifampicina com seu alvo (NOLTE et al., 1997).

O cloranfenicol se liga à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese proteica da bactéria, tendo, assim, ação bacteriostática. Porém, pode ser bactericida contra algumas espécies como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis*, através de mecanismo não bem elucidado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018).

O trimetoprim e o sulfametoxazol, associação mais conhecida como cotrimoxazol (usados isoladamente ou em combinação), fornecem um efeito antimicrobiano ao interferir no

metabolismo e na replicação de bactérias através de um bloqueio sequencial da produção do ácido fólico. O sulfametoxazol inibe um passo intermediário da reação e o trimetoprim inibe a formação do metabólito ativo do ácido tetra-hidrofólico no final do processo. A resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol entre as cepas de *H. influenzae* é comum e é causada por um aumento na produção de di-hidrofolato-reductase (DHFR) com afinidade alterada pelo trimetoprim (ZHU et al., 2015; ANVISA, 2018).

## 1.8 MLST

A grande maioria das doenças invasivas provocadas por Hi é causada por isolados encapsulados do sorotipo b e nos países onde foram introduzidas vacinas conjugadas contra este grupo, como o caso do Brasil, houve reduções drásticas nos casos causados por esse sorotipo e redução do número de portadores entre crianças vacinadas e não vacinadas. Paralelamente, houve um aumento de casos de doença invasiva em adultos, devido a isolados encapsulados não b e não capsulados, em alguns países onde a vacina conjugada contra o Hib foi introduzida (MEATS et al., 2003; RIBEIRO et al., 2007).

Vários métodos têm sido utilizados para caracterizar cepas de *H. influenzae*, como a eletroforese de enzimas multilocus (MLEE), no entanto, mais recentemente, a tipagem por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) tem fornecido dados importantes para caracterizar isolados de patógenos bacterianos, como *H. influenzae*, sequenciando fragmentos internos de 345-489 pares de base de sete genes constitucionais: *adh* (Adenilato-quinase), *atpG* (Subunidade gama F1 ATP sintase), *frdB* (Subunidade ferro-enzima fumato-reductase), *fucK* (Fuculo-kinase), *mdh* (malato-desidrogenase), *pgi* (glicose-6-fosfato Isomerase), *recA* (Proteína RecA) (MEATS et al., 2003).

A precisão do MLST de identificar grupos clonais de agentes infecciosos, envolvidos em surtos e a facilidade com que as sequências obtidas, em diferentes laboratórios podem ser comparadas com as depositadas em bancos de dados curados, específicos para cada espécie, torna o MLST o método ideal para programas de vigilância nacionais ou internacionais que envolvem vários laboratórios, como o monitoramento da disseminação de clones virulentos e hiper epidêmicos ou o monitoramento de alterações em uma população bacteriana, após a implantação de uma vacina. O MLST também pode ser usado para avaliar a diversidade de *H. influenzae* que qualquer vacina, bem-sucedida, teria que abranger (MAIDEN et al., 1998; MEATS et al., 2003).

MLST utiliza a variação na sequência dos genes para definir um tipo sequencial (ST). Para cada alelo é atribuído um número, de acordo com sua sequência e o conjunto de sete alelos forma o complexo clonal (CC). Com a designação de ST e CC, é possível estabelecer a relação epidemiológica dos micro-organismos em questão. Um grupo de STs que tenha, no mínimo, quatro alelos em comum é definido como um complexo clonal, ou seja, tem um genótipo ancestral comum definido como ST central (MAIDEN et al., 1998).

Este método de genotipagem foi desenvolvido como um método portátil, universal e definitivo para a caracterização de bactérias e mais recentemente protozoários e fungos. Genes constitutivos são utilizados por não sofrerem pressão seletiva e, portanto, apresentam evolução lenta, tornando-se bons marcadores de evolução e relações genéticas entre cepas da mesma espécie (MAIDEN et al., 1998).

Apesar disso, após vinte anos da implementação da vacina conjugada Hib (PRP-T) para uso rotineiro, em bebês, como parte do programa nacional de imunização, em 1999, no Brasil, mais tarde substituída pela vacina combinada DTP-Hib, em 2002, há apenas um estudo que utilizou a tipagem de sequência por MLST, para estudar o impacto da vacina sobre as populações de Hi no país. O estudo demonstrou que apesar de Hi ter se tornado uma causa relativamente rara, de infecções bacterianas invasivas, na comunidade no Rio de Janeiro após a introdução da vacina conjugada Hib, os isolados de casos infecciosos se tornaram mais diversos, com o surgimento dos HiNT e o aumento do sorotipo *a* (TUYAMA et al., 2017).

## 1.9 Prevenção

Atualmente, a prevenção dos quadros infecciosos, causados por *Haemophilus influenzae*, é realizada através da administração de vacina sorotipo específica para o tipo capsular b. No Brasil, a vacinação só teve início em 1999 e seus impactos, sobretudo, na diminuição dos casos de meningite, causada por Hib, são parcialmente conhecidos devido a carência de publicações. O polirribossil-ribitol-fosfato que faz parte da composição capsular do tipo b, serviu de base para a vacina hoje existente, onde o mesmo foi conjugado com uma proteína carreadora.

A primeira vacina de Hib era composta basicamente da cápsula polissacarídica purificada do tipo b, uma vez que o polirribosil-ribitol-fosfato era capaz de conferir proteção a 90% das crianças, entre 18 e 71 meses de idade, contra todas as formas de doença causadas por Hib. No entanto, o mecanismo de resposta imunitária ao polissacarídeo desenvolve-se

pela presença do antígeno e ativação do linfócito B, sem intervenção dos linfócitos T. Isso provoca uma resposta primária, do tipo de imunoglobulina M (IgM), não permitindo estimular a memória imunitária.

Todo polissacarídeo é antígeno timo-independente, o mesmo vale para o polirribosil-ribitol-fosfato de Hib. Dessa forma, para se obter resposta timo-dependente, em crianças abaixo de 18 meses, tornou-se necessário acoplar o polissacarídeo a uma proteína carreadora. Assim, a resposta imunitária passa então pela estimulação dos linfócitos T que ativam os linfócitos B, isso permite a produção precoce de anticorpos nos quais a imunoglobulina G (IgG) predomina e doses subsequentes estimulam a memória imunitária (LOPES et al., 2006).



## 2 RELEVÂNCIA

O objetivo principal deste projeto continua sendo o desafio, após quase duas décadas, do uso da vacina conjugada contra o Hib, no Brasil, de se acompanhar a situação das cepas circulantes. O monitoramento dos processos infecciosos pelo Hi, em todo país, é necessário, bem como, o rastreamento de cepas mais virulentas ou multi-resistentes, pois o impacto das novas vacinas requer diferentes métodos, para o devido entendimento da evolução biológica e adaptação da espécie.

O desenvolvimento deste estudo nos permitiu acompanhar as alterações do perfil epidemiológico das cepas circulantes de Hi, para determinação de suas relações genotípicas e averiguação de possíveis clones. Adicionalmente, avaliamos a resistência aos antimicrobianos, inclusive nas infecções respiratórias, que estão assumindo papel de destaque - entre adultos, principalmente idosos - como já descrito em alguns países do mundo, mas infelizmente com poucas informações no Brasil.

A análise preliminar de cepas isoladas nos cinco últimos anos, indica que, embora o sorotipo b continue sendo responsável por uma parcela de infecções por Hi, outros sorotipos previamente considerados como não frequentes (não b) têm se destacado. A caracterização sorológica tradicional, isoladamente, não apresenta sensibilidade suficiente, por exemplo, para analisar a incidência e persistência de clones epidêmicos. Desta maneira, por meio de métodos moleculares e o uso de ferramentas como o MLST, os resultados obtidos poderão revelar dados inéditos no Brasil, importantes para uma análise mais precisa dos possíveis efeitos da vacina, sobre o perfil das populações de Hi circulantes no país, além de fornecerem informações sobre o panorama nacional da resistência entre esses microrganismos.

A relevância deste estudo para a Vigilância Epidemiológica do país e conseqüentemente para a área da Vigilância Sanitária, liga-se não só ao monitoramento dos antimicrobianos utilizados no país, onde é frequente a automedicação e a medicação empírica, mas, também, a faixa de não vacinados, mostrando o impacto (efeito de rebanho) e as conseqüências da vacinação hoje empregada contra o Hib, nas faixas etárias mais altas, bem como a dinâmica atual das cepas não b, incluindo os não tipificados (NT) em infecções nas populações de risco, principalmente em não vacinados ou com vacinação incompleta, visando colaborar na geração de informações que auxiliem na elaboração de uma possível nova vacina.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Acompanhar a situação das cepas circulantes de Hi nos últimos dez anos, dando continuidade a uma linha de investigação do INCQS, no âmbito da FIOCRUZ, associada à necessidade de, sob diferentes aspectos, monitorar o perfil epidemiológico de cepas Hi com susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos, em algumas regiões do país, posteriormente a inclusão da vacina contra o *Haemophilus influenzae b*, a partir de agosto de 1999.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar identificação fenotípica incluindo a tipificação (sorotipos) molecular dos Hi isolados.
- Determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos mais utilizados contra o Hi, pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).
- Detectar as cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase (BLP) e caracterizar os tipos de genes *blaTEM* ou *blaROB-1* que estão mediando a resistência.
- Avaliar possíveis modificações do gene *ftsI* (gene da proteína PBP-3) em cepas  $\beta$ -lactamase negativas, ampicilina resistente BLNAR, juntamente, com cepas BLP, afim de determinar a possível presença dos dois mecanismos de resistência.
- Caracterizar os genes *rpoB*, *gyrA* e *parC* em cepas com susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos rifampicina e aos da classe das fluoroquinolonas para confirmar possíveis mecanismos de resistência por modificação do alvo.
- Classificar os isolados resistentes em perfis clonais por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) para avaliação epidemiológica das cepas circulantes.

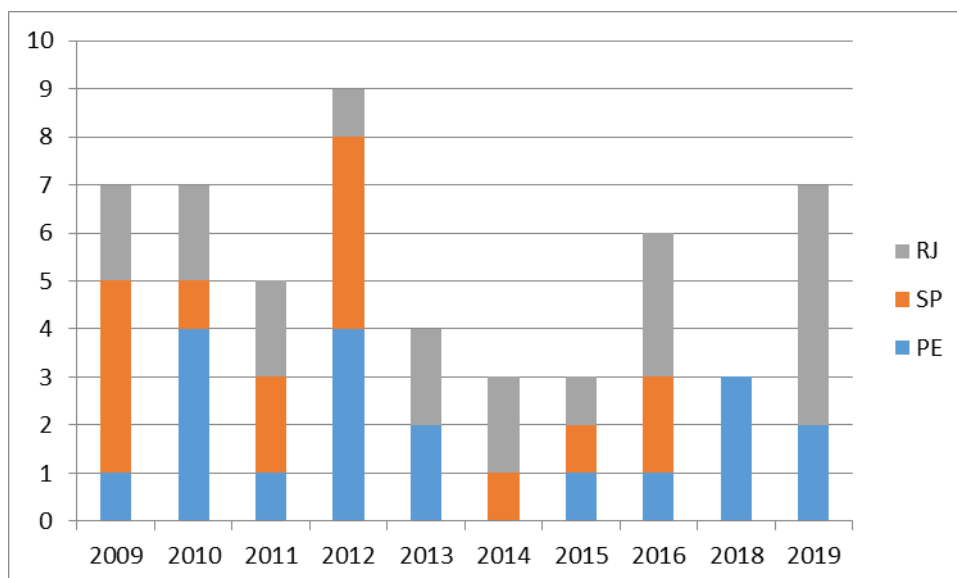
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Material e métodos

#### 4.1.1 Seleção das cepas utilizadas no estudo

As cepas utilizadas neste estudo fazem parte da Coleção de pesquisa do INCQS/setor de vacina contra Hib. Foram selecionadas 69 cepas agrupadas da seguinte forma: 15 oriundas de crianças vacinadas (portadores sadios), coletadas da população de uma creche em Jacobina, Bahia, em 2011; 15 amostras clínicas de casos infecciosos, originárias de São Paulo (2009 a 2016), 19 amostras clínicas de Pernambuco (período de 2009 a 2019) e 20 de casos infecciosos do Rio de Janeiro (período de 2009 a 2019) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição quantitativa de cepas oriundas de casos clínicos estudadas por ano e estado



Fonte: (Do autor, 2019).

#### 4.1.2 Armazenamento e Caracterização das cepas de origem clínica

Quanto aos casos clínicos, as cinquenta e quatro cepas clínicas analisadas neste estudo, são oriundas de hospitais ou centros de referências públicos: Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de Pernambuco e Bahia; LACEN, Instituto Estadual de Infectologia São

Sebastião e Hospital Municipal Lourenço Jorge do Rio de Janeiro e Hospital de Botucatu de São Paulo. Todas as cepas, foram, após confirmação da identificação, preservadas em criotubo, contendo 0,5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerol, para a suspensão do inóculo e preservação à -70°C ou por liofilização em ampolas à -20°C.

As cepas armazenadas em ampolas foram submetidas à hidratação do líofilo utilizando o caldo BHI, enriquecido com 1% de VX, para a realização de testes bioquímicos, moleculares e a análise microscópica pela coloração de Gram. Desta forma, foram selecionadas cepas provenientes das regiões anteriormente citadas e após a hidratação, as cepas foram semeadas em placa de ágar chocolate (base de ágar Mueller-Hinton / Difco) enriquecido com 10% de sangue aquecido, estéril desfibrinado de cavalo, sendo adicionado ao meio, antes do envase, e o mesmo, estando em uma temperatura de aproximadamente 56°C, 1% de IsoVitaleX (BBL), e incubação das placas a 37°C em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, de 18 a 24 horas, com estocagem posterior de -20°C ou -70°C em caldo BHI com glicerol a 20%.

As amostras isoladas durante o presente estudo, que apresentaram colônias sugestivas de Hi na análise microscópica, como bastonetes pleomórficos ou cocobacilos e Gram-negativos foram testadas quanto às exigências nutricionais para os fatores X, V e VX em meios de cultura (CAMPOS, 1999; LEDEBOER; DOERN, 2011).

#### 4.1.3 Identificação fenotípica e sorotipificação

A identificação bioquímica dos Hi, foi realizada através dos testes de fermentação em caldo, contendo 2mL dos carboidratos - glicose, sacarose, lactose e manose, fornecidos comercialmente para preparo, pela Isofar, Merck, JT Baker e Merck, respectivamente e suplementados com hemina (fator X) e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - NAD (fator V), ambos da Sigma, tendo os inóculos incubados a 35-37°C em uma estufa de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas (LEDEBOER; DOERN, 2011).

As amostras que apresentaram fermentação apenas para glicose foram, inicialmente, consideradas Hi, sendo a confirmação da espécie realizada posteriormente por PCR, com a amplificação do gene *P6* e confirmação por sequenciamento. O gene *P6* é encontrado apenas na espécie *Haemophilus influenzae*.

A sorotipagem das cepas de Hi foi realizada através do teste de soro aglutinação em lâmina (SAL), adquirido comercialmente (Difco *Haemophilus influenzae* Antisera) sendo posteriormente confirmados por PCR, usando primers específicos para cada tipo capsular,

listados na tabela 2. Este teste nos permitiu determinar qual o antígeno capsular (a–f) presente no isolado. As cepas que não aglutinaram para nenhum dos seis sorotipos foram identificadas, inicialmente, como HiNT (KONEMAN et al., 2001).

A biotipagem foi feita através de três testes bioquímicos: a produção de Indol, Urease e Ornitina descarboxilase, suplementados com os fatores V e X já citados, incubados a 35-37°C em uma estufa de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, desta forma, a combinação de resultados indicou qual o biotipo da amostra (KONEMAN et al., 2001; LEDEBOER; DOERN, 2011).

