

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E  
SAÚDE PÚBLICA

Frederico Mendes Machado Neto

Prevalência e tipagem molecular da cápsula  
de *Haemophilus influenzae*  
isolados da nasofaringe de crianças pós-introdução  
da vacina Hib-conjugada no município de Goiânia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E  
SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA TROPICAL

Frederico Mendes Machado Neto

Prevalência e tipagem molecular da cápsula  
de *Haemophilus influenzae*  
isolados da nasofaringe de crianças pós-introdução  
da vacina Hib-conjugada no município de Goiânia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta

**Dissertação submetida ao  
CPGMT/IPTSP/UFG como requisito pra a  
obtenção do Grau de Mestrado na área de  
concentração em Microbiologia**

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2005

## Dedicatória

No livro de fantasia, *Phantom Tollboth*, de Norton Juster, um livro da literatura infantil inglesa, o herói, Milo tem que realizar uma grande tarefa. No final de sua jornada atribulada, um dos prêmios que ele recebe é a revelação de um segredo que lhe foi omitido no começo de sua caminhada: a tarefa que ele realizou era impossível de ser feita, ninguém poderia realizá-la. Mas ninguém lhe disse isso, e ele conseguiu.

Esse é um trabalho de dissertação de mestrado, também foi uma jornada atribulada, que hoje, a razão diria que não poderia ser feita da maneira que foi. Mas todas pessoas que me amavam, mais do que omitirem o “segredo”, me incentivaram com a certeza que tudo poderia ser feito. Essa foi a nossa jornada, nosso trabalho.

Assim esse trabalho é dedicado a:

Deus que me amou antes que eu pudesse conhecê-lo, e me abençoou todos os dias da minha vida. A Ele que é o alfa e ômega, o amor, o cuidado, a paz, a luz, a misericórdia. Ao Senhor Jesus, o único Caminho, a Verdade e a Vida.

Aos meus pais, Mendes e Araci, que são provas vivas do amor de Deus por mim. Eles fizeram muito mais do que as palavras criar, ensinar e educar, podem expressar. Eles se tornaram exemplos de amor incondicional, de integridade, dignidade, carinho, bondade, retidão, humildade e da vitória. Vocês são a minha inspiração, os meus maiores e mais preciosos valores. A vocês, todo o amor e honra que um filho pode retribuir a seus pais.

À minha esposa, Daiane a gratidão pelas horas, dias e semanas de ausência. Esse trabalho é seu tanto, quanto eu sou. Palavras não expressam nosso amor, carinho e bênçãos de Deus na nossa vida.

Ao meu Avô Frederico, que me deixou muito mais do que o nome, deixou seu legado e sua herança de liberdade e vontade de viver.

Às minhas avós Mariquinha e Deigenetrix, guerreiras vitoriosas, mães afetuosas, avós iluminadas pela sabedoria e compreensão da palavra família.

À Adriana e Lucas, irmãos que Deus colocou no meu coração como símbolos de esperança num futuro melhor.

Aos meus tios: Gerson, Ozias, Madalena, Aparecida, Gedeon, Noêmia, Célia, que cuidaram de mim de tantas formas que cada vitória minha também sempre será deles.

Aos meus primos Leonardo, Gabriela, Renata, Éder, Ellen, Lucas Diogo e Alan, que sempre estiveram onde eu mais precisava.

A amigos como Artur e Delúbio que simbolizam todos os significados da palavra amizade.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Fabiana Cristina Pimenta, quem eu considero minha irmã de coração, por ter me acolhido, e ensinado com paciência e motivação, alguns caminhos que nos levam ao mundo infinito e belo da Microbiologia e da vida. Uma das melhores definições de graça é uma dádiva, presente ou ação concedida a pessoa imerecida. E eu achei graça diante de você.

Ao Professor Cleomenes Reis, o mestre, o conhecimento, as piadas e a alegria. É um privilégio chamá-lo de Professor Padrinho.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia S. S. Andrade, coordenadora do projeto de Vigilância de Pneumonias e Meningites (VIGPEM), que com seu arrojo, organização e dedicação, compartilhou e realizou um sonho com todos nós.

À Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Brandileone, uma agente da história da microbiologia em nosso país e no mundo, e toda equipe do Instituto Adolf Lutz, pelo suporte técnico, competência e pioneirismo foram determinantes e fundamentais em todas as etapas do trabalho.

Aos professores do mestrado, que não só multiplicaram o conhecimento, multiplicaram o respeito, a admiração e o carinho.

A todos do Programa de Pós-Graduação do IPTSP, que sempre demonstraram, em todos os momentos, eficiência, solicitude e prazer nos mínimos detalhes.

À Leda Maria Valadão, pela sua presteza, conselhos e sorriso de encher um coração de felicidade, e minhas madrinhas Juliana Lamaro e Cristiane Benício, a quem devo muito mais que minha amizade.

As minhas irmãs do laboratório, que contribuíram muito, tanto com a capacidade técnica, quanto com a capacidade humana: Lara Stefânia Netto, Daniela Vilela Lima, Renata Silva, Alessandra Marques Cardoso, Patrícia Anders, Ana Cláudia Campos, Thaís Teixeira Fernandes, Mirian Borges, Renata Souza, Luciana Zamalloa.

**MUITO OBRIGADO A TODOS!**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
APRESENTAÇÃO.....	1
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Infecções microbianas.....	7
1.2. Agente etiológico .....	7
1.3. Fatores de virulência.....	9
1.3.1 <i>H. influenzae</i> capsulado.....	9
1.3.2 <i>H. influenzae</i> não-capsulado (NC) ou não tipável (NTHi) .....	11
1.3.3 Pili, fímbrias, e biofilme.....	13
1.3.4 Resistência aos antimicrobianos.....	14
1.4. Tipagem capsular .....	17
1.4.1 Tipagem capsular por técnicas de aglutinação em lâmina.....	17
1.4.2 Tipagem capsular pela da técnica de PCR.....	18
1.4.3. Comparação da tipagem capsular do pelas técnicas de aglutinação em lâmina e pela técnica de PCR.....	20
1.5. Epidemiologia.....	24
1.5.1 Infecções respiratórias agudas em crianças e o <i>H. influenzae</i> .....	26
1.5.2 Meningites em crianças e <i>H. influenzae</i> .....	29
1.6 A vacina Hib-conjugada.....	32
1.7 Impacto da introdução da vacina Hib-conjugada.....	34
1.7.1 Eficácia da vacina Hib-conjugada.....	34
1.7.2 Falhas vacinais e emergência dos tipos não-b.....	37
1.8 Introdução da vacina Hib-conjugada no Brasil.....	40
1.9 Introdução da vacina Hib-conjugada em Goiânia.....	41

2	Objetivos.....	44
3	Materiais e Métodos.....	45
3.1.	Área de estudo e população.....	45
3.2	Coleta das amostras.....	46
3.2.1	Coleta de swabs nasofaríngeos.....	46
3.3	Isolamento e identificação.....	47
3.3.1	Prova do satelitismo.....	47
3.3.2	Provas de fermentação de carboidratos.....	48
3.3.3	Produção de urease e indol.....	49
3.3.5	Descarboxilação da ornitina.....	49
3.4	Teste de suscetibilidade.....	50
3.4.1	Preparação do Meio <i>Haemophilus</i> de Teste (MTH).....	50
3.4.2	Difusão em disco.....	50
3.5	Tipagem capsular pela PCR.....	50
4.	Referências Bibliográficas.....	53
	ARTIGO.....	74
	Resumo.....	75
	Abstract.....	77
	Introdução.....	79
	Materiais e Métodos.....	82
	Resultados.....	85
	Discussão.....	85
	Conclusão.....	89
	Referências Bibliográficas.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na PCR para o gene <i>bexA</i> e os tipos capsulares.....	100
Tabela 2: Tipagem capsular pela PCR dos 118 isolados de <i>H.</i> <i>influenzae</i> .....	101
Tabela 3: Estado clínico das 118 crianças	102
Tabela 4: Perfil de suscetibilidade dos 118 de <i>H. influenzae</i> isolados de nasofaringe.....	103

**ABREVIATURAS**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATP – Adenosina Trifosfato  
BLNAR - Beta-Lactamase Negativa Ampicilina Resistente  
BLPAR - Beta-lactamase Positiva Ampicilina Resistente  
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*  
CIE - Contra-Imunoelektroforese  
CRM<sub>197</sub> - Cepa Mutante de *Corynebacterium diphtheriae*  
CONEP - Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa  
EUA - Estados Unidos da América  
HbOc – Vacina Hib-conjugada com toxina diftérica alterada  
Hia - *Haemophilus influenzae* tipo a  
Hib- *Haemophilus influenzae* tipo b  
Hie - *Haemophilus influenzae* tipo e  
Hif - *Haemophilus influenzae* tipo f  
HMI - Hospital Materno Infantil  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IgA – Imunoglobulina A  
IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública  
IRA – Infecção Respiratória Aguda  
ITRI - Infecção do Trato Respiratório Inferior  
LOS - Lipooligosacarídeos  
LPS – Lipopolissacarídeos  
MTH - Meio *Haemophilus* de Teste  
NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo  
NC - *Haemophilus influenzae* Não Capsulado ou Não Tipável  
NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*  
NTHi - Não Tipável *Haemophilus influenzae*  
NF – Nasofaringe  
OMP – Proteínas da Membrana Externa

PAHO – Organização Pan Americana de Saúde  
PBP - Proteínas Ligadoras de Penicilinas  
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia  
pMBA - Caso Provável de Meningite Bacteriana  
PRP-D – Vacina Hib-conjugada com toxóide diftérico  
PRP – Polirribose Ribitol Fosfato  
PRP-OMP - Vacina Hib-conjugada com complexo protéico da membrana externa da *Neisseria meningitidis*  
PRP-T – Vacina Hib-conjugada com toxóide tetânico  
Rd – Primeira cepa de *H. influenzae* cujo genoma foi seqüenciado  
TLR – Receptores *toll-like*  
Tn – Elemento de DNA móvel  
ufc – Unidades Formadoras de Colônias  
UFG - Universidade Federal de Goiás  
W.D.C. – Washington Capital  
WHO – *World Health Organization*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na PCR para o gene <i>bexA</i> e os tipos capsulares.....	100
Tabela 2: Tipagem capsular pela PCR dos 118 isolados de <i>H.</i> <i>influenzae</i> .....	101
Tabela 3: Estado clínico das 118 crianças	102
Tabela 4: Perfil de suscetibilidade dos 118 de <i>H. influenzae</i> isolados de nasofaringe.....	103

## 1.1 Apresentação

### Por quê estudar a prevalência de *Haemophilus influenzae* isolados da nasofaringe de crianças?

As infecções, principalmente as infecções respiratórias agudas (IRA) e meningites, configuram um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo. Os números alarmantes representam aproximadamente dois milhões e duzentas mil mortes anuais, sendo que 70% destes casos concentram-se na África Sub-Saariana, onde a meningite é endêmica, e no Sudeste asiático, especialmente no Paquistão, cuja mortalidade por IRA é responsável direta por aproximadamente 30% dos óbitos em crianças menores de cinco anos, e nas Filipinas que apresenta uma incidência de meningite de 95 casos por 100.000 habitantes ao ano (Limcangcoo et al., 2000; WHO, 2002b; Rudan et al., 2003; Lanata et al., 2004; Khan et al., 2004).

Os principais agentes etiológicos bacterianos associados com episódios de IRA são os *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis* e *Staphylococcus aureus*. Em virtude da severidade dos problemas decorrentes da IRA, ressalta-se os esforços de organizações relacionadas à saúde, distribuídas em todo mundo, visando à implementação de medidas de prevenção e controle desse quadro (Doern et al., 1997; Thornsberry, et al., 1999; Yano et al., 1999; Peltola, 2000; Chambers, 2001; Debbia et al., 2001; McIntosh, 2002 Masuda et al., 2002; Willians et al., 2002; Rudan et al., 2003; Uno, 2003; Lakhanpaul et al., 2004; Lanata et al., 2004; Numazaki et al., 2004).

Já dentre as meningites bacterianas, em torno de 80% dos casos estão distribuídos entre o *H. influenzae*, *S. penumoniae* e a *Neisseria meningitidis*. O rápido desenvolvimento da morbidade, muitas vezes com seqüelas neurológicas graves, exige um diagnóstico rápido e confiável, implicando em um tratamento imediato e eficiente (Tikhomirov et al., 1997; Gebremariam, 1998; Rosenstein, 2001).

Entre os agentes etiológicos relacionados com IRA e meningite, o *H. influenzae* destaca-se por sua alta prevalência em crianças entre 0 a 5 anos. Dentre os seis tipos

capsulares existentes, o tipo b, é responsável por aproximadamente 900 mil mortes ao ano (Shann & Steinhoff, 1999). Uma das medidas profiláticas mais efetivas, aplicada nesse contexto, é a utilização de vacinas. Entretanto, mesmo com o grande avanço nos campos da vacinologia e epidemiologia, desconhece-se os mecanismos intrínsecos e extrínsecos precisos, que condicionam a redução da colonização pelos tipos contidos nas vacinas. As observações a partir da implementação da vacina conjugada para o *H. influenzae* tipo b (Hib), vem demonstrando a substituição desse tipo capsular, o que altera o perfil das infecções por esse agente. Desta forma, ocorre uma supressão do Hib, anteriormente predominante, permitindo a proliferação de outros tipos, antes minoritários. Além disso, em análises moleculares do *H. influenzae* foram identificadas também cepas tipo b que apresentavam uma alteração na estrutura capsular, o que poderia configurar uma resposta à pressão seletiva exercida pela vacina (Kroll et al., 1988; Falla et al., 1994; Klein 1995; Saltola et al., 2003).

Observa-se atualmente, a necessidade crescente de se estabelecer a relação entre bactérias colonizadoras da nasofaringe (NF), como o *H. influenzae*, e as que causam morbidades como IRA, pneumonia e meningite. Os dados e resultados de diversos estudos epidemiológicos indicam que bactérias invasivas provêm da microbiota colonizadora, aferindo-se que o estado de portador é relevante na cadeia dos eventos para se estabelecer à infecção. Estas análises são possíveis devido à utilização das técnicas de tipagem molecular, que fornecem informações valiosas e elucidativas sobre a disseminação das bactérias da NF para outros sítios, como também a transmissão de pessoa a pessoa, especialmente em creches, ambulatórios e hospitais (Kauppi et al., 1993; Klein, 1995; Tenover et al., 1995; Peerbooms et al., 2002; Campos et al., 2003b; Campos et al., 2004).

A tipagem molecular ou genotipagem de isolados de *H. influenzae*, coletados a partir da nasofaringe, pode fornecer dados epidemiológicos importantes para o direcionamento de medidas profiláticas, e de tratamento específico para crianças com morbidades causadas por este agente (Falla et al., 1994, Sunit et al., 2002; LaClaire et al., 2003; Saltola et al., 2003; Bruun et al., 2004; Ishiwada et al., 2004; Kalmusova et al., 2004).

No ano de 1999, a vacina conjugada Hib foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações, integrando-se a agenda de vacinação adotada em todo Brasil, para menores de 2 anos. Em Goiânia, em 2000, foi instituído um programa de vigilância para monitorar casos de meningites e pneumonias causados por *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, em crianças com a idade entre 0 a 5 anos, com o objetivo de avaliar a efetividade da vacina, bem como, seu impacto neste cenário (Caetano, 2001).

Este sistema de vigilância epidemiológica, é um dos componentes de um projeto maior de investigação, que vem sendo apoiado pela divisão de imunização e vacinas da *Pan American Health Organization* (PAHO) – W.D.C. e pelo *Bill and Melinda Gates Children's Vaccine Program*, em conjunto com a Secretaria de Saúde do Estado de Goiás e Secretaria de Saúde do Município de Goiânia. Este sistema agregou 20 hospitais pediátricos do município, correspondendo a cerca de 85,0% das admissões por pneumonia e meningites em Goiânia (Caetano, 2001).

A genotipagem pela técnica de PCR, padrão ouro para a tipagem capsular deste patógeno, avança por permitir a observação da disseminação dos tipos de *H. influenzae* pós-introdução da vacina Hib. Em diversas partes do mundo, a tipagem capsular de *H. influenzae* pela PCR foi implantada garantindo resultados confiáveis, os quais são necessários nos levantamentos epidemiológicos, especialmente no que tange aos tipos circulantes pós-introdução da vacina Hib-conjugada. Além disso, visam determinar o perfil de resistência aos antibacterianos, e identificar outros fatores de virulência desses tipos, que certamente interferem no cenário de morbidades e mortalidades (Acar, 1999; Mitsuda et al., 1999; Molina et al., 2002; Peerboms et al., 2002; Galan et al., 2003; Daines et al., 2004; Luong et al., 2004).

O levantamento e análise desses dados, poderão contribuir para a implementação de medidas e ações dentro da cadeia epidemiológica, permitindo um monitoramento mais preciso e real, do impacto da introdução da vacina Hib conjugada em Goiânia. Esses dados fundamentados na tipagem capsular pela técnica de PCR, permitem ainda, uma correlação com os resultados obtidos em outras regiões do nosso país, como também em outros países.

Este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira corresponde a uma **Introdução** na qual aborda-se as características do *H. influenzae*, métodos de tipagem capsular, impacto das vacinas conjugadas e seus potenciais efeitos na taxa de portador e **Materiais e Métodos** empregada para o isolamento e tipagem do *H. influenzae*. A segunda parte, sob forma de **artigo científico**, apresenta os **Resultados, Discussão e Conclusão**, relacionada ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e identificação dos tipos circulantes, determinados pela técnica de PCR, prevalentes de isolados da nasofaringe de crianças.