#### 4.1.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A determinação da sensibilidade aos antimicrobianos, foi feita através de uma triagem inicial, pelo método de disco difusão para identificar cepas resistentes, sendo a confirmação e quantificação da resistência tendo sido realizada pelo método CIM – Concentração Inibitória Mínima, utilizando a técnica Etest<sup>®</sup>, de acordo com o EUCAST (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2019), por método de diluição em Agar, utilizando-se o meio de cultura ágar HTM (*Haemophilus Test Medium*), que consiste de base de Mueller Hinton suplementado com 15µg/mL de hemina, 15µg/mL de NAD e 5mg/mL de extrato de leveduras. Foram utilizadas as seguintes cepas-controle: ATCC 49247, para o controle de qualidade do ensaio de sensibilidade aos antibióticos e ATCC 49766, para controle de qualidade da pesquisa da produção de β-lactamase nas cepas estudadas. O inóculo foi preparado através da suspensão das colônias, em caldo BHI, ajustada à escala de 0,5 Mc Farland. Com o auxílio de um “swab” estéril, com haste de plástico, o inóculo foi semeado em uma placa de Petri, de 90 mm. Em seguida, utilizando-se de uma pinça estéril, aplicou-se os discos correspondentes aos antimicrobianos adotados, frequentemente, nas terapias das infecções por *H.influenzae*: ampicilina (10µg), ceftriaxona (30µg), cloranfenicol (30µg), rifampicina (30µg), sulfametoxazol-trimetropim (1,25/23,75 µg), clavulanato-amoxicilina (10/20µg) e as fluoroquinolonas: levofloxacina (5µg), ciprofloxacina (05µg) com a resistência posteriormente confirmada pelo CIM, fornecido pela empresa Oxoid. Desta forma, as amostras consideradas resistentes foram submetidas a testes moleculares.

Para a realização do ensaio utilizou-se o meio de cultura contendo HTM. O inóculo foi preparado através da suspensão das colônias, no caldo de BHI, ajustada à escala de 0,5 Mc Farland. Com o auxílio de um “swab” estéril, com haste de plástico, sendo semeado em uma placa de Petri, de 90 mm. Em seguida, com auxílio de uma pinça estéril, aplicou-se as fitas do

E-test<sup>®</sup>, na superfície do meio. A incubação foi realizada em câmara úmida, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, por 18 a 24 horas.

#### 4.1.5 Teste de detecção de β-lactamase

As amostras que apresentaram resistência à ampicilina foram testadas, para a produção de β-lactamase, pelo método da cefalosporina cromogênica, usando nitrocefina (Oxoid). Para o controle de qualidade foram usadas as cepas ATCC 49766 para controle positivo e ATCC ATCC 49247 para controle negativo (O'CALLAGHAN; COLS, 1972).

## 4.2 Métodos moleculares

### 4.2.1 Extração e purificação do DNA genômico.

Após o cultivo da cepa de Hi, em meio de ágar chocolate, com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi transferido o volume equivalente a 10µL do crescimento microbiano, para um microtubo de 1,5 mL, contendo tampão específico da Qiagen, sendo o mesmo incubado em banho-maria a 56°C de 2 a 3 horas, após isso, a extração e purificação do DNA, com o kit DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen<sup>®</sup>), foi feita de acordo com o protocolo para Gram-negativos, seguindo as instruções do fabricante. O DNA, extraído e purificado, foi armazenado a -20°C.

### 4.2.2 Tipagem molecular pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

Os tipos capsulares foram confirmados pela PCR, de acordo com Van Ketel et al (1990) e Falla et al (1994), que descreveram iniciadores específicos para detectar a presença de cápsula, através do seqüenciamento do gene *bexA* e distinguir cada um dos seis tipos capsulares do Hi, desta forma, as cepas que não aglutinaram, para nenhum dos seis sorotipos na aglutinação em lâmina, foram submetidas à amplificação do gene. A não amplificação do *bexA* confirma as amostras como HiNT. Este método, é considerado referência para a determinação dos tipos capsulares como confirmação do método sorológico. A utilização desta técnica permitiu, também, diferenciar amostras HiNT, de cepas com deficiência capsular (b<sup>-</sup>). Os iniciadores foram desenhados para as três regiões do genoma (I,II e III),

comum a todas as cepas de Hi, onde estão os genes específicos para a síntese das proteínas, envolvidas na produção dos polissacarídeos específicos dos tipos a–f (Tabela 2).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a genotipagem *Haemophilus influenzae*

| Nome | Sequência 5' – 3'                                 | Gene Alvo    | Produto (bp) |
|------|---|--------------|--------------|
| HiP6 | ACTTTTGGCGGTACTCTGT<br>TGTGCCTAATTIACCAGCAT       | <i>P6</i>    | 273          |
| Hi   | CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC<br>TGATGAGGTGATTGCAGTAGG | <i>bex A</i> | 343          |
| Hia  | CTACTCATTGCAGCATTTCG<br>GAATATGACCTGATCTTCTG      | <i>acs</i>   | 250          |
| Hib  | GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC<br>GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA | <i>bcs</i>   | 480          |
| Hic  | TCTGTGTAGATGATGGTTCA<br>CAGAGGCAAGCTATTAGTGA      | <i>ccs</i>   | 250          |
| Hid  | TGATGACCGATACAACCTGT<br>TCCACTCTTCAAACCATTCT      | <i>dcs</i>   | 150          |
| Hie  | GGTAACGAATGTAGTGGTAG<br>GCTTACTGTATAAGTCTAG       | <i>ecs</i>   | 1350         |
| Hif  | GCTACTATCAAGTCCAAATC<br>CGCAATTATGGAAGAAAGCT      | <i>fts</i>   | 450          |

Fonte: (VAN KETEL et al., 1990).

Para caracterizar os marcadores de resistência dos  $\beta$ -lactâmicos em cepas BLP (gene *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>ROB-1</sub>), foi utilizada a técnica da PCR, realizada com volume total de 25  $\mu$ L, contendo 5  $\mu$ L de DNA (40-50ng/ $\mu$ L), 12,5  $\mu$ L de mastermix universal GoTaq® (Promega) e 1  $\mu$ L (50pmol/ $\mu$ L) de cada iniciador (GARCIA-COBOS et al., 2008). O mesmo se aplica a cepas de Hi que apresentaram resistência a ampicilina, pelo mecanismo não enzimático, ou seja, por alterações da proteína ligante de penicilina III (PBPs), devido a mutações no gene *ftsI* (SANBONGI et al., 2006; UBUKATA et al., 2001) (Tabela 3).

A purificação dos produtos da PCR, foi realizada com kit FastAP Thermo Sensitive Alkaline, fornecido pela Thermo Fisher Scientific (QIAGEN). As reações de seqüenciamento, foram realizadas utilizando Big Dye® Terminator (Applied Biosystems), para marcação dos nucleotídeos e as etapas de precipitação, foram realizadas com EDTA/etanol. O sequenciamento dos genes, foi realizado em colaboração com a Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ, no sequenciador automático ABI PRISM 3730.

As sequências obtidas, foram submetidas no banco de dados, disponível em <http://pubmlst.org/hinfluenzae>, para determinação de alelos dos genes mencionados. As

sequências foram alinhadas com o software Bioedit (ClustalW) e a tradução das sequências de nucleotídeos para proteínas, foi realizada pelo software *Transeq* da plataforma Emboss, para a determinação de mutações nos marcadores de resistência.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *ftsI*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>ROB-1</sub>*.

| Gene                       | Nome do iniciador | Sequência (5'-3')                                  | Tamanho do amplicon |
|----------------------------|-------------------|--|---------------------|
| <i>ftsI</i>                | ftsI1F            | GTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGTTAATGCGTAACCGTGCAATT<br>AC | 705pb               |
|                            | ftsI1R            | TTGTGAGCGGATAACAATTTCACTACTAATGCATAACGAGGATC       |                     |
| <i>bla<sub>TEM</sub></i>   | TEM-TenF          | TGGGTGCACGAGTGGGTTAC                               | 526pb               |
|                            | TEM-TenR          | TTATCCGCCTCCATCCAGTC                               |                     |
| <i>bla<sub>ROB-1</sub></i> | ROB-SanF          | TCCCGAAACCCAAAAATACG                               | 337pb               |
|                            | ROB-SanR          | GATTGCCTGTTGCGTTATTG                               |                     |

Fonte: (SANBONGI et al., 2006).

#### 4.2.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)

O MLST, foi utilizado com o objetivo de averiguar a dinâmica entre as cepas circulantes, de *Hi*, no Brasil e, conseqüentemente, agrupá-las em perfis clonais, amplificando por meio de PCR e sequenciamento de sete genes constitucionais: *adk*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi* e *recA*, visando, por meio das sequências dos alelos, alocar os isolados em complexos clonais.

Os iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento dos sete genes, são apresentados na tabela 3. Os protocolos estão descritos em [pubmlst.org/hinfluenzae](http://pubmlst.org/hinfluenzae), de acordo com o desenvolvido por Meats et al, 2003 (Tabela 4).

A reação de PCR foi realizada com volume total de 25µL, contendo 5 µL de DNA (50 ng/µL), 12,5µL de mastermix universal GoTaq® (Promega) e 1µL (50pmol/µL) de cada iniciador. Os produtos de PCR foram purificados com o kit FastAP Thermo Sensitive, as reações de sequenciamento, foram realizadas utilizando Big Dye® Terminator (AppliedBiosystems), para marcação dos nucleotídeos e as etapas de precipitação, foram realizadas com EDTA/etanol. O sequenciamento dos genes foi realizado em colaboração com



a Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ, no sequenciador automático ABI PRISM 3730.

As seqüências obtidas, foram comparadas com as existentes, no banco de dados de MLST, para o gênero *H. influenzae* (<http://pubmlst.org/hinfluenzae/>). Os STs obtidos, foram comparados com os depositados no banco de dados e os novos alelos, encontrados, foram submetidos ao banco de dados para a confirmação de novos ST.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados no MLST

| Gene        | Nome do iniciador | Seqüência (5'-3')'    | Tamanho do amplicon |
|-------------|-------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>adK</i>  | adk – up          | GGTGCACCGGGTGCAGGTAA  | 477pb               |
|             | adk- dn           | CCTAAGATTTTATCTAACTC  |                     |
| <i>atpG</i> | atpG-up           | ATGGCAGGTGCAAAAAGAGAT | 447pb               |
|             | atpG-dn           | TTGTACAACAGGCTTTTGCG  |                     |
| <i>frdB</i> | frdB-up           | CTTATCGTTGGTCTTGCCGT  | 489pb               |
|             | frdB-dn           | TTGGCACTTTCCACTTTTCC  |                     |
| <i>fucK</i> | fucK-up           | ACCACTTTCGGCGTGGATGG  | 345pb               |
|             | fucK-dn           | AAGATTTCCCAGGTGCCAGA  |                     |
| <i>mdh</i>  | mdh-up            | TCATTGTATGATATTGCCCC  | 405pb               |
|             | mdh-dn            | ACTTCTGTACCTGCATTTTG  |                     |
| <i>pgI</i>  | pgi-up            | GGTGAAAAAATCAATCGTAC  | 468pb               |
|             | pgi-dn            | ATTGAAAGACCAATAGCTGA  |                     |
| <i>recA</i> | recA-up           | ATGGCAACTCAAGAAGAAAA  | 426pb               |
|             | recA-dn           | TTACCAAACATCACGCCTAT  |                     |

Fonte: (MEATS, 2003).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dados demográficos e caracterização fenotípica

Das 69 cepas analisadas no estudo, 38 são provenientes de crianças e adolescentes (15 de portadores e 23 de casos clínicos) e 15 de pacientes acima de dezoito anos, sendo a taxa de colonização por idade, de 55% e 21,7%, respectivamente.

Dentre todas as amostras testadas, 16 (23,1%) não tiveram a idade dos pacientes informada, uma vez que os dados demográficos enviados foram incompletos (Tabela 5).

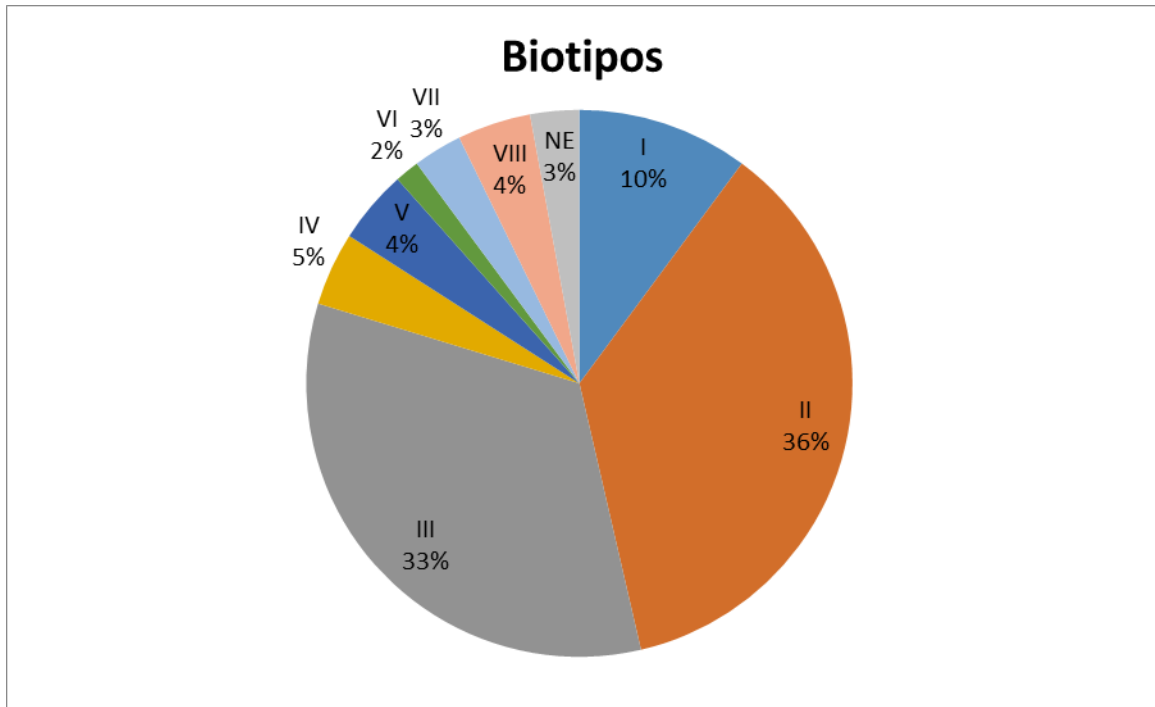
Tabela 5 - Distribuição de cepas por faixa etária

| Faixa etária (Anos) | Nº cepas  | Percentual (%) |
|---------------------|-----------|----------------|
| < 1                 | 10        | 14             |
| 1 - 4               | 22        | 31,8           |
| 5 - 9               | 5         | 1,4            |
| 10 - 18             | 2         | 7,2            |
| 19 - 59             | 10        | 14             |
| ≥ 60                | 4         | 5,7            |
| Não informado       | 16        | 23,1           |
| <b>Total</b>        | <b>69</b> | <b>100%</b>    |

Fonte: (Do autor, 2019).

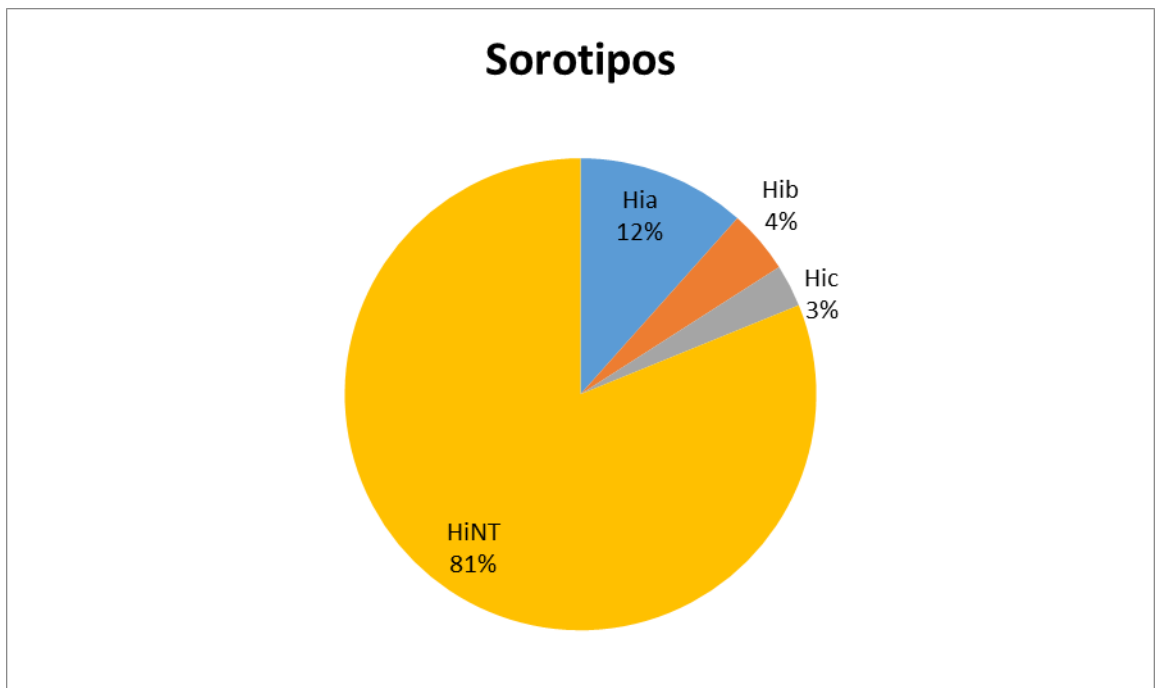
O gráfico 2 apresenta os resultados da classificação dos biótipos, obtidos a partir da combinação de resultados de provas de indol, urease e ornitina, não foi possível identificar o biótipo de apenas duas cepas das 69 testadas, tendo sido estas previamente confirmadas como Hi através da realização de sequenciamento do gene *P6*, por reação de PCR e pelo teste de fermentação dos açúcares, onde ambas foram positivas apenas para glicose. Uma vez que, as mesmas, não cresceram nos caldos respectivos para a produção de cada um dos três compostos bioquímicos mencionados acima, não foi possível obter os biótipos das cepas em questão. Enquanto que, o gráfico 3 demonstra a distribuição dos sorótipos encontrados, após os mesmos tendo sido confirmados pela PCR.

Gráfico 2 - Biotipos encontrados neste estudo.



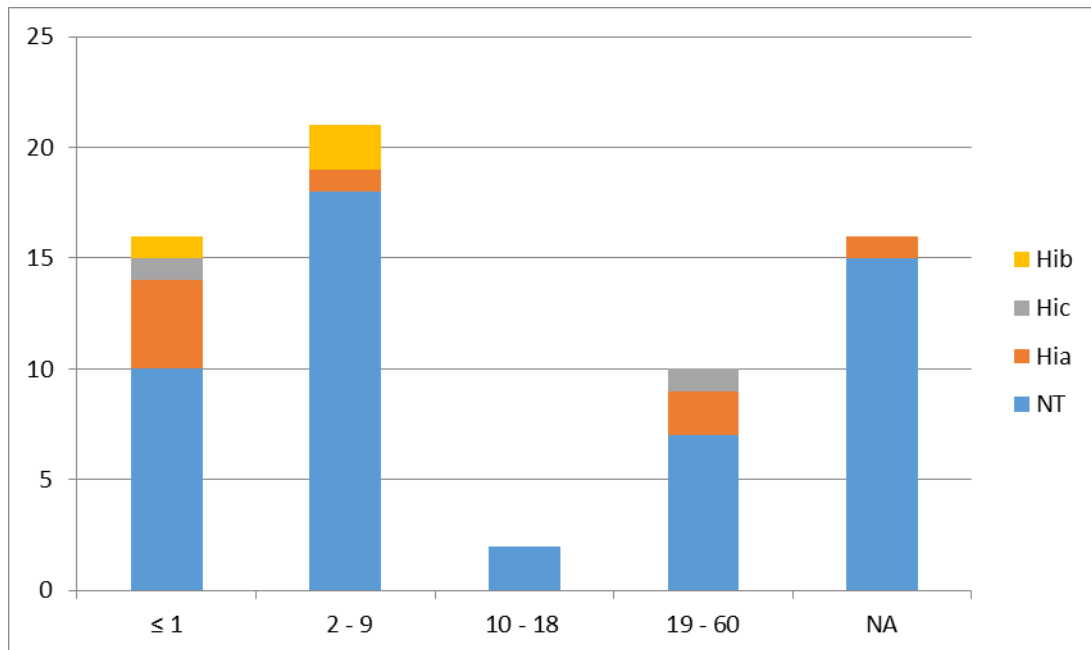
Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 3 - Sorotipos encontrados neste estudo, tendo sido todos confirmados por meio da PCR



Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 4 - Distribuição de sorotipos encontrados de acordo com a faixa etária



Fonte: (Do autor, 2019).

O gráfico 4 apresenta a relação entre os sorotipos encontrados no estudo com a idade dos pacientes, não foram identificados os sorotipos Hid, Hie e Hif dentre as cepas analisadas. É possível observar que em todas as faixas etárias as cepas não capsuladas (HiNT) são prevalentes sobre as capsuladas.

Antes da introdução da vacina de Hib, cepas HiNT eram descritas na literatura como frequentes em infecções como otite, conjuntivite e sinusite em crianças (FOXWEL, 1998; SILVA; MARIN, 2001; CRIPPS et al., 2002). Após a vacina contra o Hib, os HiNT passaram a ocupar um importante papel como causadores de doenças invasivas, tais como pneumonia, em crianças de países em desenvolvimento e, septicemia e meningite, em adultos (CONNELL et al., 2007; ADAM et al., 2010).

Das 54 cepas provenientes de casos clínicos, 37 foram isoladas de LCR, Sangue/Hemocultura e Urina, sendo que destas, 24 (64,8%), são HiNT. Enquanto 9 isolados foram coletados a partir de processos infecciosos não invasivos, sendo todos HiNT. Oito isolados encaminhados para o laboratório, no presente estudo, já haviam sido cultivados em placas e, portanto, o material de cultura não nos foi informado. A Tabela 6 esquematiza a distribuição de sorotipos de acordo com o material de origem e faixa etária.

Tabela 6 - Distribuição do número de cepas encontradas por material de origem (primeira coluna) e faixa etária em anos dos pacientes (terceira linha), número este, dividido em HiNT e sorotipificados (localizados à esquerda da barra e à direita da barra respectivamente)

| Origem          | Amostras HiNT/ Sorotipificados |        |         |
|-----------------|--------------------------------|--------|---------|
|                 | Faixa etária em anos           |        |         |
|                 | ≤ 5                            | 6 - 18 | 19 - 99 |
| LCR             | 3 / 6                          | 3 / 0  | 3 / 1   |
| LCR + Sangue    | 0 / 1                          | 0 / 0  | 0 / 0   |
| Sangue          | 6 / 2                          | 0 / 0  | 4 / 2   |
| Sec. orofaringe | 1 / 0                          | 0 / 0  | 0 / 0   |
| Sec. traqueal   | 0 / 0                          | 0 / 0  | 1 / 0   |
| Urina           | 1 / 0                          | 0 / 0  | 0 / 0   |
| Escarro         | 0 / 0                          | 0 / 0  | 2 / 0   |
| Sec. ocular     | 1 / 0                          | 0 / 0  | 0 / 0   |

LCR: líquido cefalorraquidiano

Fonte: (Do autor, 2019).

A maioria das cepas clínicas, foram isoladas de LCR (N= 19) e o sangue (N= 14), com apenas oito amostras sem informação sobre o material de origem. Dentre os pacientes menores/igual a cinco anos, cujo quadro clínico era meningite, as cepas encapsuladas foram mais frequentes (67%) enquanto as cepas HiNT tiveram uma frequência de 33%.

Quanto a outras infecções, para esta faixa etária, os isolados encapsulados apresentaram novamente uma maior frequência (42%) que os HiNT (38%). Por outro lado, nas demais faixas etárias, observou-se que os HiNT causaram tanto meningite como também outras infecções, representando 100% das infecções entre as idades de 6 a 18 anos e 92,3% de 19 a 99 anos.

## 5.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado em todos os 69 isolados de Hi, utilizando-se oito antimicrobianos. Do total de 69 cepas testadas, 25 foram sensíveis e 44 resistentes pelo método de diluição em Ágar aos antimicrobianos ampicilina, ceftriaxona, cloranfenicol, cotrimoxazol e amoxicilina+ácido clavulânico. Das 44 cepas consideradas inicialmente resistentes, apenas 22 confirmaram a resistência pelo método de CIM (por fita de Etest). Os percentuais de resistência observados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Percentuais de resistência para cada antimicrobiano

| Antimicrobianos                            | Amostras resistentes/ N total |                |                |
|--|-------------------------------|----------------|----------------|
|  | AD(%) <sup>1</sup>            | CIM/(%)        |                |
|  |                               | R              | I              |
| Amoxicilina+Ácidoclavulânico (20/10 µg)    | 17/69 (24,6) <sup>2</sup>     | 3/69 (4,3)     | 0/67           |
| Ampicilina (10 µg)                         | 31/69 (44,9)                  | 17/69(24,6)    | 0/67           |
| Ceftriaxona (30 µg)                        | 14/69 (20,2)                  | 0/69           | 0/69           |
| Cloranfenicol (30 µg)                      | 1/69 (1,44)                   | Não realizado* | Não realizado* |
| Ciprofloxacina (05 µg)                     | 0/69                          | Não realizado* | Não realizado* |
| Levofloxacina (5 µg)                       | 0/67                          | Não realizado* | Não realizado* |
| Rifampicina (30 µg)                        | 0/69                          | Não realizado* | Não realizado* |
| Sulfametoxazol+trimetoprim (1,25/23,75 µg) | 22/69 (31,8)                  | 9/69 (13)      | 0/69           |

<sup>1</sup>AD: ágar diluição; R: resistente; I: intermediário; N: número de amostras; \*somente cepas sensíveis.

<sup>2</sup> Os percentuais obtidos consideram as cepas que apresentaram resistência para cada antimicrobiano, incluso aquelas que apresentaram resistência a mais de um antibiótico.

Na primeira coluna estão indicados os antimicrobianos testados e suas respectivas dosagens. Na segunda coluna estão os resultados obtidos em relação ao teste de Disco difusão em ágar (AD), com o número de cepas resistentes/número total de cepas. Os resultados do CIM estão nas colunas seguintes com a resistência indicada da mesma forma que na coluna anterior.

Fonte: (Do autor, 2019).

O maior percentual de resistência observado entre os isolados de Hi pelo método de diluição em ágar, foi o de ampicilina (AMP) onde 31 das 69 cepas (45%) apresentaram resistência a esse antimicrobiano. Ao ser realizado o CIM, 17 confirmaram a resistência, sendo que nove destas apresentaram CIM superior a 256µg/ml.

Quanto ao Sulfametoxazol+trimetoprim (SUT), 22 dos 69 isolados (32%) se apresentaram resistência, mas apenas nove (13%), dentre todas as cepas estudadas, foram confirmados pelo CIM, sendo este superior a 32µg/ml. Destas, seis amostras (8,6%) eram resistentes aos dois antimicrobianos, como mostrado na Tabela 8. Dezesete (24,6%) apresentaram resistência à amoxicilina + ácido clavulânico no teste de disco difusão, porém apenas 3 (4,3%) foram confirmadas pelo CIM, enquanto apenas uma foi resistente tanto para amoxicilina + ácido clavulânico como para ampicilina.

Tabela 8 - Amostras de Hi resistentes aos antimicrobianos AMP, AMC e SUT

| Antimicrobiano                      | N (%)      |
|-------------------------------------|------------|
| Ampicilina                          | 17 (24,6%) |
| SUT                                 | 9 (13%)    |
| Amoxicilina+Ácido clavulânico       | 3 (4,3%)   |
| Ampicilina e SUT                    | 6 (8,6%)   |
| Amoxicilina+Ácido clavulânico + AMP | 1 (1,44%)  |

SUT: Sulfametoxazol + trimetoprim AMP: Ampicilina  
 Fonte: (Do autor, 2019).

Observou-se que os biótipos II e III foram os mais freqüente entre as cepas estudadas, porém, em relação às, 23 cepas pertencentes ao biótipo III, 13 (57%) tiveram a resistência confirmada pelo CIM, como mostrado na tabela 9, onde todas foram resistentes a ampicilina, sendo destas 6 (26%) resistentes à SUT e uma (4,2%) para amoxicilina+ácido clavulânico. Quanto ao número total de cepas com o CIM considerado, para pelo menos um dos antimicrobianos testado neste estudo, o biótipo III foi encontrado em 59% dos isolados enquanto o biótipo II em apenas 23%. A única cepa encapsulada considerada resistente pelo CIM, foi classificada com o biótipo I, desta foram, todas as demais 21 cepas restantes, com resistência confirmada pelo CIM foram classificadas como HiNT. Os biótipos IV, V e VII foram observados, cada um, em apenas um isolado, enquanto os biótipos VI e VII não foram encontrados em nenhuma cepa resistente (Tabela 9).

Tabela 9 - Percentual de sorotipos de cepas resistentes distribuídos por biótipo encontrado

| Biótipos | Total | NT resistentes (%) | Sorotipificados resistentes (%) | Nº Resistência Para cada biótipo |
|----------|-------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| I        | 7     | 1 (14,2%)          | 0                               | 1(14,2%)                         |
| II       | 25    | 5 (20%)            | 0                               | 5 (20%)                          |
| III      | 23    | 13 (57%)           | 0                               | 13 (57%)                         |
| IV       | 3     | 1 (33,3%)          | 0                               | 1 (33,3%)                        |
| V        | 3     | 1 (33,3%)          | 0                               | 1 (33,3%)                        |
| VI       | 1     | 0                  | 0                               | 0                                |
| VII      | 2     | 0                  | 0                               | 0                                |
| VIII     | 3     | 1 (33,3%)          | 0                               | 1 (33,3%)                        |

Fonte: (Do autor, 2019).

Durante este estudo foi detectada uma cepa que apresentou crescimento anormal sob a presença do antimicrobiano SUT. A mesma foi semeada em duas placas de ágar HTM, preparadas a partir do mesmo lote, uma apenas com o ágar (A) e outra com um disco do antimicrobiano citado (B), sendo ambas as placas incubadas a 37°C em uma estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o término do período de incubação as placas foram analisadas.

Na placa A, foram observadas poucas colônias espaçadas entre si ao longo do meio de cultura, enquanto na placa B, um crescimento anormal foi observado apenas em torno do disco de SUT. A mesma cepa não apresentou este comportamento em relação aos outros antimicrobianos testados, sendo sensível para os mesmos. Porém, devido ao tempo limitado, outros testes não puderam ser realizados. Em decorrência desse comportamento atípico, foi realizado o seqüenciamento do gene 16S rRNA e análise por MLST deste isolado, constatando que realmente se tratava de *H. influenzae*.

No estudo, uma das 69 cepas apresentou resistência a Cloranfenicol, porém, com a demora para o recebimento de novas fitas E-test deste antimicrobiano a confirmação da CIM não pôde ser realizado.

### 5.3 Pesquisa de $\beta$ -lactamase

Das 17 amostras que apresentaram resistência à ampicilina, 16 (94,1%) foram produtoras de  $\beta$ -lactamase e classificadas como BLP ( $\beta$ -lactamase positivo ampicilina resistente) e a única amostra não era produtora da enzima, foi classificada como BLNAR ( $\beta$ -lactamase negativo ampicilina resistente). Das três amostras resistentes a Amoxicilina+Ácido clavulânico, duas não apresentavam produção de  $\beta$ -lactamase sendo apenas classificadas como BLNACR. Três amostras resistentes à cotrimoxazol não apresentaram produção de  $\beta$ -lactamase assim também foram classificadas como BLN.

De todas as 16 cepas BLP, duas pertencem ao biótipo II, 12 ao III, uma ao IV e uma ao V, sendo todas HiNT.

### 5.4 Pesquisa dos genes *p6* e *bexA*

As amostras classificadas fenotipicamente como Hi foram submetidas à pesquisa dos genes *P6* e *bexA*, que indicam a espécie e presença da cápsula respectivamente. Em todas as



amostras foi encontrado o gene *P6*, enquanto que o gene *bexA* foi amplificado em apenas 13 cepas além das cepas controle. Desta forma, somando-se estes resultados, as cepas positivas para P6, mas onde o *bexA* não foi amplificado foram consideradas HiNT. Enquanto que, na pesquisa de amostras do tipo b<sup>-</sup> ou a<sup>-</sup> não foi observado amostras positivas.

### 5.5 Detecção dos genes da resistência aos β-lactâmicos

Todas as amostras resistentes BLA + foram submetidas a PCR para pesquisa dos genes *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>ROB</sub>*, foi detectado somente *bla<sub>TEM</sub>* nas 16 amostras BLP (23,1%), porém o gene *bla<sub>ROB</sub>* não foi encontrado em nenhum isolado.