## Resumo

**Antecedentes:** A microbiota da nasofaringe (NF) de crianças é o principal reservatório ecológico do *Haemophilus influenzae*, que em seu estado portador, configura um importante papel na disseminação da bactéria. Em Goiânia após a introdução da vacina Hib-conjugada, em julho de 1999, a incidência de casos de meningites, passou de  $10,8 \times 10^5$ , para  $2,3 \times 10^5$  habitantes, em 2001. **Objetivos:** Determinar a prevalência de *H. influenzae*, em amostras de NF de crianças menores de cinco anos; avaliar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *H. influenzae* a dois antimicrobianos; e caracterizar os isolados de *H. influenzae* pela tipagem molecular da PCR. **Material e Métodos:** De maio de 2000 a agosto de 2001, foram coletados swabs da nasofaringe de 648 crianças menores de 5 anos, onde, 269 estavam com IRA, incluindo-se pneumonia, 77 com meningites e 302 crianças saudáveis. Realizou-se o cultivo das amostras em ágar chocolate e posteriormente os isolados foram identificados de acordo com os procedimentos recomendados, e o perfil de resistência foi determinado para trimetoprim-sulfametaxazol (TMP-SMX), e ampicilina (AMP). A tipagem capsular foi realizada pela técnica de PCR. **Resultados:** A prevalência de *H. influenzae* foi de 18,2% (118 isolados) na NF de crianças. O resultado da tipagem pela PCR caracterizou 3 Hib (2,5%), 1 Hia (0,8%), 2 Hif (1,7%) e 112 NC (94,9%). Os Hib foram isolados de uma criança com IRA, outra com pneumonia e a última com meningite. O Hia foi isolado de criança com IRA. Os tipos Hif foram isolados de uma criança com IRA e outra com pneumonia. Das crianças as quais se isolaram os tipos NC, 11 (9,8%) apresentavam-se saudáveis, 81 (72%) apresentavam algum quadro de IRA, 3 (2,7%) apresentavam meningite e 17 (15,2%) pneumonia. Dos 112 tipos NC, 35 (31,3%), e todos Hia e Hif mostraram-se resistente apenas ao TMP-SMX, mas sensíveis a AMP, e 8 (7,1%) NC foram resistentes a AMP. Todos Hib, foram sensíveis AMP e ao TMP-SMX. **Conclusão:** Observou-se uma diminuição na taxa de prevalência do Hib, na nasofaringe de crianças menores de cinco anos, assim como uma emergência dos tipos NC, pós-introdução da vacina Hib-conjugada, fato que deve ser monitorado por programas de vigilância epidemiológica.

## ABSTRAC

**Background:** *Haemophilus influenzae*, especially type b (Hib), that in his state carriage configures an important reservoir, acting in the dissemination of the bacterium. In Goiania after the introduction of the vaccine Hib-conjugated, in July of 1999, the incidence of cases of meningites, passed from  $10.8 \times 10^5$ , to  $2.3 \times 10^5$  inhabitants, in 2001. **Objective:** To determine the prevalence of *H. influenzae*, PCR capsular type and profile of susceptibility, in samples from nasopharyngeal of healthy infants or with some acute respiratory infection (ARI), or meningitis, post-introduction of the vaccine Hib-Conjugated, in the town of Goiânia. **Materials and Methods:** From May of 2000 to August of 2001, were collected swabs of the nasopharyngeal of 648 infants less than 5 years, where, 269 were with ARI, including itself pneumonia, 77 with meningitis and 302 healthy infants. It carried out cultivated of the samples in chocolate agar supplemented with bacitracina and subsequently the isolated were identified agreement with the procedures recommended, and the profile of susceptibility was determined for trimethoprim-sulfametaxazole (STX) and ampicillin (AMP). The molecular typing capsular was carried out by the technical of the PCR. **Results:** The prevalence of *H. influenzae* was of 18,2% (118) in the nasopharygeal. Agreement with to typing capsule by PCR. Three(2,5%) isolates of the *H. influenzae* were identified like Hib, one isolate was characterized like Hia (0,8%), two (1,7%) were identified like Hif, and 112 (94,9%) were characterized like *H. influenzae* noncapsulados (NC). Regarding the clinical status of the infants, the Hib b were isolated from cases of meningite (n=1), ARI (n=1) and pneumonia (n=1), the Hia from case of ARI, the Hif from case of IRA, and the NC, 11 (9.8%) from healthy children; 81 (72.3%) from cases of IRA; 3 (2,7%) from cases of meningits and 17 (12.2%) from case of pneumonia. Of the 112 NC, 35 (31,3%), and the kinds capsulates to and f showed itself resistant barely to the (STX) and sensible to AMP. Eight (7,1%) *H. influenzae* NC presented resistance to ampicillin. The Hib, were sensible ampicilina and STX. **Conclusion:** It was verified a reduction in the prevalence of the *H. influenzae* type b, in the nasopharyngeal of infants less than five years, with an emergency of the types NC, post-introduction of the vaccine Hib-conjugated, fact that should be monitored by programs of epidemiological surveillance.

## **1. Introdução**

### **1. Infecções microbianas**

As doenças infecciosas constituem uma das maiores causas de morbidades e mortalidades em todas faixas etárias, em especial, para crianças menores de cinco anos. Muitas dessas mortes são perfeitamente evitáveis, a partir da implementação de ações profiláticas, que vão desde as melhorias nas condições sócio-educacionais e a utilização de esquemas vacinais, até estabelecimento de uma estrutura eficiente dos sistemas de saúde, capazes de diagnosticarem e determinarem a terapêutica apropriada (WHO, 2002b; CDC, 2004; Berkley et *al.*, 2005).

Exatamente nesse contexto relacionado à capacidade de diagnosticar e determinar o tratamento apropriado das infecções que ocorrem em crianças, aplica-se os conhecimentos da epidemiologia e microbiologia. A soma desses conhecimentos, aliados a análise de vários fatores de risco para cada agente infeccioso (seja de origem viral, bacteriano ou fúngico, por exemplo), e sua interação com o sistema imunológico, além de possíveis agravamentos como seqüelas e morte, são vitais para a compreensão do papel de cada patógeno no desencadeamento das infecções microbianas (Brunham et *al.*, 1993; Robbins et *al.*, 1995; Behrman & Kliegman, 1999; Moxon & Murphy, 2000; O'Brien 2001; Peerboms et *al.*, 2002; Greenberg et *al.*, 2004).

### **1.2. Agente etiológico**

O *H. influenzae* é uma bactéria Gram-negativa, que geralmente se apresenta em formas de cocobacilo, em bastão ou cocóides, não formadora de esporos, imóvel, pleomórfica, fastidiosa, e anaeróbia facultativa. Ao microscópio óptico observa-se cocobacilos com dimensões variando entre 0,2 a 0,8µm. Pertence à família Pasteurellaceae,

incluindo também os gêneros *Pasteurella* e *Actinobacillus*. As formas não encapsuladas são bastante heterogêneas e, frequentemente apresentam pili e fímbrias (Musher, 1983).

O cultivo da bactéria pode ser realizado utilizando-se o meio de Levinthal, ágar chocolate {base de ágar BHI (*brain heart infusion*)} suplementado com sangue de carneiro. Na preparação do ágar chocolate, o meio de cultura deve ser submetido a aquecimento em banho-maria a 80°C, para o rompimento das células com a liberação dos fatores X (hemina) e V (nicotinamida adenina nucleotídeo, NAD), presentes no sangue. A temperatura ideal para o cultivo da bactéria, está entre 35-37°C, com um pH ótimo de 7,6, e tensões de CO<sub>2</sub> de 5,0% (WHO, 1999; CDC, 2004; Todar, 2004).

As principais formas de identificação fenotípicas para o gênero *Haemophilus* consiste em testes bioquímicos, a partir das provas de fermentação dos seguintes carboidratos: glicose, lactose, sacarose, xilose e manose. O *H. influenzae* fermenta a glicose e xilose. Para a verificação da necessidade dos fatores de crescimento V (NAD) e X (hemina) realiza-se a prova de satelitismo em ágar sangue, repicando-se o isolado juntamente com uma estria de *S. aureus*. Os isolados de *H. influenzae* só se desenvolvem na placa de ágar sangue de forma satélite, em torno do *S. aureus*, que libera os fatores X e V, necessários para o desenvolvimento da bactéria (WHO, 1999; ANVISA, 2004).

Também é realizado as provas da descarboxilação da ornitina, produção de urease e indol a partir de triptofano. Com o resultado dessas provas bioquímicas, os isolados de *H. influenzae* são agrupados em oito biotipos, de acordo com classificação proposta por Killian, em 1976 (Killian, 1976). Alguns desses biotipos são marcadamente associados a alguns tipos de infecções ou presentes em alguns sítios. O *H. influenzae*, biotipo I, é frequentemente isolado em casos de doença sistêmica, o biotipo IV está associado ao trato urogenital (sendo que entre 82 a 94% desse biotipo é isolado nesse sítio), e o biotipo III está correlacionado com conjuntivite. A média de prevalência de isolados encontrados nos casos de meningites, está distribuída entre os biotipos I (41-45%) e II (55-58%) (Bajanca et al., 2004; Campos et al., 2004; Erwin et al., 2005).

### 1.3. Fatores de virulência

Um dos mais importantes fatores de virulência, apresentados pelo *H. influenzae*, está relacionado à presença da cápsula. De acordo com classificação proposta por Pittman em 1931, todas as cepas encapsuladas podem ser classificadas em seis diferentes tipos (a, b, c, d, e, f), baseados nas diferenças da composição bioquímica dos polissacarídeos da cápsula e reações imunológicas (Pittman, 1931). Já as formas de *H. influenzae* que não apresentam a cápsula polissacarídica, são conhecidos como *H. influenzae* não tipável (NTHi) ou não capsulado (NC) (Foxwell et al., 1998; Rodriguez et al., 2003).

#### 1.3.1 *H. influenzae* capsulado

A importância e relevância do *H. influenzae* como patógeno de diversas morbidades e mortalidade, foi objeto de inúmeros estudos e pesquisas realizadas em vários momentos, que historicamente datam do final do século XIX (Tognoli, 2003). Já nos estudos de Margaret Pittman em 1931, observou-se que vários isolados eram provenientes de casos clínicos, obtidos de pacientes com meningite, septicemias associadas a quadros de pneumonia e artrite associada a quadro de meningite. Na descrição da classificação proposta para esse patógeno, destaca-se que a maioria dos isolados obtidos nos casos de pneumonia, e todos os isolados obtidos em pacientes com meningite, eram do tipo b (Hib), evidenciando-se desde dessa época, a prevalência desse tipo capsular nos casos de infecção invasiva, especialmente pneumonia e meningite (Pittman, 1931). No entanto, somente em 1942 caracterizou-se seu antígeno polissacarídeo capsular como sendo uma polirribose ribitol fosfato (PRP), determinante como fator de virulência responsável pela inibição da capacidade fagocitária de macrófagos (Murphy & Apicela, 1987).

Entre os tipos encapsulados, a porcentagem de isolamento na nasofaringe é dependente do tipo capsular: em torno de 5 % para os tipos c-d, e em até 20%, dependendo da região geográfica, distribuída entre os tipos a, e, f. Apesar do índice de isolamento na

nasofaringe do Hib ser de aproximadamente 40%, ele é responsável por 80-95% das infecções invasivas, causadas pelo *H. influenzae* (Booy & Kroll, 1997).

O material capsular interfere na fagocitose, constituindo uma importante propriedade antifagocitária, auxiliando na invasão de outros sítios, além de permitir uma interação com as células do epitélio, favorecendo sua colonização. Essa estrutura capsular composta por carboidratos, apresenta também como característica intrínseca, uma baixa antigenicidade, que desta forma, não ativa a resposta imune via complemento, favorecendo a invasão do sangue ou do fluido cefalorraquidiano, permitindo a disseminação microbiana. O Hib, apresenta ainda, uma amplificação da produção do material capsular, de propriedade hidrofílica, o que determina uma maior resistência à dissecação, favorecendo sua via de transmissão pessoa-pessoa, e aumentando também a inibição da fagocitose e colonização do epitélio, indicando que este é um dos fatores que explicam a virulência e prevalência desse tipo capsular em doença invasivas (Musher, 1983; Corn et al., 1993; Kroll et al., 1994; Adderson et al., 2001).

Os tipos encapsulados, especialmente o Hib, produzem enzimas como as neuramidases, importantes na invasão das meninges, e pelo menos uma IgA-protease, que possivelmente atua na clivagem de imunoglobulinas IgAs, presentes nas secreções e mucosas, em especial, no trato respiratório, o que justificaria seu sucesso na colonização de portadores (Kirkeby et al., 2000; Todar, 2004).

O fracionamento da parede celular do Hib resulta em várias proteínas, que também estão associadas à imunidade, denominadas de *Outer Membrane Protein* (OMP), proteínas da membrana externa. Em análises realizadas, foi observada a produção de anticorpos para estas proteínas, como também para outros lipooligossacarídeos já identificados. demonstrando-se a importância de antígenos não capsulares na determinação da imunogenicidade do Hib (Tenover, et al., 1995; Rodriguez et al., 2003; O'Neill et al., 2003).

Recentemente, foram identificados sete segmentos de DNA (*genetic islands*) presente no genoma de um *H. influenzae* sorotipo b, isolado de um caso de meningite, e ausente no genoma *H. influenzae*, cepa Rd (do tipo NC). Esses sete agrupamentos de DNA, possuem seqüências ligadas a fatores de virulência como codificação de proteínas transportadoras, síntese de lipopolissacarídeo (LPS) e incorporação de ferro, além de

seqüências implicadas na transferência horizontal de DNA, como elementos móveis e outras que sugerem a transferência por bacteriófagos. Esses sete agrupamentos de DNA, possivelmente também estão relacionados a maior virulência apresentada pelo Hib (Fleischmann *et al.*, 1995; Omilkunle *et al.*, 2002; Bergman & Akerley, 2003).

Outros tipos encapsulados estão agora sendo identificados como responsáveis por doenças invasivas, principalmente, em países que adotaram a vacina para o Hib. Destaca-se entre estes tipos não-b, o tipo capsular a (Hia), pelo seu grau de virulência e taxa preocupante de mortes, o tipo e (Hie), considerado um patógeno oportunista, e o tipo f (Hif), isolado em casos de doença invasiva na Espanha, Dinamarca e Estados Unidos (Kroll *et al.*, 1994; Meats *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003; Zacharisen *et al.*, 2003).

### 1.3.2. *H. influenzae* não-capsulado(NC) ou não tipável(NTHi)

O *H. influenzae* NC é uma bactéria colonizante da nasofaringe humana, e pode causar infecções do trato respiratório humano, especialmente otites médias, sinusite e bronquite. Também pode ser isolado ocasionalmente no trato urogenital, associado a algumas infecções como endometrites cervicovaginites, além de ser um importante patógeno em conjuntivites (Murphy & Apicella, 1987; Klein, 1997; Clemans *et al.*, 2001; O'Neal *et al.*, 2003). Entre 62 a 100% das crianças menores de um ano terão algum episódio de otite média, sendo que o *H. influenzae* NC é responsável por 27 a 35% desses casos. Destaca-se que um quadro não remissivo ou persistente de otite média durante os primeiros três meses de vida, pode afetar a capacidade intelectual da criança, principalmente o desenvolvimento da fala e da aprendizagem. As morbidades causadas pelos tipos NC no trato aéreo inferior, estão intimamente ligados a fatores que interferem nas condições imunológicas inatas da mucosa, favorecendo sua colonização, como a existência de outras infecções ou doenças de base, como a fibrose cística ou uma doença pulmonar obstrutiva. Além disso, estão sendo cada vez mais isolados em casos de doenças invasivas, especialmente em países que utilizam a vacina Hib-conjugada. Já foi caracterizado, por meios de técnicas de biologia molecular, uma correlação epidemiológica de transmissão intra-familiar dos tipos NC entre crianças e seus pais. (Teele *et al.*, 1990; St Geme *et al.*, 1993; Harabuchi, *et al.*, 1994; Urwin *et al.*, 1996; Foxwell *et al.*, 1998; St

Geme, 2000; Leibovitz et al., 2003; Bajanca et al., 2004; Campos et al., 2004; Watanabe et al., 2004; Veja-Briceno et al., 2005).

Os *H. influenzae* NC também apresentam um importante fator de virulência que auxilia na evasão dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, os lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é uma endotoxina, presente na parede celular de todas as bactérias Gram-negativas, que possui entre outras propriedades, a ativação de macrófagos, por meio de receptores conhecidos como receptores *toll-like*, principalmente o receptor *toll-like* 4 (TLR4) (Rock, 1998; Poltorak et al., 1998). Lorenz colaboradores (2005), utilizando modelo animal infectado com dois tipos de *H. influenzae* NC, um mutante expressando uma LPS alterada, e outro expressando uma LPS usualmente encontrada nesse patógeno (selvagem), observaram que a cepa mutante induziu a expressão de outra TLR, a TLR2, potencializando a ação da TLR4, aumentando a ativação de macrófagos de maneira eficiente, o que não ocorria com a cepa não mutante (selvagem). Essas observações sugerem a possibilidade de novos estudos para utilização de uma terapêutica alternativa, a partir da ativação potencializada dos macrófagos, via receptores *toll-like*, para os casos clínicos de infecções causadas pelos tipos NC (Lorenz et al., 2005).

Um dos fatores que determinam a virulência das bactérias Gram-negativas como o *H. influenzae* NC, é sua capacidade de incorporar o ácido siálico nas porções terminais dos Lipooligosacarídeos (LOS) da membrana externa, como a lactose, a *N*-acetilactosamina e possivelmente a *N*-acetilgalactosamina (Martin et al., 1999; Jones et al., 2002). A caracterização desse mecanismo, a partir do transporte de carboidratos, através do espaço periplasmático, ATP-independente, pode consistir em possíveis alvos para drogas antimicrobianas (Allen et al., 2005).

### 1.3.3 Pili, fímbrias, e biofilme

Estruturas proteínáceas como fímbrias e pili, permitem a aderência às mucosas de diferentes sítios, como a nasofaringe, ouvido médio e o trato respiratório inferior. As fímbrias, como HMW1, HMW2, Hia, Hsf e Hap, foram caracterizadas tanto no *H. influenzae* tipo b, como em isolados NC. As HMW1/HMW2 são fímbrias que possuem proteínas de alto peso molecular promotoras da aderência. Essas fímbrias são codificadas pelos genes *hmw1A* e *hmw2A*, expressos no processo de regulação gênica chamada de

variação de fase. Na variação de fase ocorre uma expressão alternada das moléculas de superfície, como as fímbrias, de forma randômica, ou modulada a partir de alterações nas condições do microambiente colonizante. Esse processo resulta numa variação de fenótipos, possibilitando a adaptação bacteriana em mais de um ambiente. A presença de pili, distribuído de forma peritríquia na célula bacteriana, é condicionada por uma série de genes conhecidos como *hifAE*, responsáveis principalmente pela aderência hemaglutinante. As fímbrias Hia e a Hsf são proteínas de alto peso molecular, que desempenham o mesmo padrão de aderência para células epiteliais, e possuem 72% de homologia e 81% de similaridade, condicionadas por dois genes, *hia* e *hsf*, que possivelmente são alelos. A Hap, condicionada pelo gene *hap*, permite a aderência nos diversos sítios de colonização e promove também a formação de biofilme (van Ham, et al., 1993; Dawid et al., 1999; Hendrixson et al., 1999; Killian et al., 2002; O'Neill et al., 2003).