Vinte e uma cepas foram submetidas ao sequenciamento do gene *ftsI*, que codifica a proteína PBP3, conferindo resistência à ampicilina através de várias mutações em torno de suas áreas funcionais, com o objetivo de determinar a ocorrência de cepas BLPAR, (β-lactamase positivas resistentes à ampicilina) e a presença de BLPACR, (β-lactamase positivas resistentes à Amoxicilina+Ácido clavulânico) (PUIG et al. 2014). Os resultados encontrados podem ser observados na tabela 10.

Uma das cepas BLN que apresentou resistência a somente Amoxicilina+Ácido clavulânico não amplificou o gene *ftsI* e, portanto, não foi possível verificar a ocorrência de mutações no gene, sendo assim a mesma não foi submetida ao sequenciamento do gene. E uma que apresentou resistência à Ampicilina ampliou o gene *ftsI* mas sua sequência não ficou boa dessa maneira, com a limitação de tempo não foi possível refazer o sequenciamento. As cepas Jaci002 e P4257 não apresentaram modificações e, portanto, não foram incluídas na tabela 10.

### 5.6 Sequenciamento dos marcadores de resistência

A sequência de DNA do gene *ftsI* de uma cepa sensível aos antibióticos β-lactâmicos foi utilizada para comparação com os genes *ftsI* das cepas resistentes. A sequência está depositada no GenBank sob o número de acesso L42023 (*Haemophilus influenzae* Rd KW20 chromosome). Das vinte e uma cepas submetidas ao sequenciamento do gene que codifica para a PBP3, dezoito apresentaram pelo menos uma modificação na sequência de aminoácidos. As amostras, 003, 006, 010, 013, 020, 026, 031, P3408, P4060, P4129, P5522,

P5680, P6332, P6337 apresentaram alteração na PBP3 apesar de serem produtoras de  $\beta$ -lactamase, portanto foram consideradas BLPAR (Tabela 10).

Tabela 10 - Mudanças de aminoácidos do gene *ftsI* de 18 amostras

| Amostra      | MIC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |                | Presença dos genes |                           |                           | Substituição de aminoácidos |     |     |     |     |     |
|--------------|-----------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|              | Amp                         | Amox<br>+ Cla  | $\beta$ -lac       | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> | <i>bla</i> <sub>ROB</sub> | 344                         | 350 | 389 | 437 | 449 | 526 |
|              |                             |                |                    |                           |                           | K                           | D   | L   | A   | I   | N*  |
| 003          | >256                        | -              | +                  | +                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | --  | K   |
| 006          | 12                          | -              | +                  | +                         | -                         | --                          | --  | F   | --  | --  | --  |
| 010          | >256                        | -              | +                  | +                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | --  | K   |
| 013          | 16                          | -              | +                  | +                         | -                         | R                           | --  | --  | --  | --  | K   |
| 020          | >256                        | -              | +                  | +                         | -                         | R                           | --  | --  | --  | --  | K   |
| 026          | 24                          | -              | +                  | +                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | --  | K   |
| 031          | 16                          | -              | +                  | +                         | -                         | R                           | --  | --  | --  | --  | --  |
| P3408        | 24                          | -              | +                  | +                         | -                         | R                           | --  | --  | --  | --  | K   |
| P3932        | -                           | 6              | -                  | -                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | --  | K   |
| P4060        | >256                        | -              | +                  | +                         | -                         | R                           | --  | --  | --  | --  | --  |
| P4129        | >256                        | -              | +                  | +                         | -                         | R                           | --  | --  | --  | --  | --  |
| P4225        | 16                          | -              | -                  | -                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | --  | K   |
| P5522        | 32                          | -              | +                  | +                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | --  | K   |
| P5680        | >256                        | -              | +                  | +                         | -                         | --                          | --  | --  | P   | V   | --  |
| <b>P6332</b> | <b>&gt;256</b>              | <b>&gt;256</b> | +                  | +                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | V   | --  |
| P6337        | 8                           | -              | +                  | +                         | -                         | R                           | --  | --  | --  | --  | K   |
| P6363        | ND                          | -              | -                  | -                         | -                         | --                          | N   | --  | S   | --  | K   |
| P6364        | ND                          | -              | -                  | -                         | -                         | --                          | --  | --  | --  | --  | K   |

ND: não determinada;  $\beta$ -lac: presença de  $\beta$ -lactamase; A: alanina; F: fenilalanina; I: isoleucina; K: lisina; N: asparagina; V: valina; D: aspartato; L: leucina; R: arginina; P: polina; S: serina; \*: sequência de aminoácidos da cepa selvagem L42023.

Fonte: (Do autor, 2019).

A cepa P5680 apresentou alteração em três novas posições 441, 452 e 454 além das já descritas pela literatura, como mostrado na figura 3.



Tabela 11 - Perfil clonal dos 19 novos tipos sequenciais que foram submetidos ao banco de MLST (<https://pubmlst.org/hinfluenzae/>)

| ST   | <i>adK</i> | <i>atpG</i> | <i>frdB</i> | <i>fucK</i> | <i>mdH</i> | <i>pgI</i> | <i>recA</i> | n |
|------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|---|
| 2281 | 1          | 141         | 1           | 70          | 15         | 53         | 38          | 1 |
| 2282 | 3          | 8           | 15          | 18          | 62         | 1          | 5           | 1 |
| 2283 | 44         | 45          | 16          | 108         | 17         | 2          | 3           | 1 |
| 2284 | 44         | 2           | 194         | 108         | 17         | 2          | 3           | 3 |
| 2285 | 44         | 4           | 16          | 108         | 17         | 2          | 3           | 1 |
| 2286 | 44         | 7           | 16          | 108         | 17         | 2          | 3           | 1 |
| 2287 | 44         | 7           | 194         | 15          | 17         | 2          | 1           | 1 |
| 2288 | 44         | 2           | 175         | 108         | 239        | 2          | 3           | 1 |
| 2289 | 3          | 4           | 17          | 9           | 112        | 3          | 34          | 1 |
| 2290 | 10         | 22          | 15          | 30          | 1          | 21         | 1           | 1 |
| 2291 | 33         | 8           | 188         | 16          | 17         | 2          | 29          | 1 |
| 2292 | 28         | 33          | 19          | 19          | 58         | 17         | 2           | 1 |
| 2293 | 11         | 1           | 193         | 1           | 7          | 41         | 29          | 1 |
| 2294 | 28         | 33          | 19          | 14          | 15         | 1          | 2           | 1 |
| 2295 | 11         | 2           | 7           | 14          | 28         | 26         | 3           | 1 |
| 2296 | 44         | 141         | 1           | 37          | 17         | 2          | 3           | 1 |
| 2297 | 14         | 6           | 16          | 5           | 26         | 61         | 3           | 1 |
| 2298 | 18         | 2           | 3           | 55          | 10         | 28         | 12          | 1 |

n=número de cepas com esse perfil clonal

Fonte: (Do autor, 2019).

O ST-1355 foi descrito pela primeira vez em 2014, e foi isolado a partir de um caso clínico de meningite, em 2001 no Rio de Janeiro (TUYAMA et al., 2017). O mesmo ST foi encontrado na cepa 002, do presente estudo, isolada de um portador assintomático em 2011, na Bahia, isso pode sugerir que este ST pode estar ligado às cepas brasileiras, uma vez que foi, até o momento, encontrada somente em amostras no país. Este fato, demonstra que, apesar de ter sido encontrada em um portador, a cepa 002 tem potencial de invasão uma vez que um clone deste isolado já havia causado meningite em 2001 e que esse ST vem circulando pelo país.

Das 21 cepas com perfil alélico completo, oito foram isoladas juntamente com a amostra 002 de portadores assintomáticos na Bahia em 2011, destas, sete apresentaram de um a dois alelos diferentes, a partir de uma comparação entre cada perfil alélico, como mostrado na tabela 12, portanto, agrupamos seus respectivos STs ao complexo clonal 1355, denominado desta forma pois deriva do ST central 1355.

Tabela 12 - MLST de cepas clínicas e de portadores, agrupadas em ST e CC utilizadas nesse estudo

| <b>Isolados</b>      | <b><i>adk</i></b> | <b><i>atpG</i></b> | <b><i>frdB</i></b> | <b><i>fucK</i></b> | <b><i>mdh</i></b> | <b><i>pgi</i></b> | <b><i>recA</i></b> | <b>ST</b> | <b>CC</b>       |
|----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-----------|-----------------|
| P3408                | 1                 | 141                | 1                  | 70                 | 15                | 53                | 38                 | 2281      | ND <sup>2</sup> |
| P3745                | 3                 | 8                  | 15                 | 18                 | 62                | 1                 | 5                  | 2282      | ND              |
| Jaci002 <sup>1</sup> | 44                | 2                  | 16                 | 108                | 17                | 2                 | 3                  | 1355      | 1355            |
| Jaci003 <sup>1</sup> | 44                | 45                 | 16                 | 108                | 17                | 2                 | 3                  | 2283      | 1355            |
| Jaci006 <sup>1</sup> | 44                | 2                  | 194                | 108                | 17                | 2                 | 3                  | 2284      | 1355            |
| Jaci010 <sup>1</sup> | 44                | 4                  | 16                 | 108                | 17                | 2                 | 3                  | 2285      | 1355            |
| Jaci013 <sup>1</sup> | 44                | 7                  | 16                 | 108                | 17                | 2                 | 3                  | 2286      | 1355            |
| Jaci015 <sup>1</sup> | 44                | 7                  | 194                | 15                 | 17                | 2                 | 1                  | 2287      |                 |
| Jaci020 <sup>1</sup> | 44                | 2                  | 194                | 108                | 17                | 2                 | 3                  | 2284      | 1355            |
| Jaci026 <sup>1</sup> | 44                | 2                  | 194                | 108                | 17                | 2                 | 3                  | 2284      | 1355            |
| Jaci031 <sup>1</sup> | 44                | 2                  | 175                | 108                | 239               | 2                 | 3                  | 2288      | 1355            |
| P3844                | 3                 | 4                  | 17                 | 9                  | 112               | 3                 | 34                 | 2289      |                 |
| P3932                | 10                | 22                 | 15                 | 30                 | 1                 | 21                | 1                  | 2290      | 422             |
| P4060                | 33                | 8                  | 188                | 16                 | 17                | 2                 | 29                 | 2291      |                 |
| P4084                | 28                | 33                 | 19                 | 19                 | 58                | 17                | 2                  | 2292      |                 |
| P4129                | NA                | 2                  | 16                 | 14                 | 9                 | 14                | 130                | NE        |                 |
| P4150                | 11                | 1                  | 193                | 1                  | 7                 | 41                | 29                 | 2293      |                 |
| P4225                | 28                | 33                 | 19                 | 14                 | 15                | 1                 | 2                  | 2294      |                 |
| P4257                | 11                | 2                  | 7                  | 14                 | 28                | 26                | 3                  | 2295      |                 |
| P5522                | 44                | 141                | 1                  | 37                 | 17                | 2                 | 3                  | 2296      | 1355            |
| P5680                | NA                | 2                  | 15                 | 8                  | 9                 | 61                | 3                  | NE        |                 |
| P6332                | 14                | 6                  | 16                 | 5                  | 26                | 61                | 3                  | 2297      |                 |
| P6337                | 18                | 2                  | 3                  | 55                 | 10                | 28                | 12                 | 2298      |                 |

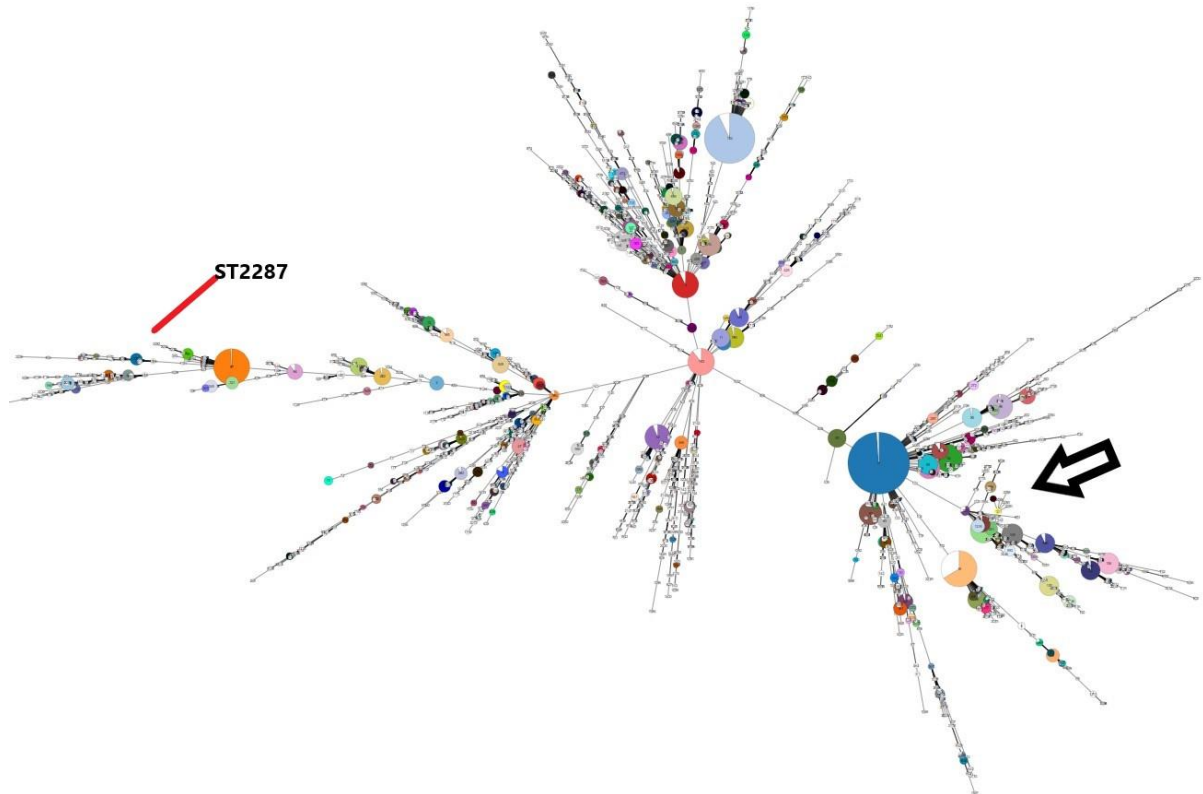
<sup>1</sup>Cepas originárias de portadores saudáveis; <sup>2</sup>Não Designado pelo Banco de MLST  
Fonte: (Do autor, 2019).

As amostras 006, 020, 026, e 031 apresentaram alteração do *frdB*-16 para *frdB*-194 e *frdB*-175, enquanto as amostras 003, 010, e 013 apresentaram alteração do *atpG*-2 para os *atpG*-45, *atpG*-4 e *atpG*-7. Das quatro cepas resistentes que apresentaram alteração no *frdB* quatro tiveram a redução do CIM para ampicilina, o que pode indicar que o *frdB*-16 pode estar relacionado a cepas com CIM > 256 µg/ml. A cepa 015 não foi considerada pertencente ao complexo clonal 1355, por apresentar mais de três modificações no perfil alélico, diferente das demais cepas, essa amostra foi considerada sensível para todos os antimicrobianos testados, o que pode sugerir que este complexo clonal está relacionado com cepas de CIM elevado para Ampicilina, possivelmente outras cepas consideradas sensíveis neste estudo podem apresentar iguais ou mais alterações que a amostra 015 em seus perfis alélicos. Quanto ao gene *atpG*, as cepa 013, que teve o *atpG*-2 substituído pelo alelo 7, igual a cepa 015, apresentou redução de seu CIM para ampicilina o que pode sugerir que o *atpG*-7 pode estar ligado a cepas com CIM menores a 256 µg/ml.

Os genes *adK*, *pgI* e *recA* não apresentaram variação de alelos, o que sugere que os alelos 44, 2 e 3 respectivamente, possam ser marcadores do complexo clonal 1355.

A Figura 4 mostra a análise por *Minimum Spanning Tree* (MST) e a distribuição dos 2324 ST depositados até a data de 27/09/2020 no *Haemophilus influenzae* MLST Database (<https://pubmlst.org/organisms/haemophilus-influenzae>) em todo o mundo. A alocação da cepa brasileira do ST1355 e os novos ST associados descritos nesse estudo, está indicada na figura com uma seta. A alocação do ST2287 também descrito nesse estudo está indicada com uma linha vermelha.