Já foi observada a prevalência dos genes codificantes de pili *hifAE*, em especial dos segmentos *hifBC* por apresentarem regiões altamente conservadas, e dos genes *hmw1A*, *hmw2A*, *hia* e *hif*, em isolados clínicos Hib e NC. A prevalência dos genes *hifBC* foi de 109 (64%) em 170 cepas de Hib, e de 46 (28%) em 162 cepas de NC. Nenhuma cepa Hib apresentava os genes *hmw1A*, *hmw2A* e *hia*, e entre as cepas NC, 33% apresentavam o gene *hia*, 51% apresentavam o gene *hmw1A*, e 23% apresentavam o gene *hmw2A*. Essas análises indicaram uma alta prevalência de genes *hifBC*, em cepas Hib e NC isoladas da nasofaringe, assim como em doenças invasivas. Caracterizou-se também que os genes *hmw1A* e *hmw2A*, eram mais prevalentes entre as cepas isoladas no ouvido médio de pacientes. Desta forma, esses dados indicam que esses fatores de virulência possivelmente estão envolvidos na colonização de cada sítio (Ecevit et al., 2004).

A presença de pili nos tipos NC, determinante da propriedade de hemagutinação, é um indicativo que este patógeno possui a característica de formar biofilme. Um biofilme é definido como uma comunidade bacteriana estruturada em uma matriz polimérica extracelular, aderida a uma superfície inerte, como próteses, ou em ambientes orgânicos como o epitélio celular. Teoriza-se que a grande maioria das bactérias sobrevivem na natureza na forma de biofilme, inclusive caracterizando-se esse agregado bacteriano associado a infecções a partir de mecanismos prostéticos, além de cárie, pneumonia, endocardite e fibrose cística. O biofilme oferece uma maior proteção para bactéria contra os mecanismos

imunológicos do hospedeiro, e a ação de antimicrobianos. Essa propriedade ocorre em grande parte, pela formação da proteção da matriz polissacarídica, e de canais de eliminação de substâncias, como antimicrobianos, em seu interior (Costerton et al., 1999; Davey & O'Toole, 2000; Kolenbrander et al., 2000; O'Toole et al., 2000; Singh et al., 2000; Donlan et al., 2001). A partir de experimentos com isolados clínicos de *H. influenzae* NC, demonstrou-se que este patógeno possui a habilidade de formar biofilme *in vitro*, e de maneira semelhante também *in vivo*, evidenciando que as proteínas de sua membrana externa P2, P5 e P6, assim como pili, desempenham um papel fundamental na formação deste agregado (Murphy & Kirkhan, 2002).

#### 1.3.4 Resistência aos antimicrobianos

Um dos desafios na terapêutica das infecções microbianas é a emergência da resistência aos antimicrobianos, detectada também, no *H. influenzae*. O tratamento padrão, para doenças invasivas, especialmente pneumonias e meningites, preconiza uma cefalosporina de terceira geração (cefotaxime ou ceftriaxona, por 7 a 10 dias) ou a combinação de cloranfenicol e ampicilina (CDC, 2004; Ministério da Saúde, 2004). As ampicilinas e cefalosporinas são antibacterianos pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, que atuam na parede celular bacteriana, se ligando a proteínas da parede celular, conhecidas como proteínas ligadoras de penicilinas (PBP), inibindo a transpeptidização da parede celular, causando a lise e morte celular. O cloranfenicol promove a inibição da síntese protéica, ligando-os à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, interferindo na formação de peptídeos, conseqüentemente comprometendo o metabolismo celular bacteriano (Murray, 2000; Penildon, 2002).

A produção de enzimas que degradam o anel beta-lactâmico, conhecidas como beta-lactamases, são codificadas por plasmídios, a partir do transposon Tn3. Esse transposon carrega o gene *bla*, responsável pela produção de duas beta-lactamases (TEM-1 e ROB-1), sintetizadas por cepas de *H. influenzae* classificadas como beta-lactamase positivo e ampicilina resistente (BLPAR) (Ganzane et al., 1998; Karlowsky et al., 2002; Molina et al.,

2003). De acordo com estudos recentes, observam-se que os tipos capsulados possuem maior resistência aos antibacterianos, do que os tipos NC, inclusive com os surgimento de cepas multirresistentes. As cepas encapsuladas apresentam também uma maior quantidade de plasmídios conjugativos do que os isolados NC, correlacionando-se a esse fator a maior resistência observada nos tipos encapsulados (Campos *et al.*, 2004). Sykes, nos Estados Unidos, em 1974, detectou isolados *H. influenzae* ampicilina resistente, devido à produção de enzima TEM-1 (Mendelman *et al.*, 1984; Doern *et al.*, 1986). Ainda nesse país, atualmente a prevalência de *H. influenzae* resistentes a ampicilina, devido a TEM-1, mantém-se em torno de 90%, seguindo uma tendência mundial (Karlowsky *et al.*, 2002). Em 1980, Markowitz, caracterizou pela primeira vez, cepas de *H. influenzae* produtoras de ROB-1 (Markowitz, 1980). A prevalência global de cepas *H. influenzae* produtoras de ROB-1 está em torno de 7 a 11%, mas nos Estados Unidos e no México, esse índice está em torno de 21% e 26%, respectivamente (Daum *et al.*, 1988; James *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1999; Karlowsky *et al.*, 2000; Barry, 2001; Mathai *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2002; Dabernat *et al.*, 2003). Na Europa, os índices de isolados de *H. influenzae* produtores de beta-lactamases são bastante variáveis, como os observados na Holanda (1,8%), Portugal (20%), França (47,4%) e Polônia (3,7%) (Sulikowska *et al.*, 2004). Em outras regiões como no Vietnã, a presença da beta-lactamase TEM-1 é de 56,79% (Watanabe *et al.*, 2005). No Brasil, em uma análise de 1712 isolados de *H. influenzae*, de dez estados brasileiros, o índice de produtores de beta-lactamases foi bastante heterogêneo, como os casos de Santa Catarina com 6,7%, o Paraná com 18,5%, São Paulo com 21,7%, o Distrito Federal com 25,0% e o Rio Grande do Sul com 57,7% dos isolados analisados (Casagrande *et al.*, 2002).

Existem ainda, cepas de *H. influenzae* resistentes a ampicilina que não produzem beta-lactamases, conhecidas como cepas beta-lactamase negativa ampicilina resistente (BLNAR) (Mendelman *et al.*, 1984). Essa resistência ocorre devido a uma mutação no gene *ftsI*, que codifica a PLP3, responsável pela síntese de peptídeoglicano. Em função dessa mutação observa-se uma troca de aminoácido na PLP3, em três posições: (i) Asparagina (Asn)-526 por Lisina (Lys); (ii) Arginina (Arg)-517, por Histidina (His) e (iii) Serina (Ser)-385 por treonina (Thr) (Mendelman *et al.*, 2001; Dabernat *et al.*, 2002; Ubukata *et al.*, 2003). Baseados nesses resultados, as cepas são classificadas como baixa resistência a

ampicilina sem a produção de beta-lactamases, se apresentarem apenas a primeira (Asn-526 por lys) ou segunda (Arg-517, por His) substituição, e beta-lactamase negativa ampicilina resistente, se apresentarem a primeira e segunda substituições (Asn-526 por lys e Arg-517), ou a segunda e terceira substituições (Arg-517, por His e Ser-385 por Thr) (Mendelaman et al., 2001; Hasegawa et al., 2003).

No Japão, onde não foi introduzida a vacinação para o Hib, foi observado um rápido aumento na prevalência de cepas ampicilina resistente não produtora de beta-lactamase. Até o ano de 1.999 não detectou-se esse tipo de resistência em nenhum dos isolados clínicos. No ano de 2.000 identificou-se que 5,8% dos isolados apresentavam essa resistência, subindo em 2001 para 14,1%, e atingindo em 2002, 21,3% dos isolados (Hasegawa et al., 2003).

Em Salvador, na Bahia, em uma análise de 150 isolados de *H. influenzae* obtidos a partir de um sistema de vigilância de meningites, detectou-se que 14 (9,3%) apresentaram multiresistência, sendo que desses, 10 isolados (6,7%) apresentaram resistência a ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina. Dos 10 isolados, 90% foram identificados como produtores de beta-lactamases, e um isolado (10%) foi identificado como beta-lactamase negativa ampicilina resistente (Reis et al., 2002). Devido à recomendação do Ministério da Saúde, de pacientes com meningite, por *H. influenzae*, o uso do cloranfenicol ou da ceftriaxona, administrados endovenosamente, como tratamento padrão, é necessário o monitoramento constante dos isolados de *H. influenzae* resistentes aos antimicrobianos, principalmente a resistência ao cloranfenicol e aos beta-lactâmicos (Ministério da Saúde, 2004).

## **1.4. Tipagem capsular**

### *1.4.1 Tipagem capsular por técnicas de aglutinação em lâmina*

A tipagem capsular pode ser realizada por métodos sorológicos de aglutinação em lâmina, a partir de partículas de látex sensibilizadas com anti-soros específicos para os antígenos capsulares dos seis tipos encapsulados de *H. influenzae* (a-f). Esse método, análogo ao método de Quellung para *S. pneumoniae*, conhecido como sorotipagem por aglutinação em lâmina, apresenta resultados com boa sensibilidade, especificidade e rapidez (Lund & Henrichsen, 1978; CDC, 2004).

Existem dois métodos de sorotipagem em lâmina que utilizam anti-soros em uma reação de aglutinação. No primeiro método (Método 1), a bactéria é submetida ao anti-soro b, baseando-se na maior probabilidade de se encontrar um isolado desse tipo, em decorrência de sua alta prevalência em cenários pré-vacinação. Caso a reação seja negativa, procede-se o teste para os outros anti-soros (a, c, d, e, f). Não ocorrendo reação para esses anti-soros, o isolado é considerado NC. No segundo método (Método 2), procede-se o teste do isolado com todos os anti-soros em paralelo. A positividade para um dos anti-soros, indica seu sorotipo. Não ocorrendo à positividade para qualquer anti-soro, o isolado é considerado NC. Ambos os testes utilizam *kits* laboratoriais de anti-soro, a partir de anti-soros específicos, produzidos em coelho. Muitos laboratórios empregam o método 1, (que utiliza primeiro o anti-soro b, e em caso negativo, utiliza os demais na sorotipagem), por ser menos dispendioso do que o método 2 que utiliza todos anti-soros em paralelo (Leinonen & Herva, 1977; Venkatesh *et al*, 1985; CDC, 2004). Uma variação deste método analisa o isolado com anti-soros de a-f marcados, procedendo a leitura em um aparelho de contra-imunoeletroforese (CIE). Este teste é menos sensível, mais demorado e apresenta maiores dificuldades técnicas do que os outros dois anteriores (Leinonen & Kathy, 1978; CDC, 2004).

#### *1.4.2. Tipagem capsular pela da técnica de PCR*

O avanço e aprimoramento nas técnicas e estudos moleculares de genotipagem, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitaram inúmeras aplicações na identificação e análise comparativa entre partes do genoma de diversos patógenos. Os resultados obtidos a partir destas técnicas mostraram-se mais precisos, fornecendo dados

epidemiológicos relevantes, especialmente na identificação das fontes de infecção e na avaliação da efetividade das vacinas. O método de PCR é considerado o padrão ouro para a tipagem capsular de *H. influenzae*, por apresentar alta sensibilidade e especificidade dos tipos capsulares, inclusive na caracterização dos tipos NC (Kroll et al., 1989; Falla et al., 1994; Tenover et al., 1995; Fraser et al., 2000; Sunit et al., 2002; Bokermann et al., 2003; Campos et al., 2003b; LaClaire et al., 2003; Meats et al., 2003; Campos et al., 2004).

A tipagem capsular empregando a técnica da PCR fundamenta-se na região do cromossomo bacteriano, chamada de *cap* (Catlin et al., 1972). O locus *cap* apresenta três regiões (1, 2 e 3): as regiões 1 e 3 são comuns a todos sorotipos, a região 2 apresenta uma pequena porção variável, codificante do polissacarídeo de cápsula, que é específico para cada tipo capsular. A tipagem molecular da cápsula realizada pela PCR, baseia-se na variabilidade da região 2, específica para cada um dos seis tipos encapsulados de *H. influenzae* (Kroll et al., 1989).

A presença da cápsula também depende do gene *bexA*, localizado na região 1. Destaca-se ainda que determinados tipos capsulares como a maioria dos Hia e Hib, e todos os *H. influenzae* tipo c, d, e o Hie, apresentam ainda uma seqüência de um elemento de inserção, conhecido como *IS1016*, próximo ao gene *bexA*, que auxilia na amplificação capsular. O gene *bexA* é responsável pela codificação do componente de acoplamento de ATP, essencial para o transporte da cápsula para fora da célula, ausente nos tipos NC. Assim o gene *bexA*, é utilizado para a diferenciação entre os *H. influenzae* capsulados dos tipos NC (Falla et al., 1994, LaClaire et al., 2003; Saltola et al., 2003).

A maioria dos Hib possuem uma cópia parcial do locus *cap*, sendo que existem duas cópias completas das regiões 2 e 3, uma cópia completa da região 1 e outra parcial ou “truncada” da região 1, onde identifica-se uma deleção de 1,2 kb entre o segmento *IS1016* e o gene *bexA*. A presença de uma cópia incompleta do segmento *IS1016-bexA*, é explicada como uma forma de estabilizar a produção de cápsula, reduzindo a probabilidade de eventos de recombinação, que poderiam resultar na perda de genes do locus *cap*. Por outro lado, ocorrendo um evento de recombinação nessa região, a cópia truncada poderia manter os eventos de exportação de cápsula, em decorrência da conservação do componente do acoplamento do ATP, primordial para esse processo (Kroll & Moxon, 1988, Kroll et al., 1990; Falla et al., 1994).

Existem também cepas do tipo b que apresentam um único locus *cap*. Nessas cepas, identifica-se na região 1, a presença incompleta do segmento *IS1016-bexA*, com sua deleção de 1,2 kb. Teoriza-se que este fenômeno surgiria devido a eventos de recombinação gênica, resultando na presença de apenas um locus *cap*, com a cópia parcial do segmento *IS1016-bexA*. Essas cepas são denominadas *H. influenzae* mutante cápsula deficiente tipo b (Hib<sup>-</sup>). Pelas técnicas de sorotipagem por aglutinação essas cepas são indistinguíveis das cepas NC, mas que podem ser diferenciados pela PCR, a partir do tipo codificante específico b, presente na região 2 do locus *cap*, ausente nas cepas NC (Kroll et al., 1988; Falla et al., 1994; Campos et al., 2004).

#### *1.4.3. Comparação da tipagem capsular do H. influenzae pelas técnicas de aglutinação em lâmina e pela técnica de PCR*

Vários estudos têm demonstrado a necessidade da utilização da tipagem capsular da técnica de PCR, em substituição aos métodos de aglutinação, adotada especialmente por laboratórios de referência. A precisão e confiabilidade dos dados obtidos em levantamentos epidemiológicos, tais como a efetividade da vacina, a análise de possíveis falhas vacinais, a emergência de outros tipos não contidos na vacina Hib-conjugada, além da re-emergência do tipo b, são dependentes da especificidade e sensibilidade dos testes de tipagem capsular (Bokermann et al., 2003; LaClaire et al., 2003; Saltola et al., 2003; Bruun et al., 2004).

Os métodos sorológicos de tipagem, são relativamente simples e rápidos de serem realizados, mas exigem protocolos rigorosos a serem seguidos, e são dependentes do cultivo das amostras. Além disso, essas amostras devem apresentar um mínimo entre  $10^4$  a  $10^5$  unidades formadoras de colônia (ufc) por mL, que em casos de amostras que apresentem valores inferiores a esse patamar, pode ocorrer a possibilidade de um resultado falso-negativo. Outro resultado falso-negativo também pode acontecer em amostras de pacientes que já utilizam a terapia antibacteriana, mas que ainda apresentam o patógeno no sítio infeccioso, o que poderia levar uma suspensão inapropriada do tratamento. Ainda verifica-se nessa técnica, a ocorrência de aglutinações inespecíficas ou cruzadas, que

possibilitam sérios erros de interpretação dos resultados. Observa-se também a incapacidade dos testes sorológicos de diferenciarem as cepas NC dos tipos mutantes cápsula deficiente b<sup>-</sup>, o que pode configurar um importante equívoco na avaliação dos tipos presentes em portadores e pacientes (Bokermann *et al.*, 2003; LaClaire *et al.*, 2003; Saltola *et al.*, 2003; Bruun *et al.*, 2004).

A utilização da tipagem capsular pela PCR apresenta várias vantagens, em relação às técnicas sorológicas. Observa-se uma superior confiabilidade dos resultados laboratoriais, possibilitando também, a diferenciação entre cepas NC e os Hib<sup>-</sup>, apresentando ainda uma alta sensibilidade para detecção de amostras de pacientes que realizam tratamento com antibacterianos. A técnica de PCR também permite a realização do teste diretamente de amostras de líquido cefalorraquidiano, eliminando-se as etapas de cultura e isolamento. Entre os problemas verificados na utilização rotineira da PCR, para tipagem capsular do *H. influenzae*, estão o alto custo na aquisição da aparelhagem e dos insumos necessários para a realização do teste, e a exigência de pessoal técnico altamente capacitado. Outra desvantagem apresentada por esse método, é o tempo relativamente grande para a realização da tipagem. Novas técnicas estão sendo aperfeiçoadas, objetivando uma redução significativa na realização do teste, tornando-o mais eficiente e rápido (Falla *et al.*, 1994; Sunit *et al.*, 2002; LaClaire *et al.*, 2003; Saltola *et al.*, 2003; Bruun *et al.*, 2004; Ishiwada *et al.*, 2004; Kalmusova *et al.*, 2004; Uzuka *et al.*, 2004).

A necessidade do cultivo das amostras para o isolamento e posterior identificação, pode configurar um problema decisivo nas análises de casos de pneumonia e meningites. Em Bangladesh, no ano de 2001, foram avaliadas 320 amostras de sangue e líquido de pacientes com meningite e pneumonia por *H. influenzae*. A tipagem capsular era realizada, sorologicamente a partir do cultivo destas amostras, e pela PCR diretamente das amostras. A técnica de PCR apresentou uma sensibilidade superior, ao detectar o *H. influenzae* em seis amostras de casos de pneumonia, e em oito amostras de líquido, que tiveram resultado negativo na cultura. (Shoma *et al.*, 2001).

A confiabilidade do resultado de amostras cultivadas a partir de pacientes que utilizam algum antibacteriano também pode ser objetivamente questionada. Estudos realizados na Índia, a partir do líquido de 107 crianças com suspeita de meningite, sendo que destas, 85 já utilizavam o tratamento com algum antibacteriano injetável, demonstraram

que a PCR identificou 37 amostras positivas para o Hib, enquanto a partir do cultivo, a positividade foi observada em apenas 23 amostras. Esses dados reafirmam a maior precisão da PCR, que apresentou uma maior sensibilidade na detecção do Hib, inclusive nas amostras de pacientes que utilizavam o tratamento antibacteriano, realizando o teste diretamente do líquido (Sunit *et al.*, 2002).

Em outro estudo comparativo entre a PCR e métodos de rotina, empregando-se a detecção através da cultura, analisaram-se 128 efusões de 75 crianças diagnosticadas com otite média, em Porto Alegre. Os resultados mostraram uma positividade dos casos de prevalência de *H. influenzae*, pela cultura, de 13 isolados (10,2%), enquanto a positividade apresentada pela técnica de PCR foi de 50 isolados (39,1%) (Rota *et al.*, 2004). As explicações para a discordância observada entre os métodos de PCR, e os testes convencionais, estão condicionadas a três hipóteses: (i) a quantidade de microrganismos seria mais baixa que os limites de detecção, usualmente apontados como  $10^{4-5}$  ufc/mL; (ii) os microrganismos assumiriam formas L, perdendo a capacidade de sintetizar a camada peptidoglicana da sua parede e que, por isso, mudam sua forma original, tornando-se resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, restringindo o seu cultivo; (iii) as bactérias estabeleceriam-se sob a forma de biofilme, resultando em uma menor atividade metabólica e maior capacidade de resistência aos antimicrobianos. Trabalhos em animais observaram, que as três situações poderiam ser causadas pelo tratamento com antibióticos e pela resposta imune do hospedeiro. Além disso, os microrganismos em formas L ou agrupados em biofilmes, apresentam menor atividade metabólica e reprodutiva, quando comparados às bactérias planctônicas, que desta forma, seriam parcialmente responsáveis pela infecção crônica e pela persistência da efusão no ouvido médio de crianças, sem uma sintomatologia constante e característica (Stenfors & Raisanen, 1989; Gosksu *et al.*, 1996; Rayner *et al.*, 1998; Feil *et al.*, 2001; Rota *et al.*, 2004).

Em 2003, estudos de LaClaire e colaboradores, avaliaram nos laboratórios do CDC, 141 isolados de *H. influenzae*, identificados através da tipagem por aglutinação em lâmina, entre os anos 1998 e 1999, por diversos laboratórios americanos, utilizando a PCR como método confirmatório. Desses isolados, 85 (60%) apresentaram o mesmo resultado obtido anteriormente, tanto na sorotipagem por aglutinação em lâmina, como na avaliação feita pela PCR. Entre os resultados discordantes das duas técnicas, 40 isolados foram

sorotipados pela aglutinação em lâmina, como Hib. Desses, apenas 12 (30%) foram caracterizados como esse tipo pela PCR, e 27 (68%) não apresentavam o gene *bexA* e nem a região codificante do tipo específico de cápsula, sendo assim considerados como NC, e um isolado foi identificado como Hif. Uma amostra identificada como Hia, seis identificadas como tipo c, sete como tipo d, quatro como Hie, nove como Hif, identificados anteriormente pela técnica de aglutinação em lâmina, foram todos tipados pela técnica de PCR, como NC. Além disso, outro isolado caracterizado sorologicamente como c, foi identificado pela PCR como Hie. Essas discrepâncias aconteceram possivelmente por erros de técnica, tanto na execução do teste da aglutinação em lâmina, como pela dificuldade na leitura e interpretação dos resultados. Observou-se também, uma ausência na padronização da técnica do teste de sorotipagem por aglutinação em lâmina, com protocolos diferentes para cada laboratório. Esses erros indicaram uma grave falha no dimensionamento da cadeia epidemiológica, relativa principalmente a eficácia da vacina Hib-conjugada, com o aumento significativo, de forma equivocada, da taxa do Hib, o que poderia consistir em falha vacinal, em virtude dos erros de tipagem pela aglutinação em lâmina (LaClaire et al., 2003).

Na Itália, onde detectou-se os primeiros casos de infecções provocadas pelo Hie, em 5 pacientes adultos com meningite, entre janeiro de 2000 a dezembro de 2001. A tipagem foi feita por aglutinação em lâmina e pela PCR. A sorotipagem identificou erroneamente um isolado Hie como sendo NC, tipado corretamente posteriormente pela técnica de PCR. (Cerqueti et al., 2003).

Também no Brasil, foi realizado um estudo comparativo entre as técnicas de aglutinação em lâmina (método 1 e 2) e a PCR, analisando-se 258 isolados de doenças invasivas e portadores de *H. influenzae*. Do total de 131 isolados de doenças invasivas, o método 1 de aglutinação em lâmina, identificou apenas 16 isolados como sendo Hib, enquanto a PCR identificou 39 isolados desse tipo capsular. Também pela PCR, quatro isolados foram identificados como sendo tipo cápsula deficiente b<sup>-</sup>. Não se verificou erro estatisticamente significativo, na identificação entre a PCR e o método 2, nesse grupo de analisado. Já comparando-se os 127 isolados de portadores, os principais erros consistiram entre a identificação do Hib, pelo método 1 e a PCR: pelo método 1 de aglutinação em lâmina, de 50 isolados, sorotipados como tipo b, 49 foram identificados como sendo NC, e

um foi identificado como Hia, tanto pela PCR como pelo método 2 de aglutinação em lâmina. Ainda com relação a esse grupo, pelo método 1, foram identificados erroneamente quatro isolados como Hia, três como tipo c, outros três como d, e oito como Hif, num total de 18. Desses, 17 foram identificados como NC, e 1 como sendo Hib pela PCR. Outros sete isolados tiveram resultados discordantes entre o método 2 e a técnica de PCR. Pelo método 2, um isolado foi identificado como Hib, dois como tipo c, outros dois foram identificados como Hia, e dois como tipo NC. Já pela, pela PCR, dos sete isolados, cinco foram tipados como NC, um como Hib, e um identificado como Hie. A precisão dos testes de tipagem por aglutinação, especialmente o método 1, foi afetada possivelmente por fatores diversos, como aglutinações não específicas, reações cruzadas, e dificuldade na interpretação dos resultados, o que constituem um sério obstáculo na confiabilidade da especificidade nos métodos de aglutinação, inclusive, no levantamento epidemiológico da prevalência dos tipos circulantes em cada região (Bokermann et al., 2003).

## 1.5. Epidemiologia

A distribuição do *H. influenzae* é de abrangência mundial. Foi descrito pela primeira vez por Pfeiffer em 1894, depois do seu isolamento a partir da saliva de pacientes com a gripe influenza, durante a grande epidemia de 1890, razão pela qual foi equivocadamente, responsabilizado pela síndrome. Ficou conhecido pelo nome de Bacilo de Pfeiffer, até que em 1920, o comitê de Nomeclatura da Associação de Bacteriologistas Americana, propôs seu atual nome (Pittman, 1931; Tognotti, 2003).

Dos seis tipos capsulares de *H. influenzae* (a-f), e do tipo NC, o Hib, é responsável por uma média de 84% das infecções em crianças menores de 4 anos, e aproximadamente 95% das bacteremias e meningites por *H. influenzae*, sendo responsável por aproximadamente 900 mil mortes ao ano (Shann & Steinhoff, 1999; Peltola, 2000).

A nasofaringe de portadores infantis representa o principal reservatório de *H. influenzae*, colocando a criança como um importante vetor na cadeia de transmissão desta bactéria responsável por diversas morbidades, principalmente meningites e pneumonias

(Gray et al., 1980; Greenwood, 1992; Kauppi et al., 1993; Robbins et al., 1995; Cerqueti et al., 2000; Greenberg et al., 2004). Esta bactéria é altamente adaptada ao hospedeiro humano, presente em aproximadamente em 6 a 11% da nasofaringe de crianças saudáveis, e em 37% da nasofaringe de crianças com algum quadro clínico indicativo de infecção respiratória aguda (IRA) (Peerbons et al., 2002). Em Israel, entre novembro de 2001 a agosto de 2002, avaliou-se isolados de *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, obtidos da orofaringe e nasofaringe de 216 crianças saudáveis e doentes, e suas respectivas mães. A taxa de isolados de *H. influenzae* em portadores, permaneceu constante nos diferentes grupos etários, mas observava-se um aumento a partir do segundo ano de vida, do número de isolados da orofaringe, sem que houvesse uma diminuição na taxa de isolados na nasofaringe. Nas mães, a taxa de portadoras, foi de 81% na orofaringe e apenas em 9% na nasofaringe. Quando as crianças apresentavam alguma doença, a taxa de isolados de *H. influenzae* aumentava 40%, especialmente na região da nasofaringe (Greenberg et al., 2004).

A expressiva colonização das mucosas das superfícies do trato respiratório é um processo dinâmico, onde as bactérias colonizadoras são adquiridas, eliminadas e readquiridas em vários momentos da vida. O uso de prolongado e intenso de antibacterianos pode promover a substituição de tipos colonizantes suscetíveis por outros resistentes aos antimicrobianos empregados na terapêutica. Nesse contexto, a nasofaringe humana altamente é colonizada por diversas bactérias, inclusive as potencialmente patogênicas. É também local onde observa-se intensa troca de material genético, por meio de processos como a transformação, transdução e conjugação intra e inter-específica. Assim a nasofaringe assume importante papel na cadeia de aquisição de fatores de resistência e virulência de bactérias colonizantes (Bergstron et al., 1999; Garcia-Rodriguez & Martinez, 2002).

É fato estabelecido, que as doenças invasivas, incluindo as pneumonias e meningites causadas por *H. influenzae*, ocorrem por meio da disseminação destes agentes, presentes na nasofaringe, para o sangue e posteriormente para outros sítios, como as meninges (Gray et al., 1980, Briles et al., 2000; Leibovitz & Dagan 2000; Cole et al., 2001; O' Brien et al., 2001; Masuda et al., 2002). A transmissão ocorre por contato direto ou por inalação de

aerossóis expelidos pela nasofaringe. Sabe-se que uma elevada concentração de bactérias, ou a presença concomitante de infecção viral pode potencializar a infecção (Musher 1983; Todar, 2004).

Um dos fatores de risco para *H. influenzae* incluem, a idade, principalmente em menores de cinco anos, e o alto número de pessoas no convívio diário, sejam familiares ou relacionadas ao período que a criança passa em escolas, creches e orfanatos (Peltola 2000; Talon *et al.*, 2000; CDC 2004). Em estudo com crianças de creches e da comunidade de Amsterdã, o *H. influenzae* apresentou uma prevalência de 37% e 11%, respectivamente (Peerbooms *et al.*, 2002). Em outro estudo, utilizando cultura de amostras de nasofaringe, de crianças de 1 mês a 5 anos de idade, de creches no Japão, demonstrou-se uma prevalência de 53,2% de *H. influenzae* (Masuda *et al.*, 2002).

Outros fatores de risco importantes relacionam-se as possíveis contatos da criança em instituições de saúde como ambulatórios e enfermarias pediátricas. Inquestionavelmente também, as condições sociais, educacionais, culturais e econômicas contribuem com grande influência na complexa e extensa cadeia determinante dos casos de morbidade e mortalidades pelo *H. influenzae* em países da África, Ásia e América Latina, e entre nativos americanos e comunidades *Amish* (CDC, 2004).

### 1.5.1 Infecções respiratórias agudas em crianças e o *H. influenzae*

As infecções respiratórias agudas (IRA) correspondem a 40% dos casos de atendimento a crianças em ambulatórios e consultórios médicos, sendo responsável pelo total de 25 a 33% das mortes observadas nos cinco primeiros anos de vida (Rudan *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2004). Estes dados representam aproximadamente dois milhões de mortes anuais, sendo que em regiões como o continente africano e sudeste asiático, ocorrem aproximadamente 70% dos casos de crianças atendidas em hospitais e ambulatórios. Em países da África e Ásia, o número de crianças com IRA superam em duas a cinco vezes a incidência média dos Estados Unidos. A taxa de mortalidade também é extremamente alta em países como o Paquistão, onde os números de óbitos atingem

aproximadamente 30% das crianças entre 0 e 5 anos (Pechere et al., 1995; WHO, 2002a; Rudan et al., 2003; Lanata et al., 2004; Khan et al., 2004).

A determinação dos fatores relacionados à origem da IRA, além da multiplicidade dos agentes etiológicos potencialmente implicados, é extremamente problemática. Em uma cadeia de eventos que envolvem a colonização dos sítios do trato respiratório, diversos fatores que propiciam um desequilíbrio na integridade da mucosa, e/ou alterações imunológicas, podem contribuir para que a microbiota colonizante possa estabelecer a infecção, onde as bactérias podem ser o agente primário ou secundário na patogênese da doença (Teixeira, 1994; Tognoli, 2003; Numazaki et al., 2004).

Entre as morbidades relacionadas com IRA, a maioria é determinada por infecções de etiologia viral, autolimitadas a quadros frequentemente transitórios de tosses, resfriados e hipertermia, principalmente em países desenvolvidos. (WHO, 2002b; CDC, 2004).

As infecções bacterianas das vias respiratórias são divididas e classificadas com base no sítio anatômico predisponente, ocorrendo uma intrínseca relação entre certos agentes com potencial para desencadear a infecção, e determinadas patogenias. Nas infecções agudas das vias respiratórias superiores, a maioria é benigna, transitória e de remissão espontânea, mesmo que em determinados casos, de gravidade acentuada para crianças menores que 5 anos e neonatos. Nesse contexto, estão correlacionadas sérias infecções como a epiglotite por *H. influenzae*; coqueluche pela *Bordetella pertussis*, e a difteria causada por *Corynebacterium diphtheriae*. Destaca-se ainda a faringite, infecção bacteriana bastante comum em crianças, causada com mais freqüência pelo *Streptococcus pyogenes*. O *H. influenzae* e o *S. pneumoniae* estão associados frequentemente a maioria dos casos de sinusites e otite média aguda (Teixeira, 1994).

Dentre as várias etiologias da IRA, a pneumonia é a principal infecção das vias respiratórias inferiores, destacando-se como um grave problema de saúde pública, onde estima-se que atinja o número de 4 milhões de casos, somente nos Estados Unidos. Em infantes de 0 a 5 anos de idade, a pneumonia é uma infecção extremamente comum, e com consequências muitas vezes fatal, figurando como a sexta causa mais comum de morte em crianças, e a principal entre as doenças infecciosas (Mulholland, 1999; Mathai et al.,

2001). Ressalta-se que a pneumonia de origem bacteriana é primeira causa de morte associada à IRA, sendo responsável por índices anuais, de aproximadamente 100.000 mortes em crianças menores de um ano, o que corresponde a uma média de 300 mortes diárias em todo mundo (WHO, 2002b; CDC, 2004). Esses números consolidam evidências que demonstram as elevadas proporções de pneumonias bacterianas em infantes, especialmente em países em desenvolvimento (Shann, 1995; PAHO, 2002).

Analisando-se os fatores de risco para a pneumonia, observam-se que a idade, as condições sócio-econômicas e o estado de saúde do paciente são determinantes. Etiologicamente, o agente causal, na maioria das vezes é bacteriano (Jaimes et al., 2003; Cardoso et al., 2004).

Entre os patógenos bacterianos mais frequentemente isolados de casos de pneumonia, destaca-se o *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catharralis*, *S. aureus*, além dos agentes atípicos como *Clamidia pneumoniae*, *Clamidia trachomatis* e *Micoplasma pneumoniae*. Ressalta-se também que, uma proporção significativa dos casos de pneumonia (8-40%), é estabelecida por infecções polimicrobianas. Nos países em desenvolvimento, o *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *S. aureus* são os principais agentes etiológicos isolados dos casos de pneumonias graves, sendo que o *H. influenzae* é responsável pela maioria dos casos de pneumonia bacteriana nesses países (Greenwood et al., 1992; Falade et al., 1997; Berhman & Kliegman, 1999; Talon et al., 2000; McIntosh, 2002; Lakhanpaul et al., 2004).

A grande complexidade etiológica, juntamente com uma carência de testes e diagnósticos que apresentem alta sensibilidade e especificidade nas unidades de saúde determina na maioria das vezes, a adoção de um sistema empírico de prescrição antimicrobiana, já que entre 20 a 60% dos casos o patógeno não é identificado. A pneumonia em crianças apresenta um quadro preocupante sob vários aspectos, destacando-se a multiresistência bacteriana, que possivelmente determina a incidência e gravidade desta doença, afetando decisivamente as chances de sucesso no tratamento (Façanha & Pinheiro, 2004).

A terapia antimicrobiana utilizada tem como objetivo abranger as possibilidades etiológicas mais frequentes em pneumonia, cuja sensibilidade a esses antimicrobianos seja

amplamente reconhecida, especialmente prescrita para crianças de 2 meses a 5 anos. Nessa faixa etária é imprescindível que a escolha do antimicrobiano demonstre boa atividade contra *H. Influenza* e *S. pneumoniae*. Nos países em desenvolvimento, a maioria dos isolados destes patógenos apresenta um perfil de suscetibilidade ao trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), a amoxicilina, a ampicilina e a penicilina. Na maioria dos casos, o TMP-SMX é recomendado por sua eficácia, seu largo espectro antimicrobianos e a facilidade de administração (somente duas doses ao dia), além de seu baixo custo e escassos efeitos colaterais (PAHO, 2002).

O grande impacto econômico que as infecções respiratórias aguda acarretam sobre as famílias e sistemas de saúde, é extremamente alto. Destaca-se que vários fatores de risco impossibilitam uma melhor administração e controle da meningite, entre eles a densidade populacional, o nível educacional e remuneração insuficientes, condições ambientais precárias como a baixa qualidade do ar, ausência de rede de água tratada e condições de saneamento básico. Desta forma, existe uma urgência premente de estudos complementares que melhorem as estimativas globais e analisem de maneira muito próxima da realidade, a complexidade dos fatores nacionais e regionais das IRAs em crianças, sobretudo nos países em desenvolvimento. É necessário também que a implementação de medidas profiláticas e de tratamento, com a atenção devida ao *H. influenzae*, responsável por várias infecções ligadas a IRA, em especial a pneumonia, morbidade de grande impacto em crianças menores de cinco anos (WHO, 2002b; Ubukata, 2003; Lanata et al., 2004).