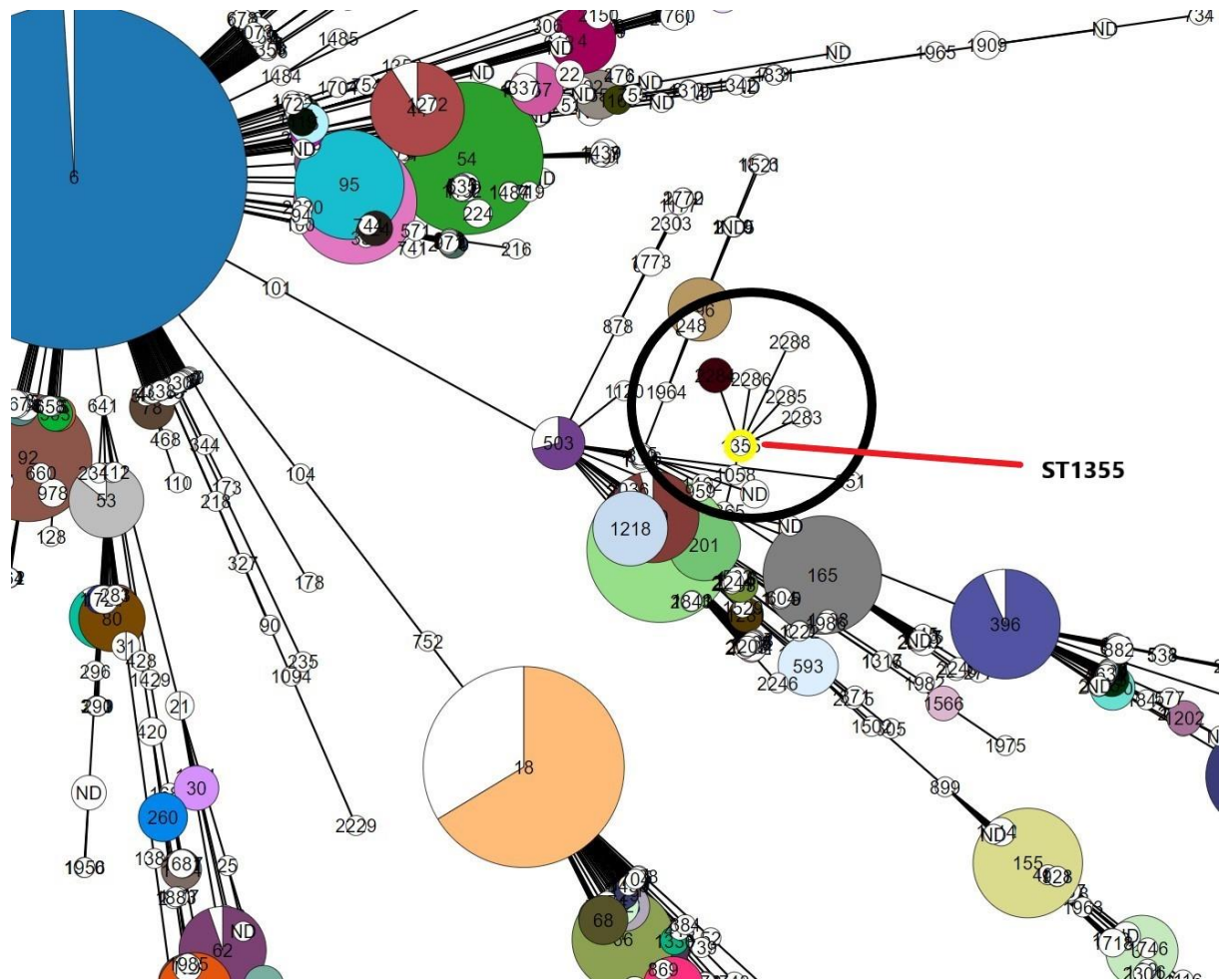
Figura 4 - *Minimum Spanning Tree* (MST) com os 2324 ST depositados no banco de MLST de Hi. A seta preta, indica a alocação do ST1355 e os novos ST associados descritos nesse estudo. A posição do novo ST2287, também descrito nesse estudo, está indicado com uma linha vermelha



Fonte: (Do autor, 2019).

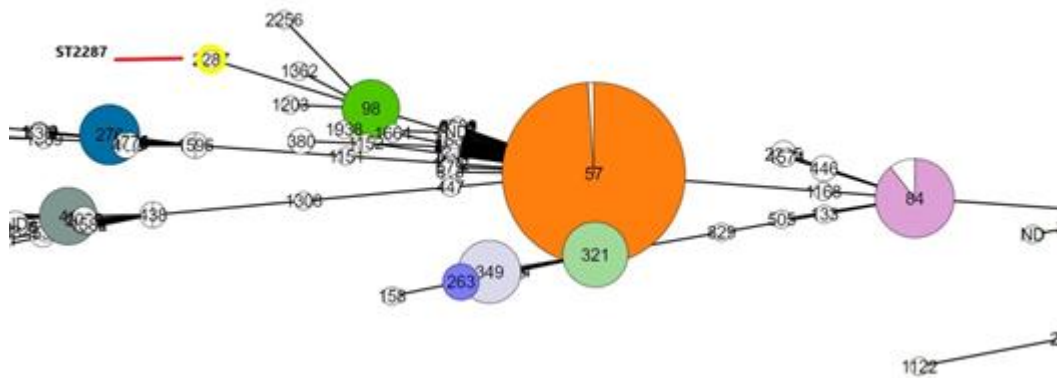
A Figura 5 mostra um “close” da Figura 4 destacando o grupo de novos ST descritos nesse estudo, formado a partir do ST1355, indicado com uma seta vermelha. A Figura 6, mostra um outro “close” da Figura 8 destacando o novo ST2287, descrito nesse estudo, que não apresentou nenhuma associação com os outros ST<sub>s</sub> descritos que agruparam no complexo clonal do ST1355. De acordo com a análise de MST, o ST2287, apresenta associação com ST98 com 10 cepas isoladas de diferentes países da Europa e dos EUA, junto com os ST2256 (China), ST1362 (Canada) e ST1203 (Noruega), todos em anos diferentes. Vale notar que o ST98, foi gerado a partir do ST57 que forma um grupo de isolados importante com 101 cepas provenientes de todos os continentes, com exceção da América do Sul. O ST2287 descrito nesse estudo, é a primeira cepa do Brasil associada a esse grupo.

Figura 5 - MST com destaque para o grupo de novos ST descritos nesse estudo, formado a partir do ST1355, indicado com uma linha vermelha



Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 6 - MST com destaque para a alocação do novo ST2287 descrito nesse estudo

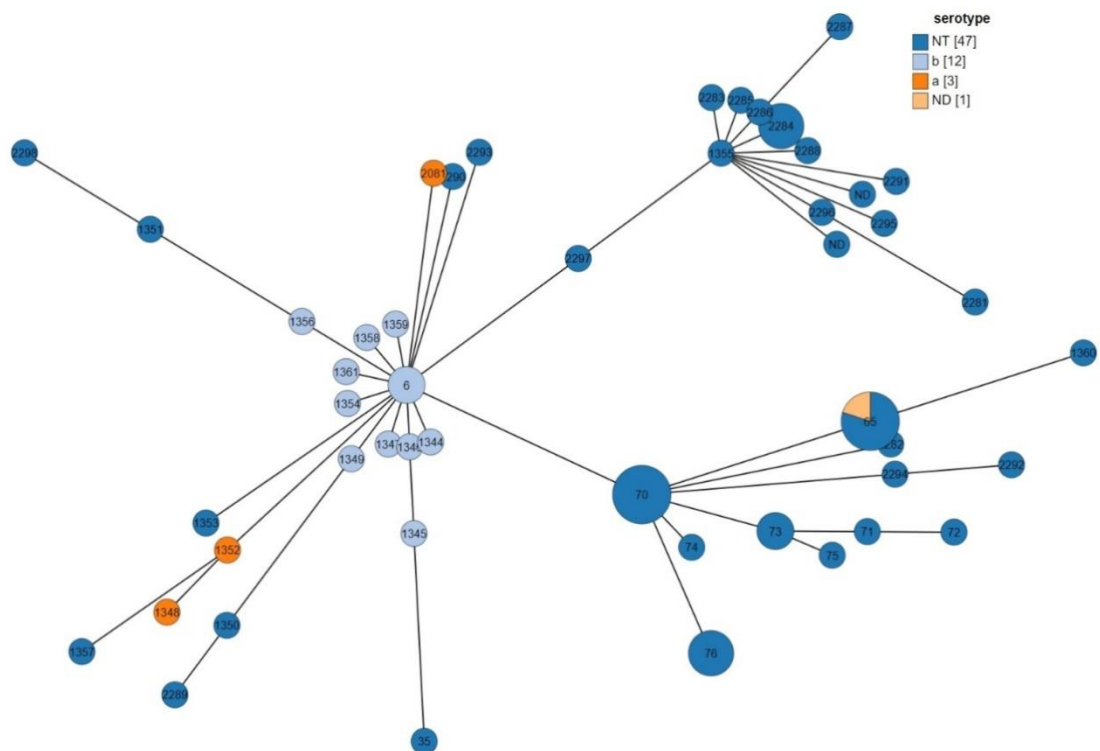


Fonte: (Do autor, 2019).



A Figura 7 mostra uma análise por MST com as 65 cepas isoladas no Brasil e depositadas no banco de MLST. Nessa representação, os sorotipos são destacados por cores. É importante observar a alocação dos ST nessa análise, apenas com as cepas brasileiras. Por não haver nesse grupo cepas do ST98, o ST2287 apresentou associação com o grupo de ST que formou o CC1355, apesar de compartilhar apenas 3 alelos com o ST1355. Nota-se na figura, que o ST2287 foi gerado a partir do ST2286, com quem compartilha 4 alelos. A análise ainda mostra um importante agrupamento do sorotipo b com um possível CC, gerado a partir do ST6 e a grande presença das cepas HiNT, formando grupos distintos e dois complexos clonais claramente definidos, o CC1355 e o CC70. Nesse último CC, observamos a presença de uma cepa com sorogrupo não definido, que provavelmente é um HiNT.

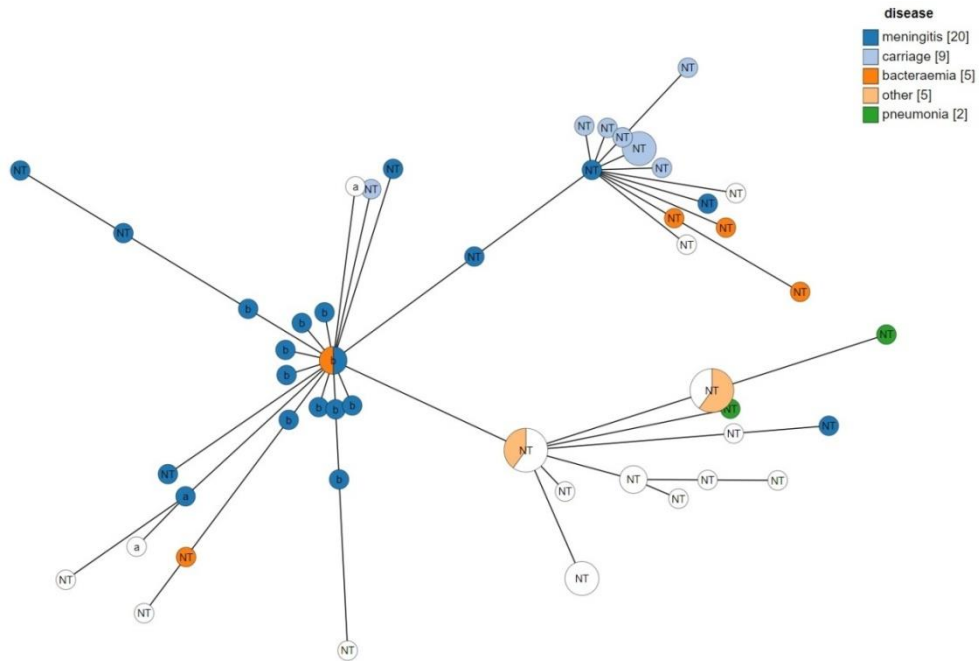
Figura 7 - MST com as cepas isoladas no Brasil. A distribuição dos sorotipos está indicada por cores diferentes. Os ST estão indicados com seus respectivos números



Fonte: (Do autor, 2019).

A Figura 8 mostra a mesma análise de MST da Figura 7, com destaque para a origem de isolamento das cepas (clínica ou portador).

Figura 8 - MST com as cepas isoladas no Brasil



Legenda: A origem de isolamento das cepas está indicada por cores diferentes. Os sorotipos estão indicados na figura.

Fonte: (Do autor, 2019).

## 6 DISCUSSÃO

Estima-se que o uso da vacina conjugada contra Hib, implementada no calendário de vacinação infantil em 1999, tenha impedido as sequelas neurológicas graves, encontradas em mais de 25% dos sobreviventes da meningite por Hib, durante o período pré-vacinal. Sendo meningite por Hib diminuído 82% nos primeiros 2 anos de campanha (RIBEIRO et al, 2007).

No entanto, há necessidade de se conhecer melhor o cenário atual das infecções por Hi no Brasil, desta forma, consideramos necessário e relevante o estudo de cepas isoladas a partir de casos clínicos e de portadores assintomáticos, provenientes de quatro estados do Brasil, nos últimos dez anos, no sentido de avaliar a situação pós-vacinação, em relação às cepas atualmente presentes em populações susceptíveis, como crianças e idosos, sendo que, em nosso país os dados publicados a partir destas condições são escassos.

Foram selecionadas 69 cepas neste estudo, sendo escolhidas de forma aleatória, as mesmas fazem parte da Coleção de pesquisa do INCQS/setor de vacina contra Hib. Observou-se que a taxa de colonização em crianças foi maior, apresentando um percentual de 55%, enquanto, para adultos, foi de 21,7% em relação a todas as amostras testadas, demonstrando que a colonização em crianças é mais freqüente do que em adultos. De acordo com um estudo realizado na Espanha, a proporção de colonização média entre crianças saudáveis foi de 42%, entre 900 indivíduos que participaram do teste, enquanto que, na Bélgica, um estudo com 333 crianças demonstrou uma taxa de portadores de Hi de 83%. Um estudo realizado na China, apontou uma ampla variação na taxa de colonização por Hi, demonstrando que essa taxa pode variar de 0,2% a 59%, dependendo da região (JOURDAIN et al., 2011; PUIG et al., 2014; YANG et al., 2019).

Enquanto, para adultos, um estudo feito com 677 idosos, sendo apenas dois vacinados contra Hib, com idades entre 65 e 106 anos, em três casas de repouso na Alemanha, demonstrou uma taxa de colonização por Hi de 1,9%, o que é relativamente baixa, se comparada com a que foi observada pelo presente estudo. Porém, um estudo realizado nos Estados Unidos analisou 553 casos de doenças invasivas provocadas por Hi, de 2008 a 2018, em homens, cuja a faixa etária teve uma média de 23 a 78 anos, onde fez uma relação de incidência de cepas Hi em pacientes HIV positivo, dessa forma, dos 553 casos, 60 (11%) foram em pacientes HIV positivo, destes, 55 (92%) dos casos foram entre a faixa etária de 18 a 55 anos. O mesmo estudo também concluiu que, pacientes portadores do vírus do HIV têm um risco maior de desenvolver infecções invasivas por Hi, nesta faixa etária, se comparado

com os pacientes sem o vírus. Juntamente, é observado pelo estudo em questão, que em pacientes acima de 55 anos, que não são soro positivo, os riscos de desenvolver infecções graves, provocadas por Hi, são maiores do que em pacientes HIV positivo, da mesma faixa etária, isso nos demonstra que, apesar da taxa de colonização em adultos por Hi, estar crescendo, ainda é inferior a observada em crianças, mesmo na era pós-vacinal. (COLLINS et al., 2018; DRAYB et al., 2019).

No entanto, ao comparar os percentuais de colonização por sorotipo percebeu-se que tanto em adultos como em crianças, os HiNT foram os mais freqüentes em relação as cepas encapsuladas, apresentando um percentual de 57% em crianças menores ou igual a 5, 100% nas faixas etárias de 6 a 18 anos e 76% de 19 a 99 anos, em relação ao número total de cepas para cada grupo de faixa etária citado. Igualmente, de acordo com Yang et al os NT, apresentaram um percentual de 22% de colonização, entre as crianças saudáveis, na China (YANG et al, 2019). Observa-se que, apesar da colonização ser maior em crianças, o que é justificável, pela maturação do sistema imunológico na primeira infância, os HiNT se apresentaram igualmente capazes de produzir casos clínicos entre adultos, confirmando que este tipo de Hi vem se tornando cada vez mais virulento, em qualquer faixa etária, o que o classifica como uma preocupação emergente entre as cepas Hi. Segundo Livorsi et al, os HiNT são associados a estadias hospitalares mais longas e taxas de mortalidade mais altas, do que doenças provocadas por cepas encapsuladas, em crianças e adultos. O mesmo estudo também sugere, que bebês, idosos e adultos, com certos problemas crônicos, apresentam risco maiores de morte pelos não tipáveis (LIVORSI et al., 2012).