### *1.5.2 Meningites em crianças e H. influenzae*

As meningites bacterianas consistem em um sério problema de saúde, em especial entre crianças menores de cinco anos, com graves consequências nessa faixa etária. Observa-se uma média de 890.000 casos anuais, distribuindo-se em torno de 500.000 casos no continente africano, 210.000 em países do pacífico, 100.000 na Europa e 80.000 na América. A partir deste quadro, estima-se que 160.000 crianças poderiam apresentar

alguma seqüela neurológica grave como retardo mental, perda da audição, comprometimento da linguagem, anormalidade motora e distúrbios visuais, sendo que entre aproximadamente 5 a 40% dessas crianças viriam a óbito (Biljmer et al., 1992; Greenwood 1992; Falade et al., 1997; Mulholland et al., 1997; Levine et al., 1999; Mulholland 1999; Heath et al., 2001; WHO 2001).

Dentre as meningites bacterianas nesta faixa etária, os patógenos como a *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, outras enterobactérias e bactérias Gram-positivas, são isoladas menos frequentemente. Já o *H. influenzae*, o *S. pneumoniae* e a *N. meningitidis* correspondem a aproximadamente a mais de 80% dos casos, com uma incidência entre os países desenvolvidos estimada em 1,5/100.000 habitantes, e em países em desenvolvimento com uma incidência de aproximadamente 20/100.000 habitantes (Tikhomirov et al., 1997; Gebremariam, 1998; Rosenstein et al., 2001; Koedel et al., 2002; Celal et al., 2004).

Os principais fatores de risco estão relacionados intimamente com os fatores sócio-econômicos, muito semelhantes aos observados para a IRA, acrescentando-se ainda, a presença de fumantes na família, e condições ambientais impróprias como baixa qualidade do ar, especialmente nos meses de outono e inverno (CDC, 2004; Penny et al., 2005).

Dentre os patógenos responsáveis por casos de meningites bacterianas, o *H. influenzae*, especialmente o Hib, corresponde por 20 a 60% dos casos. A meningite causada pelo Hib correspondia a aproximadamente 52% de todas as morbidades determinadas por esse patógeno, de acordo com estudo conduzido no período de vinte anos (1970-1990), período esse, anterior a introdução da vacina Hib-conjugada na maior parte do mundo. Em países que não introduziram a vacina, como o Japão, o Hib mantém-se como principal agente de meningite bacteriana em crianças (Mitsuda et al., 1999; Peltola, 2000; Heath et al., 2001).

A transmissão do *H. influenzae* ocorre através do contato direto de pessoa a pessoa, pela via respiratória, disseminada por doentes e portadores. O período de incubação é relativamente curto, estimando entre 2 a 4 dias, exigindo-se isolamento dos doentes. Os sinais clínicos são súbitos, caracterizados pelo quadro de febre alta, cefaléia intensa, náuseas, vômitos, irritabilidade, fotofobia, convulsões, abaulamento da fontanela, e

enrigecimento do pescoço. Podem ainda apresentar os sinais clássicos de inflamação meníngea como o sinal de Kerning (flexão do joelho quando a coxa é elevada) e o sinal de Brudzinski (flexões reflexas dos membros inferiores quando ocorre a aproximação do queixo com o tronco da criança). Ressalta-se que lactentes raramente apresentam alguns destes sinais (CDC, 2004). O diagnóstico laboratorial consiste na análise do líquido, que pode apresentar-se turvo, leitoso ou xantocrômico, evidenciando nos testes bioquímicos uma diminuição da glicose e cloretos, proteínas elevadas e a presença de polimorfonucleares (Ministério da Saúde, 2004). O diagnóstico positivo de meningite bacteriana aguda, de acordo com critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), determina-se com a confirmação dada pelo isolamento microbiológico ou pela detecção de antígeno (aglutinação em lâmina ou CIE) em líquido. Com a finalidade de se estabelecer uma vigilância epidemiológica completa, a OMS recomenda a inclusão de determinados pacientes que apresentem a suspeita clínica de meningite associada à presença de líquido turvo e com pelo menos um dos seguintes achados em sua análise: proteínas em valores de 100 mg/dl ou mais, glicose inferior a 40 mg/dl, e contagem de leucócitos com mínimo de 100 células/dL com 80% de neutrófilos, a partir da adoção do termo “caso provável de meningite bacteriana” (pMBA) (WHO, 1999).

O tratamento padrão baseia-se na utilização do cloranfenicol ou ceftriaxona, administrado por via endovenosa, durante 7 a 10 dias. A utilização de antibacterianos também é indicada como medida profilática em caso de contato com doentes, tanto no ambiente familiar, como em caso de creches ou escolas a partir do segundo caso confirmado. O medicamento de escolha é a rifampicina, inclusive para adultos, e crianças menores de 24 meses não-vacinadas ou com esquema vacinal incompleto, de acordo com normas recomendadas pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2004).

Um dos grandes paradoxos na terapêutica das meningites está no tempo entre a análise do líquido e sangue, dependente em especial da cultura das amostras, e a decisão quanto ao emprego do tratamento. O tempo relativamente grande de espera pelos resultados, em se tratando de uma doença de curso insidioso como a meningite bacteriana, tem estimulado a prática do início da terapia antibacteriana, em casos clínicos suspeitos, antes da confirmação dos resultados laboratoriais, o que pode afetar a precisão dos

resultados. A cultura do líquido, juntamente com o teste complementar de hemocultura, é necessária para identificação do agente etiológico e seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Mas ressalta-se que esse resultado pode apresentar-se negativo, quando o paciente utiliza a terapia antibacteriana prévia, fato que pode ser minimizado com a utilização da análise pela PCR, diretamente de uma amostra de líquido (Stenfors & Raisanen, 1989; Goksu *et al.*, 1996; Rayner *et al.*, 1998; Corless *et al.*, 2001; Celal *et al.*, 2004).

Desta forma, observa-se a necessidade do estabelecimento de sistemas de vigilância, abrangentes e meticolosos, que promovam estudos e análises epidemiológicas que observem toda cadeia de eventos envolvendo a profilaxia, transmissão, diagnósticos clínicos e laboratoriais mais confiáveis e rápidos, assim como uma terapêutica que minimize as possibilidades de óbitos e seqüelas (Peltola, 2000; WHO, 2002a; Simões *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2004; Adegbola *et al.*, 2005).

## **1.6 A vacina Hib-conjugada**

A resposta imunológica do hospedeiro frente às bactérias encapsuladas como Hib, depende intrinsecamente da habilidade do sistema imune em produzir anticorpos para os antígenos da cápsula. Esse tipo de resposta imune é baseado nas células T-independente tipo 2, que desenvolvem relativamente tarde em crianças, entre 18 a 24 meses de idade. Assim as crianças menores de dois são extremamente susceptíveis as infecções causadas por bactérias encapsuladas (Breukels *et al.*, 1999)

O uso de vacinas para o *H. influenzae* tipo b, data da década de 1970, com a utilização de vacina capsular polissacarídica, constituída com o PRP, que demonstrou na prática ser pouco imunogênica para crianças menores de 18 meses de idade, incapaz de produzir uma memória imunológica duradoura, e inefetiva na prevenção da colonização da nasofaringe de portadores. Novas vacinas, utilizando uma proteína carreadora com o

antígeno de cápsula do *H. influenzae*, mais eficientes e imunogênicas, foram introduzidas e implementadas entre os anos de 1987 a 1993. Essas vacinas possuem a capacidade de induzir a produção de anticorpos anti-polissacarídicos entre 2 a 3 meses de idade, reduzindo o número de morbidades e mortalidades causadas pelo Hib, além de prevenirem a colonização de portadores (Peltola et al., 1984; Black et al., 1991; Lipstch, 1997; Breukels et al., 1999; Peltola, 2000; Dennehy, 2001; Campos et al., 2003b; Andrade et al., 2004).

As características das quatro vacinas Hib-conjugadas empregadas atualmente em diversos sistemas de vacinação, são baseadas no tamanho do polissacarídeo, no tipo de proteína carreadora, e também a interação química entre o carreador e o polissacarídeo (Dennehy, 2001). A primeira vacina conjugada foi a PRP-D, que utiliza o toxóide diftérico como proteína carreadora. A vacina HbOc (HibTITER; Wyeth-Lederle, Pearl River, LO, USA - CRM<sub>197</sub>, mutante de *C. diphtheriae* produtor de uma toxina diftérica alterada, como proteína carreadora) foi a primeira combinação de vacinas, que induz a proteção para difteria, tétano, pertussis e infecções por Hib, destacando-se que sua proteína carreadora é a toxina diftérica. Já a vacina PRP-T (ACTHib; Pasteur-Merieux, Lyon, França), utiliza como proteína carreadora o toxóide tetânico, e a PRP-OMP (PedvaxHib; Merck, West Point, NY, USA), utiliza um complexo protéico da membrana externa da *N. meningitidis* (Dennehy 2001; WHO 2001; CDC 2004; Finn, 2004).

O esquema vacinal a ser empregado depende de particularidades da vacina escolhida. Todas podem ser utilizadas a partir dos 15 meses de idade ou mais, e três são mais indicadas a partir dos 2 meses (PRP-T, PRP-OMP e HbOc). Para a vacina HbOc, o esquema vacinal utilizado é administração de uma dose no 2º mês, e outra no 4º mês, mas de modo geral para as outras vacinas, as doses são administradas no 2º, 4º e 6º mês de idade. Esse esquema é considerado próximo do ideal, já que mais de 90% dos infantes obtêm uma alta imunogenicidade com 2-3 doses. Para as vacinas PRP-T, PRP-OMP e HbOc é recomendado uma dose de reforço entre o 12º-15º mês. Para crianças entre 15 a 59 meses, recomenda-se uma dose única de qualquer umas das vacinas, sendo que a PRP-D é a mais recomendada nessas situações. Crianças com 60 meses ou mais, não necessitam imunização a partir da vacinação (Decker et al., 1992; Dennehy, 2001; CDC, 2004). Concentrações de IgA em torno de 0,15 a 1µg/mL no soro, garantem uma proteção para as crianças que utilizam a vacina para o Hib, de maneira efetiva (Kirkeby et al., 2000; CDC, 2004).

## **1.7 Impacto da introdução da vacina Hib-conjugada**

### *1.7.1 Eficácia da vacina Hib-conjugada*

A vigilância no cenário pós-introdução das vacinas Hib-conjugadas tem sido realizada, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos com resultados satisfatórios. Essa vigilância epidemiológica é imprescindível para avaliar o impacto da introdução da vacina na redução de pneumonias e meningites e da colonização da nasofaringe. Em países não industrializados a vacinação tem como principal objetivo a redução dos casos de meningite por *H. influenzae* (Bijlmer et al., 1992; Peltola, 2000; Campos et al., 2004; McVermon et al., 2004).

A avaliação do impacto da introdução da vacina remete a dados retrospectivos, em cenários anteriores a sua introdução, analisados de acordo com critérios específicos de valores, observando-se os registros de hospitalização por pneumonia e meningite. Em uma análise realizada de maneira global em mais de uma década, estima-se que aproximadamente 20% de crianças no mundo possuem um sistema de imunização por meio de uma vacina conjugada (WHO 2001). Em contraponto, em países desenvolvidos como os Estados Unidos, mais de 95% das crianças nascidas em 2002 foram vacinadas (CDC, 2004).

Por outro lado à escassez de dados locais de incidência, o alto custo da vacina e o desconhecimento da efetividade da vacina, em populações com características epidemiológicas e genéticas diferentes das dos países desenvolvidos, têm limitado sua incorporação aos programas de imunizações na maioria dos países em desenvolvimento (Lipsitch et al., 1997; Mulholland et al., 1997; Ramsay et al., 2003; Jones, 2005).

A respeito deste quadro complexo e alarmante, a utilização da vacina Hib-conjugada tem demonstrado excelentes resultados na redução dos casos de meningites e pneumonias pelo Hib, em torno de 80 a 90%. Nos Estados Unidos a incidência de meningites diminuiu de 50 a 60 por 100.000 habitantes, para uma média entre 1,6 a 6 por 100.000 habitantes. Na Europa, a redução da incidência passou de 20 por 100.000

habitantes para números entre 0,3 a 5,7 por 100.000 habitantes. Em estudo realizado na Gâmbia em 1997, após a introdução da vacina Hib-conjugada, observou uma redução de 100% dos casos de pneumonia pelo Hib, em crianças que receberam a vacina (Mulholland *et al.*, 1997). Nesse mesmo país, a incidência de meningite por Hib, antes da introdução da vacina (entre 1990 a 1993) era de 200 por 100.000 habitantes. Já no ano de 2000, não foram documentados casos em crianças menores de um ano de idade (Peltola, 2000; LaClaire *et al.*, 2003; Adegbola *et al.*, 2005).

A análise de alguns países e regiões que ainda não utilizam a vacina Hib-conjugada, é utilizada para comparar a epidemiologia das morbidades, principalmente de pneumonia e meningite, causadas em especial pelo Hib, como o caso de Hanói, no Vietnã, onde a vacina Hib-conjugada não foi introduzida. foram analisados 37 isolados de nasofaringe de crianças com IRA, com idade entre 2 a 60 meses, e 44 isolados de líquido, de crianças entre 1 a 24 meses, com suspeita de meningite. Dos 37 isolados de casos de IRA, 30 foram tipados como NC, quatro como Hib, dois como tipo c, e um como Hie. Já na análise realizada nos isolados de líquido dos casos de meningite, observou-se que todos eram Hib, refletindo-se nesse local, a epidemiologia do Hib como em várias partes do mundo, pré-introdução da vacina (Watanabe *et al.*, 2005). Em contraponto a esses dados, na Polônia, onde não existe ainda um programa de vacinação em massa para o Hib, em análise de 1272 isolados de *H. influenzae*, a partir de pacientes com alguma IRA, 5,6% foram identificados como capsulados. Desses isolados, 29 foram identificados como Hib, e surpreendentemente, 28 isolados foram identificados como Hie (Skocynska *et al.*, 2005).

Na América Latina alguns estudos avaliaram o impacto da vacina Hib-conjugada, especialmente na redução dos casos de pneumonia e meningite. No Uruguai, o primeiro país sul-americano onde a vacina Hib-conjugada foi introduzida, no final 1994, avaliou-se distribuição de casos por *H. influenzae*, de 1993 a 1997, analisando-se o cenário pré-introdução da vacina, e seu impacto no decorrer de três anos. Foram detectados 23 casos por Hib em 1993, 27 casos em 1994, e um caso apenas, de 1995 a 1997 (Montano *et al.*, 2001).

No Chile em 1999, determinou-se que o impacto da vacinação contra Hib reduziu em cinco vezes os casos de meningite. Para os casos de pneumonia, a redução observada foi de 26% para casos de positivos de cultura das amostras, e de 22% para aquelas com consolidação alveolar ou efusão pleural (Levine et *al.*, 1999).

A vacina Hib-conjugada também é efetiva na redução no número de outras morbidades causadas pelo por esse patógeno, como as epiglótites. Na era pré-vacina a incidência de epiglótite na Suécia passou de 20,9/100.000 para 0,9/100.000 habitantes após 10 anos de imunização rotineira contra Hib (Garpenholt et *al.*, 1999).

Efetivamente, sabe-se que a implementação das vacinas conjugadas altera rapidamente a epidemiologia das infecções por Hib. Muitas questões ainda precisam ser dimensionadas e respondidas, em especial, as implicações da mudança da microbiota autóctone da nasofaringe de portadores e a gravidade de possíveis casos após a vacinação (Olowokure et *al.*, 2000; Peltola 2001; Laval et *al.*, 2003; Andrade et *al.*, 2004; Finn, 2004; Jones, 2005; Vega-Briceno et *al.*, 2005).

### *1.7.2 Falhas vacinais e emergência dos tipos não-b*

Muitas análises desenvolvidas após a introdução das vacinas Hib-conjugadas mostram um declínio no número de casos de meningite pelo Hib, e possivelmente em consequência direta a esse fato, uma emergência no número de doenças invasivas causadas por tipos não-b ou por NC (Waggoner-Fountain et *al.*, 1995, Slack et *al.* 1998, Adderson et *al.*, 2001, Heath et *al.*, 2001; Vega-Briceno et *al.*, 2005). Além disso, existem relatos que evidenciam uma re-emergência do Hib, talvez em decorrência de falha vacinal, o que consistiria em um grave problema a médio e longo prazo nessas regiões. Destaca-se que os dados e conclusões desses estudos são extremamente valiosos para a implementação de possíveis ajustes nos sistemas de vigilância em outras regiões (Lucher et *al.*, 2002).

Observa-se também que é necessário compreender-se as implicações do impacto da introdução da vacina, em regiões de pouca ou nenhuma industrialização, especialmente em populações distintas das demais existentes no restante de um determinado país, como ocorre em algumas regiões dos Estados Unidos. A introdução da vacina em tribos Navajo e apaches, localizadas no Colorado, promoveu uma redução de 90% dos casos de meningites por Hib. Já no Alaska, em um período de 10 anos, observou-se uma redução dos casos de infecções pelo Hib, mas também verificou-se um aumento de casos por outros tipos não-b (Perdue et al., 2000; Millar et al., 2002).

Uma preocupação constante, referente à implementação da vacina Hib-conjugada nos esquemas vacinais de crianças menores de cinco anos, é a possível re-emergência do Hib, possivelmente em decorrência de uma falha vacinal. Uma falha vacinal é caracterizada quando o Hib é isolado no líquido ou sangue de: (i) criança maior de um ano, após duas semanas da administração da vacina; (ii) criança menor de um ano, após uma semana da administração da segunda dose da vacina; (iii) ou de criança que recebeu as três doses da vacina (Heath et al., 2000). Os primeiros relatos de falha vacinal surgiram em 2001 no Reino Unido, onde a vacina foi introduzida em 1992. Em 1991, ocorreram 907 casos de doenças invasivas por Hib, sendo que sete anos depois, em 1998 registrou-se apenas 38 casos. A falha vacinal foi detectada a partir de 2001, com o número de 144 casos, atingindo 266 casos em 2002. A incidência que era de 0,92 por 100.000 habitantes em 1996, mais que triplicou em 2002, atingindo 2,81 por 100.000 habitantes. Cabe ressaltar, que essa falha vacinal, surgiu em um sistema que adotava rigorosamente o esquema vacinal de três doses, aplicadas no 2º, 3º e 4º meses de idade, mas sem reforço adicional entre os 15-18 meses. Assim algumas hipóteses são correlacionadas a essa re-emergência do Hib: (i) a adoção de um esquema vacinal, com intervalos curtos de um mês utilizando a vacina Hib com a tríplice acelular (HbOc), sem a dose de reforço; (ii) a queda na taxa de cobertura vacinal; (iii) a entrada de portadores imigrantes, tanto crianças como adultos (Garner & Weston; 2003; Trotter et al., 2003; Pushparajah et al., 2003).

Outra falha vacinal foi observada no Alaska detectada, em portadores e pacientes de invasivas na população rural. A vacina-conjugada PRP-OMP foi introduzida no Alaska em 1991, sendo utilizada até janeiro de 1996. A partir desta data, passou-se a utilizar a vacina

HbOC em dose única administrada em clínicas pediátricas, com o objetivo de se reduzir o número de doses que a criança precisaria receber, em virtude das dificuldades de deslocamento dentro do território inóspito dessa região. Nesse mesmo ano, detectou-se o aumento número de casos por Hib em crianças imunizadas, e em 1997, os sobreviventes tornaram-se portadores do Hib. As hipóteses para esse fenômeno correlacionam a combinação de dois fatores implicados na troca das vacinas: (i) a vacina PRP-OMP ofereceria uma proteção imunológica para as crianças, mas não reduziria o número de crianças colonizadas; (ii) a vacina HbOC não ofereceria uma imunização satisfatória após uma única dose, determinando-se a re-emergência (Lucher et al., 2002).

Com a introdução da vacina conjugada Hib, acredita-se também que outros tipos não-b, e cepas NC que colonizam o trato respiratório superior de indivíduos saudáveis possam desencadear problemas (Saito et al., 1999).

Em 2001, nos Estados Unidos, em dez meses de estudos retrospectivos, que abrangeu os anos de 1998 e 1999, foram detectados cinco casos de doenças invasivas por Hia. Utilizando técnicas moleculares, entre elas a PCR, esses isolados foram caracterizados com o objetivo de fornecer dados que justificassem esses casos. Os pacientes eram cinco crianças, na faixa de 6 a 13 meses, que apresentavam bacteremia e meningite, quatro dos quais com os mesmos sintomas de quadro infeccioso por Hib. As cinco cepas pertenciam a dois grupos clonais, e as crianças eram de regiões diferentes dentro do estado de Utah. Três cepas que eram responsáveis pelo quadro de meningite e bacteremia, possuíam uma cópia do segmento *IS1016-bexA* com deleção, sugerindo que este fator justificasse a severidade do quadro observado nos pacientes. Esses dados reforçam a necessidade do monitoramento dos casos de morbidades causadas pelo *H. influenzae*, em especial, através da tipagem pela PCR, inclusive pesquisando-se a presença de fatores de virulência como a cópia com deleção do segmento *IS1016-bexA*, fornecendo resultados mais confiáveis para o sistema de vigilância epidemiológica (Adderson et al., 2001).

Na Espanha, após a introdução da vacinação em 1996, identificaram-se 26 Hie, entre abril de 1998 a dezembro de 2002, caracterizados pela PCR. Esse tipo capsular foi responsável por 14 casos de infecções respiratórias (9 com pneumonia) e 4 associados à

conjuntivite. Os outros isolados foram responsáveis por vaginite, abscesso, celulite, septicemia ou meningite. Das 26 cepas, 5 (19,2%) foram isoladas em menores de cinco anos, e o restante foi isolado de pacientes maiores de 16 anos. Seis cepas (20,1%) apresentavam multiresistência (Campos *et al.*, 2003a).

Também na Espanha foram avaliados os perfis de suscetibilidade de 49 cepas de Hif, tipados pela técnica de PCR, isolados de casos ocorridos entre os anos de 1996 e 2002. Desses, 24,5% eram resistentes a ampicilina e 18,4% apresentaram multiresistência para mais de três antimicrobianos utilizados no esquema terapêutico de rotina (Campos *et al.*, 2003c).

A emergência do Hif, é extremamente preocupante, em especial devido ao seu alto índice de mortalidade, em torno de 30%, mesmo que em muitos casos ocorram em adultos (Slater *et al.*, 1990; Urwin *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 2003c; Meats *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004). Uma característica observada pelo Hif é a sua virulência apresentada em infantes, como observado no histórico de criança de 4 anos, que apresentava febre baixa e vômitos, que posteriormente veio a óbito. O Hif foi isolado no sangue dessa criança, que não apresentava nenhuma doença de base ou qualquer fator que pudesse ser relacionado a esse quadro (Zacharisen *et al.*, 2003). Em recente estudo, analisando-se cepas de Hif, da Dinamarca e dos Estados Unidos, isoladas de doenças invasivas e não-invasivas, observou-se, por meio de técnicas moleculares, que se tratavam de um mesmo clone Hif, sugerindo-se que ele estaria em expansão no cenário pós-vacinação, reforçando a necessidade de implementar a tipagem capsular, pelas técnicas de PCR, objetivando-se monitorar de forma correta, uma possível emergência desse patógeno. (Bruun *et al.*, 2005).

## **1.8 Introdução da vacina Hib-conjugada no Brasil**

No Brasil, algumas análises epidemiológicas foram desenvolvidas, pelo Instituto Adolfo Lutz, em período muito anterior a introdução da vacina Hib-conjugada. Essas

análises tinham como objetivo caracterizar e correlacionar a prevalência dos tipos capsulares e biotipos circulantes na cidade de São Paulo, com outras regiões mundiais. Foram analisadas 1094 isolados, dos quais, 1087 (99,4%) pertenciam ao Hib, sendo que destes, 775 (70,9%) pertenciam ao biótipo I. Esses resultados demonstraram uma correlação com outros cenários epidemiológicos observados na época da análise, como no Sul da África, Estados Unidos, Dinamarca, Europa e Papua Guiné (Landgraf & Vieira, 1993).

Em 1999, a Hib-conjugada foi introduzida no Programa Nacional de Imunização como rotina no Brasil, mas foi implantada, de forma experimental, em duas cidades do Paraná, na Região Sul do país: Londrina e Curitiba. Em Londrina, o coeficiente de incidência de meningite por Hib foi reduzido de 23,91 por 100.000 habitantes em 1996, para 2,79 por 100.000 habitantes em 1999, após a introdução da vacina, situação semelhante a estabelecida em Curitiba. Nos demais municípios do Paraná que não dispunham dessa vacina, os índices de incidência da meningite por Hib permaneceram os mesmos (Takemura et al., 2001).

Em Porto Alegre, também no sul do país, a diminuição dos casos de meningites por Hib esteve associada com a realização da vacinação em larga escala, a partir da introdução da vacina Hib-conjugada. Essa análise foi realizada a partir da avaliação da incidência das meningites por Hib, entre os anos de 1995 a 2001. Em 1995 a incidência foi de 1,35 caso por 100.000 habitantes, e em 2001 a incidência foi de 0,15 caso por 100.000, ocorrendo uma diminuição de 89%. No mesmo período, a letalidade das meningites por Hib diminuiu de 17,8% para 6,7% (Kmetzsch et al., 2003).

Estudo realizado em Salvador, Brasil, também demonstrou uma redução de 69% na incidência de Hib (2,62 para 0,81 casos/100000), já no primeiro ano após a introdução da vacina, em 2000. Em contraste, ocorreu um aumento de oito vezes no número de meningites, causadas pelo Hia, apresentando uma virulência não verificada em casos pré-introdução da vacina (Ribeiro et al, 2003).

Com o objetivo de avaliar o impacto da vacina Hib-conjugada em três regiões brasileiras, formadas pelos estados Pernambuco, Santa Catarina e Rio de Janeiro, foram

analisados 229 isolados de *H. influenzae*, de casos de meningite (n = 189), septicemia (n = 3) e secreção brônquica (n = 37), relativos aos anos de 1990 a 2003. Desses isolados, 167 datavam de um período pré-introdução da vacina, sendo que 165 foram tipados como Hib, e 2 isolados como Hia. Demonstrando o impacto da vacina, na redução de morbidades causadas pelo Hib, dos 64 isolados referentes ao período pós-introdução da vacina, que compreendeu os anos de 1999 a 2003, 33 eram Hib, três Hia, três do tipo c, também três do tipo d, um Hie, um Hif e 18 NC (Almeida et al., 2005).

### **1.9 Introdução da vacina Hib-conjugada em Goiânia**

Em Goiânia, como em todo território brasileiro, a primeira vacina utilizada contra Hib, foi a vacina conjugada com a proteína diftérica (CRM<sub>197</sub>; HibTITER®; Wyeth® Lederle), administrada entre julho a novembro de 1999. Posteriormente a esta data, foi utilizada a vacina composta pelo polissacarídeo do Hib conjugado com o toxóide tetânico (PRP-T) produzida pelo laboratório nacional Biomanguinhos (Fundação Oswaldo Cruz – Ministério da Saúde). A agenda vacinal foi elaborada para ser administrada em três doses nas crianças menores de 12 meses (2º, 4º e 6º meses de idade) e dose única para crianças de 12 a 24 meses. (Caetano, 2001)

Com apoio da divisão de imunização e vacinas da *Pan American Health Organization* – W.D.C. e pelo *Bill and Melinda Gates Children's Vaccine Program* e da Secretaria da Saúde do Município de Goiânia, instituiu-se uma rede de vigilância epidemiológica, com o objetivo de avaliar as meningites e pneumonias causadas pelo *H. influenzae*. Estruturalmente, essa rede epidemiológica abrange 20 hospitais pediátricos do município, o que corresponde a aproximadamente 90% das internações de crianças por pneumonia e meningite, na cidade de Goiânia. Em maio de 2002 este sistema agregou um componente ambulatorial de vigilância de crianças atendidas nos consultórios do pronto atendimento do Hospital Materno Infantil (HMI) da Secretaria da Saúde do Estado de Goiás, que concentra a maior demanda pediátrica do município (Caetano, 2001)

Laval e colaboradores, em 2003, estudaram os perfis fenotípicos e genotípicos das meningites em Goiás, durante o período de maio de 2000 a agosto de 2001, após a introdução da vacina Hib-conjugada. A caracterização genotípica foi realizada com auxílio da técnica de PFGE *pulsed-field gel electrophoresis*, ou eletroforese em campo elétrico variável. Nesse período foram analisados 78 casos de meningites bacterianas, sendo que se detectou 13 isolados (16,7%) de *H. influenzae*. Desses isolados, 10 foram caracterizados como Hib. Quatro cepas foram isoladas de crianças que não tinham recebido nenhuma dose da vacina, em uma criança que tinha recebido duas doses isolou-se uma cepa, quatro foram isoladas de crianças que tinham recebido apenas uma dose, e uma cepa foi isolada de criança que recebeu as três doses. Nesta última criança, ficou configurada a detecção de falha vacinal. Os três isolados restantes foram caracterizados como tipo a. Entre os Hia, uma cepa foi isolada de criança que tinha recebido as três doses da vacina, outra foi isolada de uma criança que recebeu duas doses, e uma foi isolada de uma criança que não tinha recebido nenhuma dose da vacina (Laval et al., 2003).

Em 2004, Simões e colaboradores avaliaram o impacto da vacinação contra o Hib na incidência de meningites em crianças menores de cinco anos de idade utilizando-se a prospecção do tipo antes e depois para comparar as taxas de incidência de meningites por *H. influenzae* b nos períodos pré-vacinação (julho/95-junho/99) e pós-vacinação (julho/99-junho/2001) no Estado de Goiás. Detectaram-se 979 crianças com meningite bacteriana aguda, com a incidência de meningite por *H. influenzae* b diminuindo de  $10,8 \times 10^5$  no período pré-vacinal, para  $2,3 \times 10^5$  no segundo ano após a introdução da vacina, significando uma redução de 78,0% no risco de infecção por esse patógeno, principalmente na faixa etária de 7-23 meses. Observou-se ainda, falha vacinal em um caso. Esse expressivo declínio da incidência de meningite por Hib foi detectado, precocemente, logo após o primeiro ano de introdução da vacina (Simões et al., 2004).

Dessa forma é fundamental a caracterização dos perfis colonizadores e prevalência dos sorotipos isolados de *H. influenzae*, para a avaliação do impacto da introdução da vacinação Hib, e posterior análise dos dados do comportamento epidemiológico do *H. influenzae* nessa região.

A tipagem molecular do *H. influenzae* isolados de nasofaringe fornece dados epidemiológicos importantes para direcionar o tratamento específico nas morbidades causadas por estes agentes, em especial em crianças, bem como subsídios para a introdução de medidas profiláticas na cidade de Goiânia, onde a determinação da prevalência dos tipos de *H. influenzae*, pela técnica de PCR, são imprescindíveis, auxiliando na implementação de medidas e ações envolvidas na cadeia epidemiológica, de conformidade com o monitoramento do *H. influenzae*.

## 2. Objetivos

- Avaliar a prevalência de *H. influenzae* em crianças de 0 a 5 anos, atendidas em ambulatórios e hospitais de referência, no município de Goiânia, pós introdução da vacina Hib-conjugada.
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados a dois antimicrobianos.
- Determinar a tipagem capsular dos isolados de *H. influenzae* pela técnica de PCR.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Área de estudo e população**

O estudo foi realizado no município de Goiânia, capital do estado de Goiás, entre maio de 2000 a agosto de 2001, como componente do projeto de Vigilância de Pneumonias e Meningites (VIGPEM).

A cidade de Goiânia possui aproximadamente 1.181.438 habitantes, com uma população estimada em 95.105 crianças, na faixa etária de 0 a 4 anos, com a média de 22.500 infantes nascidos vivos ao ano, e com uma taxa de mortalidade infantil de 16 por 1000 (IBGE, 2000). O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), assim como pelo Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP).

A estrutura do estudo foi baseada na análise da taxa de prevalência de portadores do *H. influenzae*. A coleta realizada abrangeu um total de 648 crianças menores de 5 anos, apresentavam as seguintes características: (i) crianças hospitalizadas com pneumonia radiologicamente confirmada por condensação e/ou derrame; (ii) crianças hospitalizadas com alguma outra IRA (WHO 1999b), incluindo principalmente bronquite, pneumonia de padrão radiológico não bacteriano, asma e viroses; (iii) crianças com meningite bacteriana aguda de acordo com critérios da OMS (WHO 1999); (iv) crianças saudáveis que procuravam os centros de saúde por outras razões. Dessas crianças, 269 apresentavam algum quadro de IRA, incluindo-se pneumonia, 77 com meningites e 302 crianças sem nenhum sintoma clínico estabelecido que procuravam os mesmos centros de saúde por outras razões.

Na rede de vigilância estabelecida para o projeto, foram incluídos 20 hospitais pediátricos, dos setores público, privado, universitário e filantrópico. Essa rede de atendimento é responsável por mais de 90% das internações por estas morbidades no

município. Da mesma forma, as crianças com meningite foram recrutadas de 7 hospitais que notificaram os casos de meningite da cidade. Um questionário foi elaborado e aplicado aos responsáveis pela criança, com o objetivo de estabelecer o histórico de eventuais morbidades, possível utilização de vacinas, e potenciais fatores associados à colonização pelo *H. influenzae*.

### **3.2. Coleta das amostras**

#### **3.2.1 Coleta de swabs nasofaríngeos**

Após o consentimento informado ter sido assinado pelos pais ou responsável, procedeu-se a coleta do material da nasofaringe das crianças. As amostras foram coletadas utilizando-se swabs, seguindo os procedimentos de biossegurança (WHO 1999). Um *transwab* (Medical Wire & Equipament Corsham, UK) ultrafino e flexível foi introduzido na narina da criança, até aproximadamente 2/3 da distância do nariz ao lóbulo da orelha, na direção horizontal. Após encontrar resistência na parede posterior da nasofaringe, movimentos giratórios lentos eram realizados com o *transwab* (Medical Wire & Equipament Corsham, UK), removendo-o a seguir, e introduzido-o no tubo contendo o meio para transporte modificado de Stuart.

As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor não resfriadas, e enviadas imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG).

### 3.3. Isolamento e identificação

Os procedimentos laboratoriais para o isolamento e identificação do *H.influenzae* obedeceram às normas preconizadas pela OMS (WHO, 1999; ANVISA, 2004). As amostras de nasofaringe foram semeadas em placas de ágar chocolate suplementadas com bacitracina (300 µg para cada 100mL), e incubadas em jarras de anaerobiose com 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 a 48 horas.

Colônias com características macroscópicas de *H. influenzae* foram submetidas à coloração de Gram. Os isolados com características de cocobacilos Gram-negativos foram submetidos à prova do satelitismo e série bioquímica (fermentação da glicose, xilose, lactose, manose, sacarose; descarboxilação da ornitina, produção de indol e urease), de acordo com o Manual de Identificação de *H. influenzae*, da Organização Mundial da Saúde (WHO 1999).

A prova de caracterização dos tipos capsulares, pela da técnica de PCR, e o perfil de resistência aos antimicrobianos, foram realizadas no Instituto Adolf Lutz, em São Paulo, sob coordenação da Dra. Maria Cristina Brandileone.

#### 3.3. .Prova do satelitismo

Os isolados foram cultivados em ágar chocolate, incubados por 18-24 horas em ambiente de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para realização do teste, fazia-se uma suspensão em 2mL salina, até atingir a turbidez equivalente a metade da escala 1 de MacFarland.

Posteriormente, os isolados foram semeados com *swab* em ágar sangue, de maneira uniforme, deixando secar por 15 minutos em fluxo laminar. Em seguida, semeava-se o *S. aureus* (ATCC 23922), a partir de cultura de 24 horas, com auxílio de uma alça de platina, em forma de X, incubando-se por 24-48 horas em ambiente de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O resultado era considerado positivo apenas se houvesse desenvolvimento de colônias próximas à estria de *S. aureus*.

### 3.3.2 Provas de fermentação de carboidratos

Para realização das provas de fermentação de carboidratos utilizou-se a base para meio de cultura *Phenol Red Broth Base PRD* (Difco), suplementados com hemina a 0,2%, e NAD também a 0,2%, tinalizada.

Em cinco tubos de ensaio, distribuía-se 5mL do meio e acrescentava-se 0,2 mL de um dos seguintes carboidratos: glicose, lactose, sacarose, xilose e manose.

Os isolados eram repicados em ágar chocolate, incubados a 37°C por 24 horas. A partir dessas culturas de 24 horas, transferia-se colônias para obter uma suspensão em 2 mL de salina, até atingirem uma turbidez equivalente à metade da escala 1 de MacFarland. Em seguida, transferia-se quatro gotas dessa suspensão para os tubos contendo os carboidratos, que eram incubados por até 7 dias em ambiente de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O *H. influenzae* fermenta somente a glicose, ou a glicose e a xilose. A positividade do teste é dada a partir da acidificação dos meios, indicada pela cor amarelada que o meio adquire.