Apesar dos NT terem sido mais freqüentes em todas as faixas etárias, dentre os pacientes menores/igual a cinco anos, cujo quadro clínico era meningite, as cepas encapsuladas foram mais frequentes (67%) em comparação as NT (33%) em causar meningite, enquanto que os NT foram os principais causadores de bacteremia nesta faixa etária tendo um percentual de 28,5% em relação as cepas encapsuladas confirmando o que foi relatado por um estudo no Japão em 2018, que analisou um total de 28 amostras isoladas de crianças e observou que a maioria dos casos clínicos, causados por HiNT, era bacteremia. Anteriormente, um outro estudo já havia apontado que, casos de meningite por NTHi, são raros em crianças, sendo bacteremia e pneumonia, mais comuns (CARDINES et al., 2007; BAMBERGUER et al., 2014; NAITO et al., 2018). Quanto a pielonefrite, foi observado no presente estudo, que apenas duas cepas HiNT foram causadoras de infecção no trato urinário, confirmando o que já foi dito em estudos anteriores, que descrevem *H. influenzae* como uma

causa rara de infecção do trato geniturinário, sendo ligada principalmente a presença de pedras nos rins e outras anormalidades no trato urinário (HANSSON S. et al., 2007; FUJII et al., 2017).

Apesar da vacina contra Hib ter diminuído a incidência de casos provocados por esse sorotipo, nesse estudo, das 6 cepas encapsuladas que provocaram meningite, em crianças com menos de cinco anos, três eram Hib, com um percentual de 4,3% em relação ao número total de cepas analisadas, o que mostra que apesar de baixa, a colonização pelo sorotipo b ainda está presente. De acordo com um estudo, realizado na África, com mil crianças, cerca de 0,9% de 1 a 2 anos, eram portadoras de Hib, enquanto que um estudo realizado em Goiânia, com 1192 crianças, vacinadas em 2011, identificou que 0,7% portavam o sorotipo b. Segundo os autores, a meningite por Hib ocorreu principalmente em bebês, enquanto a meningite por HiNT ocorreu em todas as faixas etárias, apesar de ter tido uma incidência menor em crianças. (LIDHANI et al, 2010; CARVALHO et al., 2011; HOWIE et al., 2013).

Segundo um estudo de 2010, realizado com 690 amostras, provenientes de dez países europeus, o sorotipo f foi mais prevalente, sendo encontrado em 72,5% dos pacientes, seguido por Hie (20,7%), o mesmo não foi encontrado em nenhuma das 69 cepas estudadas juntamente com os sorotipos Hid e Hie. De acordo com Resman et al, houve um aumento, estatisticamente, significativo de Hif em cepas da Suécia, em pacientes acima de 60 anos, juntamente, com um estudo realizado na Alemanha, que encontrou o tipo f em 83% dos isolados estudados. Contudo, Hia foi o único sorotipo mais freqüente, depois dos HiNT, tendo como percentual 11,5%, isso confere com um estudo do Canadá de 2017, onde foi relatado que o sorotipo a foi o mais encontrado, depois dos HiNT, com percentual de 23,1% (KALIES et al., 2009; LIDHANI et al., 2010; RESMAN et al., 2011; TSANG et al., 2017).

No presente estudo, dentre as cepas resistentes, 59% eram do biótipo III, 23% do biótipo II e apenas 4,5% foi representado por cada dos biótipos I, IV, V e VII, enquanto os demais biótipos não foram associados a nenhuma cepa resistente. Os isolados resistentes à ampicilina, são HiNT, e pertencem, em sua maioria, ao biótipo III, compondo 76% dos isolados resistentes a esse antimicrobiano, sendo o biótipo II significativamente menor, quando comparado com o III. Esse resultado, é semelhante com o obtido por Jain et al em 2006, onde foi observado que os biótipos mais comuns, quanto a resistência a ampicilina, são os biótipos I, II e III, tendo um percentual de 93,4%, desta forma, os biótipos citados, foram considerados significativamente mais resistentes à ampicilina, do que os demais (DAS et al., 2002; JAIN et al., 2006).

Porém, contrapondo o apresentado pelo estudo em questão, nossos resultados mostraram que, ao invés do biótipo I, é o biótipo III o mais frequente entre as cepas resistentes, isso reforça o que foi relatado por um estudo realizado antes da implementação da vacina contra Hib, em que o biótipo III foi associado a resistência. De acordo com Sharman et al., os biótipos I são frequentes em cepas Hib, enquanto o biótipo II em cepas HiNT, contudo, no presente estudo, as três cepas identificadas como Hib apresentaram biótipos variados, enquanto entre os isolado HiNT, tanto o biótipo II e III tiveram a mesma frequência (TENG et al., 1989; SHARMAN et al., 2002; JAIN et al., 2006).

Devido à escassez de dados, sobre o sexo dos pacientes, tal informação não foi considerada no presente estudo, uma vez que, estudos anteriores não observaram diferenças estatisticamente, significativas da proporção de portadores entre homens e mulheres, e acordo com Yang (2019), tal informação está de acordo com o estudo realizado em Taubaté-SP por Bricks e colaboradores (2004).

Os resultados dos ensaios de susceptibilidade (diluição em ágar e CIM) com os antibióticos: ceftriaxona, cloranfenicol, fluoroquinolonas (levofloxacina e ciprofloxacina) e rifampicina, demonstraram alta atividade *in vitro* contra *H. influenzae*, podendo, portanto, servir como base para a escolha do tratamento de infecções causadas por este micro-organismo. No entanto, foi observado alta resistência à ampicilina e sulfametoxazol + trimetoprim, pelas cepas *H. influenzae*. Apesar de apenas três amostras, 4,3%, terem apresentado resistência à amoxicilina+ácido clavulânico, é perceptível uma redução da susceptibilidade a esse antimicrobiano, nas cepas brasileiras.

A resistência à sulfametoxazol+trimetoprim, 13%, já vem sendo apontada em outros trabalhos. Em 2019, Wang e colaboradores, observaram uma taxa de 71,1% de resistência, para este antimicrobiano, juntamente, trabalhos com cepas brasileiras de Hi, que descrevem a mudança do perfil de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim, de 32,6% para 65,8%, dos isolados. Sendo as altas taxas de resistência, atribuídas à elevada utilização deste agente, para o tratamento de infecções respiratórias, no Brasil, comuns em crianças, hipótese apoiada pelo fato de, trimetoprim/sulfametoxazol ser de baixo custo, no Brasil, além de ter um regime de dosagem simples, porém o uso deste antibiótico tornou-se menos importante, atualmente, devido ao surgimento de cepas resistentes ao cotrimoxazol, em todo o mundo (CASTANHEIRA et al., 2006; DE ALMEIDA et al., 2006; MOHD et al., 2013; WANG et al., 2019).

Um outro estudo realizado em 2006, da Índia, relacionou a produção de  $\beta$ -lactamase como uma possível causa para o aumento da resistência de cepas Hi, ao cotrimoxazol, onde os organismos BLP são, significativamente, mais associados a esse tipo de resistência, esta informação relatada por Jaine e colaboradores, está de acordo com o observado no presente estudo, uma vez que das 9 cepas resistentes a cotrimoxazol, 13%, seis (8,6%) foram consideradas produtoras de  $\beta$ -lactamase (JAIN et al., 2006).

Esclarecer a efetividade do antimicrobiano à ampicilina, é fundamental, sendo o estudo da resistência a esta droga de grande importância, já que, por muitos anos, foi a primeira opção para tratamento de meningites. Neste estudo, cerca de 24,6% das cepas estudadas apresentaram resistência a este antimicrobiano. Isso é compatível com o observado por Deghmane, onde 24% dos isolados invasivos eram resistentes à ampicilina. Juntamente com o trabalho de Zanella e colaboradores, em 2011, que encontraram resistência de 22% em 860 cepas estudadas e o grupo de Hashida (2008), que encontrou 37,2% amostras resistentes, de um total de 363 amostras. No entanto, um estudo realizado na Coreia do Sul, apontou uma taxa de 69,8% de resistência entre cepas HiNT, apontando que os HiNT vem apresentando um aumento gradativo na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, o que está de acordo com o observado no presente estudo, uma vez que, todos os isolados resistentes a essa classe de antimicrobianos é HiNT (HASHIDA, 2008; ZANELLA et al., 2011; DEGHMANE et al., 2019; HAN et al., 2019).

A resistência mediada por  $\beta$ -lactamase à ampicilina foi descrita, no início dos anos 70, por Medeiros e O'Brian, logo, o termo BLPAR ( $\beta$ -lactamase positivo, resistente à ampicilina) passou a ser frequentemente usado para cepas portadoras desse mecanismo, as estirpes BLPAR produzem  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídeos, sendo os genes comumente encontrados TEM, ROB e IVA. Outro mecanismo também vem sendo relatado como responsável pela redução da susceptibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos, em cepas BLNAR (isolados  $\beta$ -lactamase negativa resistentes a ampicilina), desde os anos 70, que é alteração na PBP3 codificada pelo gene *ftsI*. Essas mutações levam a resistência à esses antimicrobianos, sendo a mais comum a substituição N526K (MEDEIROS; O'BRIAN, 1975; THORNBERRY; KIRVEN, 1974; CERQUETTI et al., 2007; KIEDROWSKA et al., 2017).

Neste trabalho, observamos que além da alta resistência à ampicilina, o principal mecanismo envolvido foi a produção da enzima  $\beta$ -lactamase, observada em 94,1% das amostras resistentes a esse fármaco. Além disso, detectou-se o gene *bla*<sub>TEM</sub> em 23,1%, o gene é considerado o mais comum em *H. influenzae* adquirido por transferência horizontal, o que

corresponde a todas as amostras BLPAR, confirmando os resultados do estudo de Wang e colaboradores que encontraram o índice cepas positivas para  $\beta$ -lactamase de 51,46% onde o sequenciamento gênico mostrou que todas as 141 cepas positivas para beta-lactamase eram do tipo *bla<sub>TEM</sub>*. Resultados semelhantes também foram encontrados por Farrell e colaboradores, em 2005, com isolados de *H. influenzae* de vários países, incluindo o Brasil, onde encontraram média de 93,7% cepas positivas para o gene *bla<sub>TEM</sub>* (FARRELL et al., 2005; WANG et al., 2019; HEGSTAD et al., 2020).

O gene *bla<sub>ROB</sub>* foi pesquisado utilizando três pares de iniciadores devido à dificuldade de ajuste do programa e à falta de um controle positivo. Utilizando-se os iniciadores Rob-SAN (SANBOGI et al., 2006) e Rob<sub>TEM</sub> (TENOVER et al., 1994), seguindo-se os programas de PCR disponibilizados por seus respectivos descritores, não conseguimos encontrar resultados positivos. A ausência do gene ROB pode ser confirmada com a ausência de cepas resistentes à ceftriaxona correlacionados em alguns estudos (KARLOWSKY, 2000). De acordo com a literatura a prevalência global de *H. influenzae* abrigar ROB-1 é de 7 a 11% entre isolados produtores de  $\beta$ -lactamase, sendo mais freqüente no México e nos Estados Unidos (26 e 21%, respectivamente) onde é alto o nível de consumo de cefaclor, sugerindo a exposição a este medicamento pode selecionar as cepas que carregam *bla<sub>ROB-1</sub>*, uma vez que esta enzima possui um nível particularmente alto de atividade hidrolítica contra o cefaclor (GÁLÁN et al., 2003; HANNA et al., 2018).

Em *H. influenzae* são conhecidas cinco PBPs (1A, 1B, 2, 3 e 4) desta forma alterações na PBP3 codificada pelo gene *ftsI* vem sendo atribuídas ao aumento da resistência em BLNAR. Neste trabalho, identificamos alterações em dezoito cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase que apresentaram pelo menos uma modificação em suas sequências. Observou-se substituições de aminoácidos 526N por 526K como a mais freqüente dentre as cepas BLP, encontrada em seis amostras, 003, 010, 013, 020, 026, P3408 e P5522. Alteração também encontrada nos trabalhos de Skaare e colaboradores (2014) que descreveram a presença desta modificação em 7 amostras BLA positivas, também observada por Shuel e Tsang (2009) onde apenas duas cepas com o mesmo perfil foram relatadas.

Além desta alteração (posição 526), as amostras 013, 020 e P3408 apresentaram outra mutação, 344K por 344R, que também foi observada nas seguintes amostras: 031, P4129 e P4060, onde a mesma já foi descrita por um estudo realizado na Polônia por Kriedrowska et al. (2017) e por Søndergaard et al. (2015). Enquanto as amostras 006, P5680 e P6332 apresentaram alterações na posição 389 onde uma leucina (L) foi substituída por uma



fenilalanina (F) e na posição 449 em que uma isoleucina (I) foi substituída por uma valina (V), respectivamente. O mesmo estudo de 2015 observou juntamente estas alterações, no entanto, em amostras não produtoras de  $\beta$ -lactamase, igualmente ao que Dabernat e colaboradores descreveram em 2002.

A cepa P5680 também apresentou alteração em cinco posições: 437, 441, 449, onde uma alanina (A) foi substituída por prolina (P); glicina (G) por arginina (R); isoleucina (I) por valina (V), respectivamente, quanto as posições 452 e 454, ambas apresentaram a mesma modificação, onde uma alanina (A) foi substituída por uma serina (S), as mutações observadas em 441, 452 e 454 não foram descritas em publicações anteriores, porém em conjunto com as outras mudanças e produção de  $\beta$ -lactamase, pode ter contribuído para resistência à ampicilina.

Concomitantemente, a modificação na posição 449 também foi observada na cepa P6332 considerada resistência tanto para ampicilina como para Amoxicilina+Ácido clavulânico o que é compatível com o obtido em um estudo de 2014 onde tal alteração foi encontrada em sete isolados BLP e posteriormente descrita em quatro isolados do mesmo perfil por um estudo de 2017 (SKAARE et al., 2014; TSANG et al., 2017).

Quanto as quatro amostras  $\beta$ -lactamase negativas, P6363 apresentou três alterações, nas posições já descritas 350, 437 e 526, onde uma lisina (K) foi substituída por uma arginina (R), alanina (A) por serina (S), asparaginina (N) por lisina (K), respectivamente. Esta mutação na posição 437 foi relatada por Skaare et al (2014) em uma cepa BLP e por Dabernat et al (2002) em dois isolados BLNAR. Estes resultados podem indicar que estas mutações estão ocorrendo independente da presença de  $\beta$ -lactamase.

Alteração nas posições 350 e 526 tem sido amplamente descritas na literatura em cepas BLNAR, sendo esta última encontrada nas amostras P3932, P4225 e P6364 (UBUKATA, et al, 2001; DABERNAT et al, 2002; SHUEL; TSANG, 2009; SØNDERGAARD et al., 2015; TSANG et al., 2017; KIEDROWSKA et al., 2017).

Estudos anteriormente tem relatado a redução da susceptibilidade das cepas Hi à amoxicilina+ácido clavulânico, sendo de crescente preocupação a prevalência de cepas BLNAR e BLPACR (que apresentam mutações no *ftsI* e produção de  $\beta$ -lactamase). Um estudo publicado em 2015 analisou amostras de *H. influenzae* do período de 2000 à 2010, desta maneira constataram que as cepas resistentes à amoxicilina+ácido clavulânico apresentaram como taxa de isolamento 1,6%, do segundo período, para 4,1% ao final do

estudo, concluindo uma tendência crescente da ocorrência de BLPACR. Um estudo japonês de 2019 analisou 3 casos de conjuntivite por cepas BLPACR, onde uma das três amostras foi resistente a todos os antibióticos, o estudo também aponta o aumento de isolamento de cepas com este perfil de resistência provenientes da nasofaringe das crianças japonesas (TSANG et al., 2017, INADA et al., 2019).