### 3.3.3. Produção de urease e indol

Para a verificação da produção de urease e indol, utilizou-se o meio Uréia/Indol (Difco), esterelizado por tindalização. Colocava-se em um tubo, 5mL desse meio, e a partir da mesma suspensão feita para a prova de fermentação de carboidratos, transferia-se 4 gotas, com incubação por até 7 dias em ambiente de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Considerava-se a positividade da reação a partir da coloração vermelha adquirida pelo meio, devido a metabolização da uréia, evidenciada pelo reativo de Kovacs.

### *3.3.5 Descarboxilação da ornitina*

Para a realização do teste da descarboxilação da ornitina empregava-se o meio L-ornitina descarboxilase (descarboxilase base Mueller, Difco) tindalizado.

Os isolados foram repicados em ágar chocolate, incubados a 37°C que após 24 horas, transferia-se as colônias de cada isolado, para 2 mL de salina, até atingirem uma turbidez equivalente à metade da escala 1. Em um tubo de ensaio, transferia-se 5mL do meio e quatro gotas da suspensão. Com o objetivo de criar um ambiente de aerobiose, cobria-se a superfície do meio com óleo mineral, incubando-se cada tubo a 37°C, por até 7 dias.

A partir da retirada do grupo carboxílico da ornitina, verifica-se a alcalinização do meio, que adquiria uma cor violeta, indicando a positividade do teste.

## **3.4. Teste de suscetibilidade**

### *3.4.1 Preparação do Meio Haemophilus de Teste (MTH)*

A preparação do HTM foi realizada utilizando uma solução padrão fresca de hematina dissolvendo-se 50 mg de hematina em pó em 100 mL de NaOH a 0,01 mol/L aquecendo e mexendo até dissolução completa do pó de hematina. A seguir, acrescentava-se 30 mL da solução estoque de hematina a 1 L de ágar Müeller-Hinton, acrescentando-se também de 5 g de extrato de levedura. Após autoclavagem e resfriamento do meio, adicionavam-se, assepticamente, 3 mL de solução de NAD (50 mg de NAD dissolvidos em 10 mL de água destilada, esterilizada por filtração).

#### 3.4.2 *Difusão em disco*

Todos os isolados de *H. influenzae* identificados foram submetidos ao teste de disco difusão, conforme preconizado pelo NCCLS (NCCLS, 2003). Após subcultivos em agar chocolate e por 16-18 horas a 37°C, um inóculo padrão de 3 a 4 x 10<sup>8</sup> ufc/mL (metade dos componentes da escala 1,0 de MacFarland) foi utilizado para a semeadura em placas de MHT com o auxílio de um swab estéril. Sobre as placas já inoculadas foram depositados discos de trimetoprim-sulfametaxazol (1,25µg) e de ampicilina (10µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Utilizaram-se as cepas *H. influenzae* ATCC 49247 e ATCC 49766 como controle.

#### 3.5 *Tipagem capsular pela PCR*

A suspensão do DNA dos *H. influenzae* foi preparada, transferindo-se de 4 a 6 colônias cultivadas em ágar chocolate por 24 horas a 37°C, para 60 µL de água esterilizada. Essa suspensão era aquecida até a fervura por 10 minutos e centrifugada de 3 a 5 minutos a 1.300 rpm (Marathon 26kmm, Fischer Scientific). O sobrenadante era armazenado a -20 °C.

Para a realização do PCR, foram utilizados os *primers* que estão apresentados na Tabela 1. Os *primers* HI-1 E HI-2, para a detecção do gene *bexA*, presente nos tipos

capsulares, para diferenciação dos tipos NC, e os *primers* específicos ( $a_1, a_2, a_3/ b_1, b_2, b_3/ c_1, c_2, c_3/ d_1, d_2, d_3/ e_1, e_2, e_3/ f_1, f_2, f_3$ ) de acordo com Falla e colaboradores (1994). Foram realizadas duas ampliações: a primeira utilizando-se os *primers* HI1 e HI2, para a amplificação do *bexA* e os *primers* 1 e 2 para cada tipo capsular ( $a_1, a_2/ b_1, b_2 / c_1, c_2, / d_1, d_2, / e_1, e_2, / f_1, f_2$ ), além dos *primers* 3 internos ( $a_3/ b_3/ c_3/ d_3/ e_3/ f_3$ ). Para a confirmação dos casos onde a amplificação foi negativa, era realizada uma segunda amplificação. Desta vez com os *primers* utilizados eram HI1 e HI3, a título de confirmação para a seqüência do *bexA*, e os *primers* 2 e 3 de cada tipo ( $a_2, a_3/ b_2, b_3/ c_2, c_3/ d_2, d_3/ e_2, e_3/ f_2, f_3$ ). De acordo com resultado da realização das duas ampliações, observava-se uma das seguintes interpretações: positivo para amplificação do gene *bexA* e um dos genes responsáveis pelo polissacarídeo específico de cápsula, a amostra era considerada como um determinado tipo capsular específico: (i) negativo para o gene *bexA*, e positivo para gene tipo capsular específico, a amostra era considerada mutante capsular  $b^-$ ; (ii) negativo para o gene *bexA*, e negativo pra o gene tipo capsular específico, a amostra era considerada NC (Falla *et al*, 1994).

O *mix* da PCR foi constituído de 25  $\mu$ L do tampão da PCR, 200  $\mu$ L de deoxirribonucleotídeos, 1mM de cada *primer* específico e 0,5 U de *Taq* DNA-polimerase (Gibco BRL Life Technologies). Era utilizado também um *primer* derivado de uma seqüência de um gene codificante da lipoproteína P6, da membrana externa, presente tanto nos isolados capsulados como no NC, para controle da técnica (van Ketel *et al.*, 1990). A esse *mix* era adicionado 1 $\mu$ L da amostra (DNA), realizando-se amplificação (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) com uma temperatura de 55°C para o anelamento.

O produto da amplificação do DNA era aplicado em gel agarose a 1,0% (Sigma) e a corrida eletroforética realizada por 1 hora a 100v. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp (Gibco BRL Life Technologies). O gel de agarose foi corado com brometo de etídio para a evidenciação do produto da amplificação pela PCR.

**Os Resultados, Discussão e Conclusões estão apresentados na forma de artigo**

#### 4. Referências Bibliográficas

- Acar, J 1999. Resistance patterns of *Haemophilus influenzae*. *J Chemother* 11:44-50.
- Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyeh M, Carroll K, Mottice S, Korgenski EK, Christenson JC, Pavia AT 2001. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: Emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatr* 108: E18.
- [Adegbola RA](#), [Secka O](#), [Lahai G](#), [Lloyd-Evans N](#), [Njie A](#), [Usen S](#), [Oluwalana C](#), [Obaro S](#), [Weber M](#), [Corrah T](#), [Mulholland K](#), [McAdam K](#), [Greenwood B](#), [Milligan PJ](#) 2005. Elimination of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease from The Gambia after the introduction of routine immunisation with a Hib conjugate vaccine: a prospective study. *Lancet* 366: 144-150.
- [Allen S](#), [Zaleski A](#), [Johnston JW](#), [Gibson BW](#), [Apicella MA](#) 2005. Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immunol* 73: 5291-5300.
- [Almeida AE](#), [de Filippis I](#), [Abreu AO](#), [Ferreira DG](#), [Gemal AL](#), [Marzochi KB](#) 2005. Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Braz J Med Biol Res* 38: 777-781.
- Andrade, ALSS, Andrade, JG, Martelli, CMT, Silva, SA, Oliveira, RM, Costa, MSN, Laval, CB, Ribeiro, LHV, Di Fabio JL 2004. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine on childhood pneumonia: a case-control study in Brazil. *Inter J Epidemiol* 33: 173-181.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, Módulo V, Ministério da Saúde, Brasília DF.
- Bajanca P, Canica M, Multicenter Study Group, 2004. Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). *J Clin Microbiol* 42: 807-810.
- Barry AL, Fuchs PC, Brown SD 2001. Identification of beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media. *Antim Ag Chem* 45:1585-1588.
- Behrman RE & Kliegman RM 1999. Princípios de Pediatria. 3ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 690p.

Bergman NH & Akerley BJ 2003. Position-Based Scanning for Comparative Genomics and Identification of Genetic Islands in *Haemophilus influenzae* Type b. *Infect Immunol* 7: 1098–1108.

Bergstrom CT, McElhany P, Real LA 1999. Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5095–5100.

Berkley JA, Lowe BS, Phil M, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S, Ngetsa C, Slack MPE, Njenga S, Hart CA, Maitland K, English M, Marsh K, Scott JAG 2005. Bacteremia among Children Admitted to a Rural Hospital in Kenya. *N Engl J Med* 352: 39-47.

Bijlmer HA, van Alphen L, van den Broek LG, Greenwood BM, Valkenburg HA, Dankert J 1992. Molecular Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b in The Gambia. *J Clin Microbiol* 165: 386-390.

Black SB, Shinefield HR, Fireman B, Hiatt R, Polen M, Vittinghoff E 1991. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61080 children. *Pediatr Infect Dis J* 10: 97–104.

Bokermann S, Zanella RC, Lemos APS, Andrade AALS, Brandileone MCC 2003. Evaluation of Methodology for Serotyping Invasive and Nasopharyngeal Isolates of *Haemophilus influenzae* in the Ongoing Surveillance in Brazil. *J Clin Microbiol* 41: 5546–5550.

Booy R & Kroll JS 1997. Is *Haemophilus influenzae* finished? *J Antimi Chem* 40: 149–153.

Breukels MA, Rijkers GE, Voorhorst-Ogink MM, Zegers BJM 1999. Regulatory T Cells in the Antibody Response to *Haemophilus influenzae* Type b Polysaccharide. *Infect Immunol* 67: 789–793.

[Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A 2000.](#) The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 1: S87-95.

Bruun B, Gahrn-Hansen B, Westh H, Kilian M 2004. Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States. *J Med Microbiol* 53: 1161-1165.

Brunham, RC, Plummer FA, Stephens SA. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infect Immunol* 61: 2273–2276.

Caetano, EL. Prevalência de portador e sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* em nasofaringe de crianças menores de 5 anos de Goiânia, 2001 – Goiás. Tese de Dissertação de Mestrado, Goiás: Instituto de Patologia e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

Campos J, Roman F, Perez-Vazquez M, Oteo J, Aracil B, Cercenado E 2003a. Infections Due to *Haemophilus influenzae* Serotype E: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. Teh Spanish Study Group for *Haemophilus influenzae* type e. *Clin Infect Dis* 15: 841-845.

Campos J, Aracil B, Román F, Vázquez MP, and the Collaborative Group for Hib Vaccine Failures 2003b. Molecular Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Type b Isolated from Children with Clinical Cases of Conjugate Vaccine Failures. *J Clin Microbiol* 41: 3915–3918.

Campos J, Román F, Aracil B, Vázquez MP, Oteo J and the Spanish Study Group for *H. influenzae* type f 2003c. Antibiotic resistance and clinical significance of *Haemophilus influenzae* type f *J Ant Chem* 52: 961–966.

Campos J, Hernando M, Román F, Vázquez MP, Aracil B, Oteo J, Lázaro E, Abajo F and the Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain 2004. Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae* Infections after Extensive Vaccination against *H. influenzae* Type b. *J Clin Microbiol* 42: 524–529.

[Cardoso MR, Cousens SN, de Goes Siqueira LF, Alves FM, D'Angelo LA 2004.](#) Crowding: risk factor or protective factor for lower respiratory disease in young children? *BMC Pub Hea* 4: 1-8.

Casagrande ST, Landgraf IM, Kobata AMM, Zanella RC, Bokermann S 2002. Antimicrobial resistance among invasive *Haemophilus influenzae* strains: results of a Brazilian study carried out from 1996 through 2000. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* *Braz J Med Biol Res* 35: 1293-1300.

Catlin, BW, Bendler JW, Goodgal SH 1972. The type b capsulation locus of *Haemophilus influenzae*: map location and size. *J Gen Microbiol* 70: 411-422.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2004. Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children—United States, 2000-2002. *MMWR* 51:234-7.

**1.1.1 Celal A, Faruk G, Salih H, Kemal C, Serife A, Faruk K 2004. Characteristics of acute bacterial meningitis in Southeast Turkey. *Ind J Med Sci* 58: 327-333.**

Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Renna G, Tozzi AE, Garlaschi ML, Mastrantonio P 2000. Characterization of non-type b *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. *J Clin Microbiol* 38: 4649–4652.

Cerquetti M, Ciofi ML, Cardines R 2003. Invasive type E *Haemophilus influenzae* disease in Italy. *Emerg Infect Dis* 9: 258–261.

Chambers HF 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7: 178-182.

Clemans DL, Marrs CF, Bauer RJ, Patel M, Gilsdorf JF 2001. Analysis of Pilus Adhesins from *Haemophilus influenzae* Biotype IV Strains. *Infect Immunol* 69: 7010–7019.

Cole AM, Tahk S, Orien A, Yoshioka D, Kim YH, Park A, Ganz T 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Diagn Labor Immunol* 8: 1064-1069.

Corn, PG, Anders J, Takala AK, Kayhty H, Hoiseth SK 1993. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. *J Infect Dis* 167: 356–64.

[Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB 2001.](#) Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39: 1553-1558.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Scienc* 284: 1318-1322.

Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelisser R, Faucon G, Bennamani S, Pasquier C 2002. Diversity of beta-lactam resistance-conferring aminoacid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Ant Ag Chem* 46: 2208–2218.

Daines DA, Jarisch J, Smith AL 2004. Identification and characterization of a nontypeable *Haemophilus influenzae* putative toxin-antitoxin locus. *BMC Microbiol* 4:30.

Daum RS, Murphey-Corb M, Shapira E, Dipp S 1988. Epidemiology of ROB beta-lactamase among ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolated in the United States. *J Infect Dis* 157: 450–455.

Davey ME & O'Toole GA 2000: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol* 64: 847-867.

Dawid S, SJ Barenkamp, St Geme III JW. 1999. Variation in expression of *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1077–1082.

Debbia EA, Schito GC, Zoratti A, Gualco L, Tonoli E, Marchese A 2001. Epidemiology of major respiratory pathogens. *J Chemoter* 13: 205-211.

Decker MD, Edwards KM, Palmer P, Brandley R 1992. Booster response to four *Haemophilus influenzae b* (Hib) conjugate vaccines. *Pediatr Res* 31: 90.

Dennehy PH 2001. Active Immunization in the United States: Developments over the Past Decade. *Clin Microbiol* 4: 872–908.

Doern GV, Jorgensen JH, Thornsberry C, Proston DA, and the *Haemophilus influenzae* Surveillance Group 1986. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*: a collaborative study. *Diagn Microbial Infect Dis* 4: 95–107.

Doern GV, Brueggemann BA, Pierce G, Horry HP, Rauch A 1997. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. *Ant Ag Chem* 41: 292–297.

Donlan RM 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33: 1387-1392.

[Ecevit IZ, McCrea KW, Pettigrew MM, Sen A, Marrs CF, Gilsdorf JR 2004.](#) Prevalence of the hifBC, hmw1A, hmw2A, hmwC, and hia Genes in *Haemophilus influenzae* Isolates. *J Clin Microbiol* 42: 3065-3072.

Erwin AL, Nelson KL, Mhlanga-Mutangadura T, Bonthuis PJ, Geelhood JL, Morlin G, Unrath WCT, Campos J, Crook DW, Farley MM, Henderson FW, Jacobs RF, Muhlemann K, Satola SW, van Alphen L, Golomb M, Smith AL 2005. Characterization of Genetic and Phenotypic Diversity of Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immunol* 73: 5853–5863.

Façanha MC & Pinheiro AC 2004. Doenças respiratórias agudas em serviços de saúde entre 1996 e 2001, Fortaleza, CE. *Rev de Saud Pub* 38: 346-350.

Falade AG, Mulholland EK, Adegbola RA, Greenwood BM 2001. Bacterial isolates from blood and lung aspirate cultures in Gambian children with lobar pneumonia. *Ann Trop Paediatr* 1997: 315–319.

Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskell D, Kroll KS, Moxon ER 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 32: 2382–2386.

Feil E J, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Day NPJ, Enright MC, Goldstein R, Hood DW, Kalia A, Moore AE, Zhou JE, Spratt BG 2001. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 182–186.

Finn A 2004. Bacterial polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Br Med Bull* 31: 1-14.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Scien* 269: 496-512.

Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW 1998. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 294–308.

Fraser CM, Eisen J, Fleischmann RD, Ketchum KA, Peterson S 2000. Comparative Genomics and Understanding of Microbial Biology. *Emer Infect Dis* 6: 505-512.

[Galan JC, Morosini MI, Baquero MR, Reig M, Baquero F 2003.](#) *Haemophilus influenzae* bla(ROB-1) mutations in hypermutagenic deltaampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and beta-lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. *Ant Ag Chem* 47: 2551-2257.

Ganzane L, Delmas C, Bingen E, Dabernat H 1998. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 36: 3629-3635.

Garner D & Weston V. Effectiveness of vaccination for *Haemophilus influenzae* type b. *Lancet* 36: 395-396

Garpenholt O, Svante H, Fredlund H, Bodin L, Olcen P 1999. Epiglottitis in Sweden before and after introduction of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr Infect Dis* 18: 490-493.

Garcia-Rodrigues JA, Martinez MJF 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Ant Chem* 50: 59-73.

Gebremariam A 1998 Neonatal meningitis in Addis Ababa: A 10-year reviews. *Ann Trop Paediatr* 18: 279-283.

Gosksu N, Ataoglu H, Kemaloglu YK, Ataoglu O, Ozsokmen D, Akyildiz N 1996. Experimental otitis media induced by coagulase negative staphylococcus and its L-forms. *Int J Ped Otorhin* 37: 201-216.

[Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr 1980. \*J Infect Dis\* 142: 923-933.](#)

Greenberg D, Broides A, Blancovich I, Peled N, Givon-Lavi N, Dagan R 2004. Relative Importance of Nasopharyngeal versus Oropharyngeal Sampling for Isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from Healthy and Sick Individuals Varies with Age. *J Clin Microbiol* 10: 4604-4609.

[Greenwood B 1992. Epidemiology of acute lower respiratory tract infections, especially those due to \*Haemophilus influenzae\* type b, in The Gambia, west Africa. \*J Infect Dis\* 165: S26-28.](#)

[Harabuchi Y, Faden H, Yamanaka N, Duffy L, Wolf J, Krystofik D, 1994. Nasopharyngeal colonization with nontypeable \*Haemophilus influenzae\* and recurrent otitis media. \*Ped J Infect Dis\* 170: 862-826.](#)

Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sunakawa K, Ubukata K 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* 9: 39-46.