Isso confere com o observado pelo presente estudo, apesar de uma cepa nesse estudo ter sido considerada BLPACR a mesma apresentou um CIM > 256 µg/ml tanto para ampicilina como para amoxicilina+ácido clavulânico, demonstrando que apesar de as BLPACR serem menos frequentes que BLNAR são uma preocupação emergente. Outro dado importante para se destacar é que, das dezoito cepas que apresentaram alteração na sequência de aminoácidos do gene *ftsI*, onze possuíam concomitantemente a produção de β-lactamase, apesar de não serem resistentes a amoxicilina+ácido clavulânico, isso pode demonstrar uma tendência entre as cepas brasileiras de desenvolverem ambos os mecanismos de resistência, o que faz com que a análise genética de mutações no *ftsI* tanto em cepas BLP como em BLNAR seja de grande importância para a vigilância epidemiológica.

Todos os 21 isolados submetidos a tipificação molecular por MLST foram caracterizados como não-tipáveis, através de seus perfis alélicos identificamos uma alta diversidade genética, por meio dos quais dezenove novos STs foram submetidos ao banco de dados. Esses dados são compatíveis com o encontrado na literatura, que descreve desde antes da implantação do MLST a alta heterogeneidade entre isolados HiNT de *H. influenzae* em relação aos encapsulados (PORRAS et al, 1986; MUSSER et al, 1990). Posteriormente este fato foi confirmado por SACCHI e colaboradores em 2005 observando através da tipagem do 16s e MLST de isolados Hi, que embora ossorotipáveis se comportem como populações altamente clonais, os HiNT não estão intimamente relacionados a isolados sorotipáveis e também parecem sofrer recombinações frequentes. Recentemente um estudo de 2017, que avaliou pela primeira vez as amostras brasileiras de Hi utilizando o MLST, também identificou essa diversidade genética (TUYAMA et al., 2017).

O único ST identificado no presente estudo já definido no banco de dados foi o ST1355, descrito e identificado pela primeira vez por Tuyama e colaboradores em 2017, a partir de uma cepa isolada de um caso clínico de meningite em 2001 no Rio de Janeiro. Essa cepa foi caracterizada como HiNT, corroborando com o observado pelo presente estudo para esse ST.

Um estudo de 2020, analisou cepas de *H. influenzae* de um surto provocado pelo ST-422, que já foi descrito em pelo menos cinco países sendo considerado prevalente em todo o mundo, o estudo aponta que esta sequência tipo apresenta redução da susceptibilidade a classe das quinolonas e aos  $\beta$ -lactâmicos (TANAKA et al, 2020). Apesar de este ST não ter sido observado no presente estudo, o ST2290 compartilha alelos com o ST422. É interessante notar que a cepa P3932, pertencente ao ST2290 apesar de ser sensível para os demais antimicrobianos apresentou alta resistência a amoxicilina+ácido clavulânico, mesmo sendo  $\beta$ -lactamase negativa e possuindo uma única modificação no gene *ftsI*, isso pode sugerir que tais fatores atrelados com o parentesco genético com o ST422 possam estar relacionados com essa resistência.

De acordo com a conformação da árvore de MST apresentada na Figura 8, podemos notar que o ST103 foi provavelmente o ST central de onde foram gerados outros ST e complexos clonais. A partir do ST103, foi gerado após total diversificação alélica o ST6. Apesar do ST103 ser aparentemente o ancestral de todos os outros com 50 cepas, o ST6 é o maior contendo 296 cepas, 6 vezes mais do que o ST 103, e é partir do ST6 que foram gerados os grupos onde se encontram as cepas brasileiras incluindo as cepas descritas nesse estudo.

As cepas do CC1355 originaram-se, como mostrado na figura 9, do ST 103 que é descrito na literatura como freqüente em cepas HiNT produtoras de  $\beta$ -lactamase e sem alteração na PBP, sendo associado à resistência à ampicilina, portanto a origem genética dessas cepas a partir do ST103 pode ter corroborado para o aparecimento de cepas com CIM >256  $\mu\text{g/ml}$  do complexo clonal 1355 (GIUFRE et al., 2013; LI et al, 2020).

Os ST2286 e ST2287 obtidos a partir dos perfis alélicos das cepas *Jaci013* e *Jaci015*, respectivamente, originaram-se a partir de uma ramificação do ST57, como mostrado na figura 10, que é associado na literatura a cepas HiNT e não produtoras de  $\beta$ -lactamase, características essas observadas na cepa *Jaci015*, portanto a origem genética desta cepa pode ter exercido influência para que a mesma fosse suscetível aos antimicrobianos testados. No entanto, a cepa *Jaci013* apresentou CIM de 16  $\mu\text{g/ml}$  para ampicilina e superior à 32  $\mu\text{g/ml}$  a sulfametaxazol + trimetropim, juntamente com produção de  $\beta$ -lactamase e duas alterações na PBP, contudo estudos já relataram que cepas do ST57 apresentam redução da susceptibilidade a ampicilina e a sulfametaxazol + trimetropim, sendo este ST ocasionalmente associado também a cepas com alteração no gene *ftsI*, desta forma é possível que a origem genética de cepas a partir do ST57 possa ter selecionado essa resistência à sulfametaxazol + trimetropim e

um CIM relativamente alto para ampicilina (GIUFRÈ et al., 2015; DONG et al., 2020; HELIODORO et al., 2020; LI et al., 2020).

A cepa P5522, isolada em 2016 no Rio de Janeiro, a partir de um caso clínico de septicemia, também foi considerada pertencente ao CC1355, uma vez que possui apenas três alterações no seu perfil alélico e sendo identificada como ST2296. Essa cepa apresentou um CIM de 32µg/ml, o que reforça a hipótese de que o alelo *frdB*-16 pode estar associado a cepas com CIM >256 µg/ml para ampicilina e que o complexo clonal 1355 possa estar ligado a cepas resistentes, a figura 8 esquematiza os ST encontrados no presente estudo juntamente com os já existentes no banco de dados.

A amostra P3232, proveniente de um caso de infecção urinária em um adulto no Rio de Janeiro, foi classificada dentre uma das novas sequências determinadas neste (ST2290), no entanto a mesma compartilha em seu perfil alélico o *fucK*-30, *mdH*-1, *pgI*-1 e *racA*-1 com o ST-422 já descrito e outros países, mas até então não identificado no Brasil, isto pode indicar que ambos os STs tem proximidade genética.

A análise de MST dos isolados do Brasil apresentada na Figura 11, sugere uma forte associação de cepas do sorotipo b com o ST6 que poderia ser chamado de CC6 reunindo 10 ST distintos com 4 ou mais alelos em comum, e de cepas HiNT aos CC1355 e CC70 que reúnem juntos 12 ST diferentes. É importante notar que já é possível observar um distanciamento de alguns ST a partir desses Complexos Clonais, em especial os ST2287, ST2291, ST2295 e ST2281 a partir do CC1355 e os ST65, ST2282, ST2294, ST2292, ST71, ST72 e ST76 a partir do CC70. No entanto apesar do distanciamento desses CC centrais, e da possibilidade de formação de novos CC, todos eles apresentam uma característica comum que é a presença apenas de cepas HiNT. Esses dados obtidos principalmente a partir dos isolados de portadores, sugerem uma característica clonal desse “sorotipo” que vem despontando como principal tipo entre as cepas isoladas de processos infecciosos e de portadores, mostrando seu potencial como uma possível linhagem epidêmica cuja circulação deve ser monitorada, conforme já reportado anteriormente (PAYNE et al., 2016; COLLINS et al., 2018). Cepas HiNT de origem clínica aparecem se distanciando do CC6 formado exclusivamente por cepas do sorotipo b, confirmando o que já foi relatado por estudos anteriores (TUYAMA et al., 2017). Esses dados mais uma vez mostram a expansão dos HiNT dentro dos isolados dessa espécie e consequentemente sua importância clínica e necessidade de controle.

A expansão das cepas NT a partir do CC6 formado exclusivamente por cepas do sorotipo b, mostra o potencial adaptativo dessa espécie, que ao mudar a bioquímica de sua

cápsula facilita o escape do sistema imune de indivíduos vacinados com a vacina anti Hib. É importante notar que o ST6 foi descrito pela primeira vez em 1974 com duas cepas b da Noruega e vem se mantendo com as cepas mais recentes isoladas em 2020 na França. Durante esse período várias cepas brasileiras foram depositadas com perfil alélico similar (1 ou 2 alelos diferentes do ST6) formando um grupo consistente. É importante notar que dentro do grupo de cepas do ST6, estão incluídas duas cepas Hib e Hib<sup>-</sup>, isoladas no Brasil em 2009 de sangue e LCR de um mesmo paciente com septicemia e meningite, podendo ser essa mais uma prova do processo de diferenciação das cepas sorotipo b que aparentemente se tornaram NT (BATALHA et al., 2010).

## 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 7.1 Conclusões

- A taxa de colonização *Haemophilus influenzae* em crianças e adolescentes foi de 55%, destas majoritariamente caracterizadas como HiNT, o que demonstra que os não-tipáveis ainda são um importante agente infeccioso, especialmente na primeira infância. Embora os HiNT sejam mais frequentes em crianças, foram os principais causadores de meningite e septicemia em adultos demonstrando a tendência deste microorganismo de provocar infecções invasivas nas faixas etárias mais elevadas. A expansão clonal das cepas HiNT mostra o potencial invasivo dessas cepas e sua adaptação para ocupar o nicho ecológico antes ocupado pelas cepas do sorotipo b. A Vigilância Epidemiológica dessas cepas é importante e vem sendo motivo de preocupação em outros países que adotaram com sucesso, a vacina anti Hib (PAYNE et al., 2016; COLLINS et al., 2018).
- O baixo índice do sorotipo b neste trabalho em conjunto com a literatura, demonstra a eficácia da vacina Hib mesmo após vinte anos de sua implantação no calendário vacinal infantil.
- Os antimicrobianos indicados no tratamento de doenças causadas por Hi apresentaram em sua maioria eficiência nos testes *in vitro*, especialmente a classe das quinolonas, permanecendo como opção para tratamento dessas doenças.
- A aplicação do CIM nos testes *in vitro* permitiu constatar que a maioria dos isolados apresentou resistência à ampicilina e a sulfametoxazol + trimetoprim, portanto, confirmando o que outros autores já haviam relatado é necessária vigilância da susceptibilidade destes fármacos. Juntamente, observou-se um discreto aumento na resistência à Amoxicilina+Ácidoclavulânico, o que é preocupante uma vez que esse fármaco é indicado para o tratamento de infecções provocadas por Hi.
- A maioria das cepas resistentes à ampicilina apresentaram produção de  $\beta$ -lactamase em conjunto com alterações no gene *ftsI* (BLPACR), as mesmas não foram consideradas resistentes à Amoxicilina+Ácidoclavulânico, com exceção de uma, o que indica que o principal mecanismo de resistência da maioria destas cepas ainda é a produção da enzima, no entanto, este dado demonstra que as cepas brasileiras estão desenvolvendo mutações no gene codificador da PBP3, o que pode num futuro torná-las resistentes a  $\beta$ -lactâmicos com

supressores da enzima, sendo a análise genética do gene *ftsI* de grande importância para a vigilância epidemiológica.

- O gene *bla<sub>TEM</sub>* foi detectado em 23,1% das amostras resistentes a ampicilina e Amoxicilina+Ácido clavulânico, enquanto o gene *bla<sub>ROB</sub>* não foi encontrado em nenhum isolado. Apenas uma amostra foi considerada BLNAR, ou seja, cepas não produtoras de β-lactamase mas resistentes a ampicilina, enquanto duas foram consideradas BLNACR.
- A tipificação molecular por MLST apontou a alta diversidade genética entre as estirpes HiNT. Os isolados não-tipáveis podem se comportar de maneira semelhante aos sorotipáveis quando estão em portadores saudáveis.
- Uma cepa isolada em 2001 em um caso de meningite no Rio de Janeiro pertence ao mesmo ST de uma cepa coletada de um portador assintomático na Bahia em 2011, o que indica que amostras capazes de provocar infecções invasivas podem ser encontradas em portadores.

Os dados discriminados no presente estudo indicam a necessidade de vigilância contínua e medidas para restringir o uso de possíveis antibióticos desnecessários ou pouco eficazes no tratamento dessas infecções. Desta forma, é de vital importância a análise molecular dos genes mediadores de resistência e da realização de testes *in vitro* para a determinação da susceptibilidade das cepas Hi por laboratórios clínicos e de pesquisa.

Com o alcance dos objetivos propostos concluímos este trabalho considerando-o como uma importante contribuição tanto para a Saúde Pública como para a Vigilância Epidemiológica e Sanitária, sendo este o segundo estudo no Brasil, que utilizou o MLST para a determinação do perfil epidemiológico dos isolados de *H. influenzae* no país, sobre tudo por ter realizado esta análise em amostras obtidas de casos clínicos, provenientes de diferentes estados, nos últimos dez anos, juntamente com isolados de crianças imunizadas com a vacina contra o Hib numa população fechada (creche), demonstrando a situação atual das cepas circulantes no país.

## 7.2 Perspectivas

- Realizar o MLST em amostras classificadas como sensíveis para obtenção de seus perfis alélicos e assim permitir uma comparação apurada com as cepas resistentes, de maneira que

seja possível determinar se alterações e seus alelos possa estar diretamente ligado a susceptibilidade destas cepas.

- Encontrar possíveis STs não descritos em cepas sensíveis.
- Aprofundar a análise do crescimento anormal da cepa P3844 na presença de trimetropim+sulfametaxazol.



## REFERÊNCIAS

- ADAM, H.J. *et al.* Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontario, Canada: evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. **Vaccine**, v.28, e.24, p.4073-8, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Antimicrobianos - Bases Teóricas E Uso Clínico: Cloranfenicol**. Brasília: ANVISA, 2018a. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/cloranfenicol.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/cloranfenicol.htm). Acesso: 11 set. 2018.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Antimicrobianos - Bases Teóricas E Uso Clínico: Quinolonas**. Brasília: ANVISA, 2018b. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/quinolonas.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/quinolonas.htm). Acesso: 11 set. 2018.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Antimicrobianos - Bases Teóricas E Uso Clínico: Sulfonamidas**. Brasília: ANVISA, 2018c. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/sulfonamidas.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/sulfonamidas.htm). Acesso: 11 set. 2018.
- ATAACK, J.M. *et al.* The HMW2 adhesin of non-typeable *Haemophilus influenzae* is a human-adapted lectin that mediates high-affinity binding to 2-6 linked N-acetyl neuraminic acid glycans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.503, p. 1103- 1107, 2018.
- BAMBERGUER *et al.* Pediatric Invasive *Haemophilus influenzae* Infections in Israel in the Era of *Haemophilus influenzae* Type b Vaccine. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 5, 2014.
- BATALHA, A. *et al.* Changes in *Haemophilus influenzae* capsule locus: possible emergence of novel variants in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, n. 2, p.97- 102, 2010.
- BERTRAND, S. *et al.* Evolutionary Changes in Antimicrobial Resistance of Invasive *Neisseria meningitidis* Isolates in Belgium from 2000 to 2010: Increasing Prevalence of Penicillin Nonsusceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p.2268-2272, 2012.
- BOGAERT, D. *et al.* Variability and Diversity of Nasopharyngeal Microbiota in Children: A Metagenomic Analysis. **Dynamics of Nasopharyngeal Microbiota in Infants**, v. 6, p. 1-8 2011.
- BRICKS, L.F. *et al.* Oropharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in healthy children from Taubaté (São Paulo), prior to the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program in Brazil. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 5, p. 236-243, 2004.
- BUTTLER, D.F.; MYERS, A.L. Changing Epidemiology of *Haemophilus influenzae* in Children. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 32, p. 119-128, 2018.

CALDEIRA, N.G.S. *et al.* *Haemophilus influenzae* serotype b and none ncapsulated invasive disease on a partially vaccinated child in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 655-657, 2013.

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

CARDINES, R. P. M. *et al.* Nontypeable *Haemophilus influenzae* Meningitis in Children: Phenotypic and Genotypic Characterization of Isolates. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 7, p. 577- 82, 2007.

CARVALHO, C. X. *et al.* Carriage of *Haemophilus influenzae* among Brazilian children attending day care centers in the era of widespread Hib vaccination. **Vaccine**, v. 29, n. 7, p. 1438-1442, 2011.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Changing Antimicrobial Susceptibility Patterns among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 2, p.91-8, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. ***Haemophilus influenzae* type b**. 2018. p. 14. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/hib.pdf>. Acesso: 14 maio 2018.

CERQUETTI, M.M. G.; CARDINES, R.P. M. First characterization of heterogeneous resistance to imipenem in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 9, p. 3155-61, 2007.

CHERKAOUI, A. *et al.* Molecular characterization of fluoroquinolones, macrolides, and imipenem resistance in *Haemophilus influenzae*: analysis of the mutations in QRDRs and assessment of the extent of the AcrAB-TolC-mediated resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, p. 2201-2210, 2018.

COLLINS, S. *et al.* *Haemophilus influenzae* type b (Hib) sero prevalence and current epidemiology in England and Wales. **Journal of Infection**. v.76, p. 335- 341, 2018.

CONNELL, M. A. *et al.* Invasive infections caused by *Haemophilus influenzae* serotypes in twelve Canadian IMPACT centers, 1996-2001. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 11, p. 1025-31, 2007.

CRIPPS, A. W., FOXWELL, R., KYD, J. Challenges for the development of vaccines against *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitidis*. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 553-557, 2002.

CRUCHAGA, S. *et al.* Molecular basis of rifampicin resistance in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1011-1014, 2003.

- DABERNAT H. *et al.* Diversity of  $\beta$ -Lactam Resistance-Confering Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 of *Haemophilus influenzae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2208-2218, 2002.
- DAS, B. K. *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae*. **Indian J Pediatr.**, v. 69, p. 775-777, 2002.
- DE ALMEIDA A.E.C.C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, n. 1, p. 57-62, 2006b.
- DE ALMEIDA, A. E. C. C. *et al.* Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. Brazilian. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 5, p. 777-781, 2005a.
- DEGHMANE, A.E. *et al.* High diversity of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in France and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by alteration of *ftsI* gene. **J Infect.**, v. 79, n. 1, p. 7-14, 2019.
- DOERN, G.V., CHAPIN, K.C. Determination of Biotypes of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* A Comparison of Methods and a Description of a New Biotype (VIII) of *H. parainfluenzae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 7, p. 269-272, 1987.
- DONG, Q. *et al.* Widespread of non-typeable *Haemophilus influenzae* with high genetic diversity after two decades use of Hib vaccine in China. **J Clin Lab Anal.**, v. 34, n. 4, p. 23145, 2020.
- DRAYß, M. *et al.* Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, Group A *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* among adults aged 65 years and older. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, e0212052, 2019.
- DU PLESSIS, M. *et al.* *Neisseria meningitidis* Intermediately Resistant to Penicillin and Causing Invasive Disease in South Africa in 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p.3208-3214, 2008.
- ELIAKIM-RAZ, N. *et al.* Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 979–996, 2015.
- EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST**. 2019. Disponível em: [https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf). Acesso: 11 abril 2019.
- EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature - Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire**. 2010. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso: 11 maio 2010.

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

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

FERNANDEZ, S.; CISNEY, E.D.; ULRICH, R.G. Enhancement of Serum and Mucosal Immune Responses to a *Haemophilus influenzae* Type B Vaccine by Intranasal Delivery. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 11, p.1690–1696, 2013.

FOXWELL, A.R.; KYD, J. M.; CRIPPS, A. W. Nontypeable *Haemophilus influenzae* Pathogenesis and Prevention. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.2, p. 294-308, 1998.

FUIJI, M. *et al.* Bacteremic renal stone-associated urinary tract infection caused by nontypeable *Haemophilus influenzae*: A rare invasive disease in an immunocompetent patient. **IDCases**, v. 7, p. 11-13, 2017.

GÁLAN, J.C. *et al.* *Haemophilus influenzae bla-ROB-1* Mutações em  $\Delta ampC$  *Escherichia coli* hipermutagênica, conferindo resistência à cefotaxima e aos inibidores da  $\beta$ -lactamase e aumento da suscetibilidade ao cefaclor. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 8, p.2551–2557, 2003.

GALLO, M.C. Changes in IgA Protease Expression Are Conferred by Changes in Genomes during Persistent Infection by Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Infection and Immunity**, v. 86, e00313-18, 2018.

GARCIA-COBOS, S. *et al.* Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for  $\beta$ -lactamase-negative amoxicilina-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p.2760-2766, 2008.

GIUFRÈ, M. *et al.* Identification of *Haemophilus influenzae* Clones Associated with Invasive Disease a Decade after Introduction of *H. influenzae* Serotype b Vaccination in Italy. **Clin Vaccine Immunol**, v.28, n. 8, p.1223–1229, 2013a.

GIUFRÈ, M. *et al.* Carriage of *Haemophilus influenzae* in the oropharynx of young children and molecular epidemiology of the isolates after fifteen years of *H. influenzae* type b vaccination in Italy. **Vaccine**, v.33, p.6227–6234, 2015b.

GRASS, S. *et al.* Structural Determinants of the Interaction between the TpsA and TpsB Proteins in the *Haemophilus influenzae* HMW1 Two-Partner Secretion System. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 10, p. 1769 -1780, 2015.

HAMMITT L.L. *et al.* Effect of *Haemophilus influenzae* type b vaccination without a booster dose on invasive *H. influenzae* type b disease, nasopharyngeal carriage, and population immunity in Kilifi, Kenya: a 15-year regional surveillance study. **Lancet Glob Health**, v.4, p.185-94, 2016.

HAN, M.S. *et al.* Increasing Prevalence of Group III Penicillin-Binding Protein 3 Mutations Conferring High-Level Resistance to Beta-Lactams Among Nontypeable *Haemophilus influenzae* Isolates from Children in Korea. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, 2019.

HANNA, J. *et al.* A Rapidly Fatal Infection With *Haemophilus influenzae* Serotype E Harboring bla<sub>ROB-1</sub>: The Dilemma of Safe De-escalation in the Setting of Potential Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 302, 2018.

HANSSON, S. *et al.* Urinary tract infection caused by *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in children. **Pediatric Nephrology**, v. 22, p.1321-1325, 2007.

HASHIDA, K. Nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* carriage in Japanese children attending day-care centers. **J ClinMicrobiol.**, v.46, p.876-881, 2008.

HÄUSER, S. *et al.* Capsule and fimbriae modulate the invasion of *Haemophilus influenzae* in a human blood-cerebrospinalfluid barrier model. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 829-839, 2018.

HEGSTAD, K. *et al.* Role of Horizontal Gene Transfer in the Development of Multidrug Resistance in *Haemophilus influenzae*. **MSphere**, v. 5, n. 1, e00969-19, 2020.

HELIODORO, C. *et al.* Molecular epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease in Portugal: an update of the post-vaccine period, 2011–2018. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, p. 1471-1480, 2020.

HOWIE, S R. C. The Effectiveness of Conjugate *Haemophilus influenzae* Type B Vaccine in The Gambia 14 Years After Introduction. **Effectiveness of Hib Vaccine in Gambia**, v. 57, n.11, p.1527-1534, 2013.

INADAN, N.M.D. *et al.* Infantile Acute Conjunctivitis Induced by  $\beta$ -Lactamase-Positive Amoxicillin-Clavulanate-Resistant Strain of *Haemophilus influenzae*: A Report of Three Cases. **Eye Contact Lens**, v. 45, n. 3, p.11-14, 2019.

JAIN, A. *et al.* High ampicillin resistance in different biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* colonizing the nasopharynx of healthy school-going Indian children. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 133-137, 2006.

JIN, Z. *et al.* *Haemophilus influenzae* Typea Infection and Its Prevention. **Infection and Immunity**, v.75, n.6, p.2650- 2654, 2007.

JORDENS, J.Z.; SLACK, M.P.E. *Haemophilus influenzae*: then and now. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. 935-948, 1995.

JOURDAIN, S. *et al.* Differences in nasopharyngeal bacterial carriage in preschool children from different socio-economic origins. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.6, p.907-14, 2011.

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

KELIES, H. *et al.* Invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany: impact of non-type b serotypes in the post-vaccine era. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, 2009.

KIEDROWSK, A. M. *et al.*  $\beta$ -Lactam resistance among *Haemophilus influenzae* isolates in Poland. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p.161-166, 2017.

KMETZCH, C.I. *et al.* Occurrence of *Haemophilus influenzae* B meningitis after the implementation of a mass vaccination program. **Journal Pediatrics**, v. 79, n. 6, p.530-6, 2003.

KONDO, H. *et al.* GyrA and/or ParC alterations of *Haemophilus influenzae* strains isolated from the urethra of men with acute urethritis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 3, p. 232-235, 2018.

KONEMAN, E.W. *et al.* *Haemophilus*. In: KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. 5th ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KONEMAN, E.W. *et al.* *Haemophilus*. In: KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. 6th ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2010.

KOSIKOWSKA, U. *et al.* Nasopharyngeal and Adenoid Colonization by *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in Children Undergoing Adenoidectomy and the Ability of Bacterial Isolates to Biofilm Production. **Medicine**, v. 94, n. 18, e799, 2015.

LANGEREIS, J.D., DE JONGE, M.I. Invasive disease caused by nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Emerg Infect Dis.**, v. 21, n. 10, p.1711-1718, 2015.

LEDEBOER, N.A., DOERN, G.V – *Haemophilus*. In: VERSALOVIC, James. **Manual of Clinical Microbiology**. 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2011. Cap.34, p.588-602.

LI, X. *et al.* Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance of *Haemophilus influenzae* in Adult Patients in Shanghai, China. **Frontiers Public Health**, v. 8, n. 95, p. 2885-2897, 2020.

LIDHANI, S. *et al.* Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996–2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 455-63, 2010.

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

LOPES, A.C. **Tratado de clínica médica**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Printice Hall, 2016. 608 p.

MAIDEN, M. C. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MANNHEIM, W. Family III. *Pasteurellaceae*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 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.

MEATS, E. *et al.* Characterization of Encapsulated and Noncapsulated *Haemophilus influenzae* and Determination of Phylogenetic Relationships by Multilocus Sequence Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p.1623–1636, 2003.

MEDEIROS, A.A.; O'BRIEN, T.F. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a TEM-type  $\beta$ -lactamase but little permeability barrier to ampicillin. **Lancet**, v. 1, p. 716-719, 1975.

MOHD-ZAIN, Z.; KAMSANI, N.H.; AHMAD, N. Molecular insights of co-trimoxazole resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated in Malaysia. **Trop Biomed.**, v. 30, n. 4, p. 584-90, 2013.

MOJGANI, N. *et al.* Biotyping, Capsular Typing, and Antibiotic Resistance Pattern of *Haemophilus influenzae* Strains in Iran. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 64, p. 66-68, 2011.

MOXON E.R., VAUGHN K.A. The Type b Capsular Polysaccharide as a Virulence Determinant of *Haemophilus influenzae*: Studies Using Clinical Isolates and Laboratory Transformants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 143, p. 517-524, 1981.

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

MUSSER, J.M. *et al.* Global Genetic Structure and Molecular Epidemiology of Encapsulated *Haemophilus Influenzae*. **Reviews of Infection Disiases**, v. 12, n. 1, p. 75-111, 1990.

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. 24, n. 6, p. 12-18, 1992.

NAITO, S. *et al.* Clinical and Bacteriologic Analysis of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Children with Invasive Diseases in Japan from 2008 to 2015. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 7, p.00141-18, 2018.

NOLTE, O. Rifampicin resistance in *Neisseria meningitidis*: evidence from a study of sibling strains, description of new mutations and notes on population genetics. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p.747-755, 1997.

O'CALLAGHAN, C.H., MORRIS, A., SHINGLER, A.H. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 1, n. 4, p. 283-288, 1972.

PAYNE, K.T. *et al.* Children with *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine failure have long-term bactericidal antibodies against virulent Hib strains with multiple capsular loci. **Vaccine**, v. 34, p. 3991-3934, 2016.

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

PORRAS, O. *et al.* Difference in structure between type b and nontypable *Haemophilus influenzae* populations. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 79-89, 1986.

PUIG, C. *et al.* Oropharyngeal Colonization by Nontypeable *Haemophilus influenzae* Among Healthy Children Attending Day Care Centers. **Microbial drug resistance**, v. 20, n. 5, p. 236-43, 2014.

PUIG, C. *et al.* Clinical and Molecular Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Causing Invasive Disease in Adult Patients. **PLOS ONE**, v. 9, p. 01-07, 2014.

RESMAN, F. *et al.* Invasive disease caused by *Haemophilus influenzae* in Sweden 1997-2009; evidence of increasing incidence and clinical burden of non-type b strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 11, p. 1638-1645, 2011.

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

SACCHI, C.T. *et al.* High Level of Sequence Diversity in the 16S rRNA Genes of *Haemophilus influenzae* Isolates Is Useful for Molecular Subtyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3734-3742, 2005.

SANBONGI, Y. *et al.* Molecular Evolution of  $\beta$ -Lactam-Resistant *Haemophilus influenzae*: 9-Year Surveillance of Penicillin-Binding Protein 3 Mutations in Isolates from Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7 p. 2487-2292, 2006.

SHARMAN, A. *et al.* Subtype distribution of *Haemophilus influenzae* isolates from North India. **Journal of medical microbiology**, v. 51, n. 5, p. 133-37, 2002.

SHUEL, M.L., TSANG, R.S. Canadian beta-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.

SILVA, M.E.B.; MARIN, J.M. An epidemiological study of *Haemophilus influenzae* in a Brazilian day care center. **Brazilian Journal Infection Dis.**, v. 5, p. 260-8, 2001.



- SKAARE, D. *et al.* Multilocus sequence typing and *ftsI* sequencing: a powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae*. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 131, 2014.
- SOLEY, C. *et al.* An Open-label, Double Tympanocentesis, Single-Center Study of Trimethoprim Sulfamethoxazole in children with Acute Otitis Media. **Lippincott Williams & Wilkins**, v. 26, p. 273-274, 2007.
- SØNDERGAARD, A. *et al.* Interspecies Transfer of the Penicillin-Binding Protein 3-Encoding Gene *ftsI* between *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* Can Confer Reduced Susceptibility to  $\beta$ -Lactam Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4339-4342, 2015.
- TAHA, M.-K. *et al.* Multicenter Study for Defining the Breakpoint for Rifampin Resistance in *Neisseria meningitidis* by *rpoB* Sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3651-3658, 2010.
- TANAKA, E. *et al.* First outbreak of *Haemophilus influenzae* clone ST422 with low susceptibility to quinolones in paediatric patients in Japan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 239-243, 2020.
- TENG, L. J. *et al.* Serotypes, biotypes, and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. **Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 22, p. 68-74, 1989.
- TENOVER, F.C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin Microbiol.**, v. 33, p. 2233-9, 1994.
- THORNSBERRY, C.; KIRVEN, L.A. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as determined by a rapid test for  $\beta$ -lactamase production. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 6, p. 653-654, 1974.
- TSANG, R. S.W. *et al.* Antibiotic susceptibility and molecular analysis of invasive *Haemophilus influenzae* in Canada, 2007 to 2014. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, e.5, p. 1314–1319, 2017.
- TUYAMA, M. *et al.* Invasive *Haemophilus influenzae* disease in the vaccine era in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 192-202, 2017.
- UBAKATA, K. *et al.* Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 45, p. 1693-9, 2001a.
- UBUKATA, K. *et al.* Differentiation of  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by a disc method. **J Infect Chemother.**, v. 8, p. 50-58, 2002b.
- VAN KETEL, R., J.; WEVER, B.; VAN ALPHEN, L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. **Journal of Medical Microbiology**, v. 33, p. 271-276. 1990.

VIRKOLA, R. Interaction of Fimbriae of *Haemophilus influenzae* Type B with Heparin-Binding Extracellular Matrix Proteins. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5696-5701, 2000.

WANG, H. J. *et al.* Antibiotic Resistance Profiles of *Haemophilus influenzae* Isolates from Children in 2016: A Multicenter Study in China. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2019, p. 6, 2019.

WANG, X. L. *et al.* Nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates from the Lower Respiratory tract in Western Sichuan, China: Antimicrobial susceptibility and Mechanism of beta-lactam Resistance and decade changes. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 324-330, 2019.

YANG, P.; ZHANG, J.; PENG, A. The pharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* among healthy population in China: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 547, p. 547, 2019.

ZANELLA, R. C. *et al.* Evaluation of *Haemophilus influenzae* type b carrier status among children 10 years after the introduction of Hib vaccine in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p.755-759, 2015b.

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

ZHU, H. *et al.* Nasopharyngeal carriage and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* among children younger than 5 years of age in Beijing, China. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 6, 2015.