Heath P T, Booy R, Griffiths H, Clutterbuck E, Azzopardi HJ, Slack MPE, Fogarty J, Moloney AC, Moxon ER 2000. Clinical and immunological risk factors associated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in childhood. *Clin Infect Dis* 31: 973–980.

[Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, Slack MP, Fogarty J, Moloney AC, Ramsay ME, Moxon ER 2001.](#) Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatr Infect Di J* 20: 300-305.

Hendrixson, Owen P, James P N, 1999. Molecular switches  $\pm$  the ON and OFF of bacterial phase variation. *Molec Microb* 33: 919-932.

IBGE 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em [ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo\\_Demográfico\\_2000/população/Brasil/](ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Demográfico_2000/população/Brasil/). Acessado em 02/02/2005.

Ishiwada N, Cao LD, Kohno Y 2004. PCR-based capsular serotype determination of *Haemophilus influenzae* strains recovered from Japanese paediatric patients with invasive infection. *Clin Microbiol Infect* 10: 895-898.

James PA, Lewis DA, Jordens JZ, Cribb J, Dawson SJ, Murray SA 1996. The incidence and epidemiology of  $\beta$ -lactam resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Ant Chem* 37: 737-746.

[Jaimes MB, Caceres DC, de la Hoz F, Gutierrez C, Herrera D, Pinilla J, Porras A, Rodriguez F, Velandia M 2003.](#) Risk factors for severe acute lower respiratory tract infection in Bogota, 2001. *Biom* 23: 283-292.

Jones PA, Samuels NM, Phillips NJ, Munson RS Jr, Bozue JA, Arseneau JA, Nichols WA, Zaleski A, Gibson BW, Apicella MA 2002. *Haemophilus influenzae* type b strain A2 has multiple sialyltransferases involved in lipooligosaccharide sialylation. *J Biol Chem* 277: 14598–14611.

Jones C, 2005. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cien* 77: 293-324.

Kalmusova J, Bronska E, Krizova P 2004. Diagnostics of invasive meningococcal, haemophilus and pneumococcal disease by PCR assay. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 10: 130-133.

Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Karginova EA, Jones ME, Thornsberry C, Sahm DF 2002. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000–2001 leads to detection of clonal dissemination of a beta-lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. *J Clin Microbiol* 40: 1063–1066.

Kauppi M, Saarinen L, Kayhty H 1993. Anti-capsular polysaccharide antibodies reduce nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* type b in infant rats. *J Infect Dis* 167: 365–371.

Khan TA, Madni SA, Zaidi AK 2004. Acute respiratory infections in Pakistan: have we made any progress? *J Coll Phys Surg PaK*. 14: 440-448.

Kilian, M 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol* 93: 9–62.

Kilian M, Poulsen K, Lomholt H 2002. Evolution of the paralogous *hap* and *iga* genes in *Haemophilus influenzae*: evidence for a conserved *hap* pseudogene associated with microcolony formation in the recently diverged *Haemophilus aegyptius* and *H. influenzae* biogroup *aegyptius*. *Mol Microbiol* 46: 1367–1380.

Kirkeby L, Rasmussen TT, Reinholdt J, Kilian M 2000. Immunoglobulins in Nasal Secretions of Healthy Humans: Structural Integrity of Secretory Immunoglobulin A1 (IgA1) and Occurrence of Neutralizing Antibodies to IgA1 Proteases of Nasal Bacteria. *Clin Diag Lab Immun* 7: 31–39.

Klein JO 1995. Selection of oral antimicrobial agents for otitis media and pharyngitis. *Infect Dis Clin Pract* 4: S88–S94.

Klein J 1997. Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in pediatric respiratory tract infections. *Ped Infect Dis J* 16: S5- 8.

[Kmetzsch CI, Schermann MT, Santana JC, Estima CL, Faraco FJ, Silva CM, Conceicao R 2003.](#) Occurrence of *Haemophilus influenzae* b meningitis after the implementation of a mass vaccination program. *J Pediatr* 79: 530-536.

Koedel U, Scheld WM, Pfister HW 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2: 721–736.

Kolenbrander PE 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54: 413-437.

Kroll JS & Moxon ER 1988. Capsulation and gene copy number at the *cap* locus of *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol* 170: 859-864.

Kroll JS, Hopkins I, Moxon ER 1988. Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination mediated disruption of a gene essential for oligosaccharide export. *Cell* 53: 347-356.

Kroll JS, Zamze S, Loynds B, Moxon ER 1989. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 171: 3343-3347.

Kroll JS, Loynds B, Brophy LN, Moxon ER. 1990. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. *Mol Microbiol* 4: 1853-1862.

Kroll JS, Loynds B, Moxon ER 1994. Natural genetic transfer of a putative virulence-enhancing mutation to *Haemophilus influenzae* type a. *J Infect Dis* 169: 676-679.

LaClaire LL, Tondella ML, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE, Popovic T. 2003. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J Clin Microbiol* 41: 393-396.

Lanata CF, Rudan I, Boschi-Pinto C, Tomaskovic L, Cherian T, Weber M, Campbell H 2004. Methodological and quality issues in epidemiological studies of acute lower respiratory infections in children in developing countries. *Int J Epidemiol* 33: 1-11.

[Landgraf IM, Vieira MF 1993](#). Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* from patients with meningitis in the city of Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol* 31: 743-745.

Lakhanpaul M, Atkinson M, Stephenson 2004. Community-acquired pneumonia in children: a clinical update. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 89: ep29-ep34.

Laval CAB, Pimenta FC, Andrade JG, Andrade SS, Andrade ALSS 2003. Progress Towards Meningitis Prevention in the Conjugate Vaccines Era. *Br J Infect Dis* 7: 315-324.

Leibovitz E & Dagan R 2000. Antibiotic treatment for acute otitis media. *Int J Ant Ag 15*: 169-177.

Leibovitz E, Satran R, Piglansky L, Raiz S, Press J, Leiberman A, 2003. Can acute otitis media caused by *Haemophilus influenzae* be distinguished from that caused by *Streptococcus pneumoniae*? *Pediatr Infect Dis 22*:509-514.

Levine OS, Lagos R, Munoz A, Villaroel J, Alvarez AM, Abrego P 1999. Defining the burden of pneumonia in children preventable by vaccination against *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr Infect Dis J 18*:1060-1064.

Leinonen M, Herva E 1977. The latex agglutination test for the diagnosis of meningococcal and *Haemophilus influenzae* meningitis. *Scand J Infect Dis 9*: 187-191.

Leinonen M & Kaythy H 1978. Comparison of counterimmunoelectrophoresis, latex agglutination and radioimmunoassay in detection of soluble capsular polysaccharide antigens of *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitidis* of groups A or C. *J Clin Pathol 31*: 1172-1176.

Limcangco MRT, Salole EG, Armour CL 2000. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in Manila, Philippines, 1994 to 1996. *Pediatr Infect Dis J. 19*: 7–11.

Lorenz E, Chemotti EC, Jiang AL, and McDougal LD 2005. Differential Involvement of Toll-Like Receptors 2 and 4 in the Host Response to Acute Respiratory Infections with Wild-Type and Mutant *Haemophilus influenzae* Strains. *Infect Immun 73*: 2075–2082.

Lipsitch M 1997. Vaccination against colonizing bacteria with multiple serotypes. *Proc Natl Acad Sci USA 94*: 6571–6576.

Lucher LA, Reeves M, Hennessy T, Levine OS, Popovic T, Rosenstein N, Parkinson AJ 2002. Reemergence, in Southwestern Alaska, of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease due to strains indistinguishable from those isolated from vaccinated children. *J Infect Dis 186*: 958–965.

Lund E & Henrichsen J 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Lond Acad Press P*: 241-262.

Luong DC, Ishiwada N, Takeda N, Kohno Y 2004. Serotypes of *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients with respiratory tract infections. *Toho J Exp Med 202*: 245-254.

Markowitz SM 1980. Isolation of an ampicillin-resistant, non-beta-lactamase producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Ant Ag Chem* 17: 80–83.

Martin J, Richards C, Moxon ER 1999. Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Mol Microbiol* 33: 679–692.

Masuda K, Masuda R, Nishi J, Tokuda K, Yoshinaga M, Miyata K 2002. Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. *Pediatr Int* 44: 376-380.

Mathai D, Lewis MT, Kugler KC, Pfaller MA, Jones RN 2001. Antibacterial activity of 411 antimicrobials tested against over 2773 bacterial isolates from hospitalized patients with pneumonia: I results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 1998). *Diagn Microb Infect Dis* 39: 105-116.

McIntosh K 2002. Current concepts: community-acquired pneumonia in children. *New Eng J Med* 346: 429-437.

McVernon J, Trotter CL, Slack MPE, Ramsay ME, 2004. Trends in surveillance study infections in adults in England and Wales: type b *Haemophilus influenzae*. *BMJ* 329:655-658.

Meats E, Feil EJ, Stringer S, Cody AJ, Goldstein R, Kroll JS, Popovic T, Spratt BG 2003. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 41:1623–1636.

Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, Rubens CE, Mack RD, Smith AL 1984. Characterization of non-beta-lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Ant Ag Chem* 26: 235–244.

Mendelman PM, Chaffin DO, Musser JM, DeGroot R, Serfass DA, Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M 2001. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Ant Ag Chem* 45: 1693–1699.

Millar EV, O'Brien KL, Levine OS, Kvamme S, Reid R, Santosham M 2000. Toward limination of *Haemophilus influenzae* type b carriage and disease among high-risk American Indian children. *Am J Public Heal* 90: 1550-1554.

Ministério da Saúde do Brasil 2004. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Meningite por *Haemophilus influenzae*. In: Guia de Bolso vigilância epidemiológica, 3ª ed, Ministério da Saúde do Brasil, Brasília-DF Junho de 2004.

Mitsuda T, Kuroki H, Ishikawa N, Imagawa T, Ito S, Miyamae T, Mori M, Uehara S, Yokota S 1999. Molecular Epidemiological Study of *Haemophilus influenzae* Serotype b Strains Obtained from Children with Meningitis in Japan. *J Clin Microbiol* 37: 2548–2552.

Molina JM, Córdoba J, Esteban R, Laínez B, Monsoliu A, Gregori V, Hernandez A, Diosdado N, Gobernado M 2002. Estudio de resistencia a beta-lactamicos de *Haemophilus influenzae* conferida por el gen *blaROB-1*. *Rev Esp Quim* 15: 148–151.

[Molina JM, Cordoba J, Monsoliu A, Diosdado N, Gobernado M 2003.](#) *Haemophilus influenzae* and betalactam resistance: description of bla TEM gene deletion. *Rev Esp Quimi* 16: 195-203.

Moxon ER, Murphy TF 2000. Principles and practice of infectious diseases, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa *Haemophilus influenzae*, p. 2369–2378.

Montano A, Algorta G, Pirez C, Pascale A, Farcilli R, Ferrari AM, 2001. Enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b. Impacto de la vacunación en los niños que ingresan al Centro Hospitalario Pereira Rossell. *Rev Med Uruguay* 17: 166-170.

Mulholland K, Hilton S, Adegbola R, Usen S, Oparaugo A, Omosigho C 1997. Randomized trial of *Haemophilus influenzae* type-b tetanus protein conjugated vaccine for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants. *Lancet* 349: 1191-1197.

Mulholland K 1999. Magnitude of the problem of childhood pneumonia. *Lancet* 354: 590-592.

Murray PR. Microbiologia Médica. 4ª Edição 2004 Ed. Guanabara.

Murphy TF & Apicella MA 1987. Nontypable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. *Rev Infect Dis* 9: 1-15.

Murphy TF, Kirkham C 2002 Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol* 2: 1-8.

Musher, DM 1983 - *Haemophilus influenzae* infections. *Hosp Pract* 18: 158-61-166, 169-170.

NCCLS/Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement* . CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

Numazaki K, Chiba S, Umetsu M, Tanaka T, Yoshimura H, Kuniya Y, Miura J, Adachi N, Ukae S, Mori T, Ueda D, Hotsubo T, Sato T 2004. Etiological agents of lower respiratory tract infections in Japanese children. *In Vivo* 18: 67-71.

[O'Brien K 2001](#). Disease transmission: routes, contributing factors and herd immunity. *Int J Clin Prat* 118:5-1187.

[Olowokure B, Hawker J, Blair I, Spencer N, 2000](#). Decrease in effectiveness of routine surveillance of *Haemophilus influenzae* disease after introduction of conjugate vaccine: comparison of routine reporting with active surveillance system. *BMJ* 321: 731-732.

Omikunle A, Takahashi S, Ogilvie CL, Wang Y, Rodriguez CA, St Geme III JW, Adderson EE 2002. Limited genetic diversity of recent invasive isolates of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 40: 1264–1270.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R 2000: Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49-79.

O'Neill JM, St Geme III JW, Cutter D, Adderson, EE , Anyanwu J, Jacobs RF, and Schutze GE 2003. Invasive Disease Due to Nontypeable *Haemophilus influenzae* among Children in Arkansas. *J Clin Microbiol* 4: 3064–3069.

Pan American Health Organization (PAHO) 2002. Acute Respiratory Infection. Disponível para download no endereço: <http://www.paho.org/Portuguese/AD/DPC/CD/aiepi1.htm>. Acessado em 27/01/2005.

Pechere JC 1995. Community-acquired pneumonia in children. Worthing, UK: Cambridge Medical Publications.

Peerbooms PG, Engelen MN, Stokman DA, van Benthem BH, van Weert ML, Bruisten SM, van Belkum A, Coutinho RA 2002. Nasopharyngeal carriage of potential bacterial pathogens related to day care attendance, with special reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 40: 2832-2836.

Peltola H, Kayhty H, Virtanen M, Makela PH 1984. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 310: 1561-1566.

Peltola, H 2000. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 13: 302-317.

Penildon, S: Farmacologia, 6a Edição, Ed. Guanabara Koogan, 2002.

[Peny JM](#), [Gleizes O](#), Covillard JP 2005. Financial requirements of immunisation programmes in developing countries: a 2004-2014 perspective. *Vaccine* 23: 4608-4610.

Perdue DG, Bulkow LR, Gellin BG, Davidson M, Petersen KM, Singleton RJ, Parkinson AJ 2000. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in Alaskan residents aged 10 years and older before and after infant vaccination programs. *JAMA* 283:3089-3094.

Pittman, M 1931 Variation and type specificity in the bacterial species hemophilus influenzae. *J Exp Med* 53: 471-492.

Poltorak, A 1998, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Scien* 282: 2085-2088.

Pushparajah K, Ramnarayan P, Maniyar A, Paget R, Britto J 2003. Continued threat of *Haemophilus influenzae* type B disease in the U.K. *Lancet* 361: 90.

Rayner M, Zhang Y, Gorry M, Chen Y, Post J, Ehrlich G 1998. Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion. *JAMA*.279: 296-299.

[Ramsay ME](#), [McVernon J](#), [Andrews NJ](#), [Heath PT](#), [Slack MP](#) 2003. The epidemiology of acute meningitis in children in England and Wales. *Arch Dis Child* 88: 662-664.

Reis JNN, Lima JB, Ribeiro GS, Corderio SM, Salgado K, Reis MG, Ko IA, 2002. Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae* Isolated during Population-Based Surveillance for Meningitis in Salvador, Brazil. *Ant Ag Chem* 11: 3641–3643.

Ribeiro GS, Reis JNN, Cordeiro SM, Lima JBT, Gouveia EL, Petersen M, Salgado K, Silva HR, Zanella RC, Almeida SCG, Brandileone MC, Reis MG 2003. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in *Braz J Infect Dis* 187: 109–116.

Robbins JB, Schneerson R, Szu SC 1995. Perspective. Hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J Infect Dis* 171: 1387–1398.

Rock FL, 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll.. *Proc Natl Acad Sci USA*, 952: 588-593.

Rota MBP, Pereira MR, Cantarelli V, Costa SS 2004. Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion. *J Ped* 80 : 41-48.

Rodriguez CA, Avadhanula V, Buscher A, Smith AL, St Geme III JW, Adderson EE 2003. Prevalence and Distribution of Adhesins in Invasive Non-Type b Encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infec Immunol* 71: 1635–1642.

Rosenstein, NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 3441: 378–1388.

Rudan I, Tomaskovic L, Boschi-Pinto C, Campbell H 2003. Estimating the incidence of acute lower respiratory infections (ALRI) in children under five years in developing countries: I Global Estimate. *Bull WHO*.

Saito M, Umeda A, Yoshida SI 1999. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 37: 2142–2147.

Saltola SW, Schirmer PJ, Farley MM 2003. Complete Sequence of the *cap* Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype b and Nonencapsulated b Capsule-Negative Variants. *Infec Immun* 71: 3639–3644.

Skocynska A, Lewandowska M, Klarowicz A, Hryniewiicz W 2005. Prevalence and Serotype Distribution of Encapsulated *Haemophilus influenzae* Isolates from Patients with Lower Respiratory Tract Infections in Poland. *J Clin Microbiol* 43: 938–941.

Shann F 1995. The management of pneumonia in children in developing countries. *Clin Infect Dis* 21: 218-225.

Shann F & Steinhoff MC 1999. Vaccines for children in rich and poor countries. *Lancet* 354: 7-11.

Shoma S, Rahman M, Yasmin M 2001. Rapid Detection of *Haemophilus influenzae* Type b in Bangladeshi Children with Pneumonia and Meningitis by PCR and Analysis of Antimicrobial Resistance. *J. Heal Popul Nutr* 19: 268-274.

Simões LLP, Andrade ALLS, Laval CA, Oliveira RM, Silva AS, Martelli CMT, Silva SLA, Almeida RM, Andrade JG 2004. Impacto da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b na redução de meningites, Goiás. *Rev Sau Pub* 38: 664-670.

Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis infected with bacterial biofilms. *Nat* 407: 762-764.

Slack MP, Azzopardi HJ, Hargreaves M, Ramsay ME 1998. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. *Ped Infect Dis J* 17: 204–207.

Slater LN, Guarnaccia J, Makintubee S, Istre GR 1990. Bacteremic disease due to *Haemophilus influenzae* capsular type f in adults: report of five cases and review. *Rev Infect Dis* 12: 628–635.

St Geme JW III. 1993. Nontypeable *Haemophilus influenzae* disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. *Infect Ag Dis* 2:1–16.

St Geme, JW III. 2000. The pathogenesis of nontypable *Haemophilus influenzae* otitis media. *Vaccine* 19: S41–50.

Stenfors L & Raisanen S 1989. How long do middle ear pathogens survive in mucoid effusion material. *Acta Oto* 107: 244-248.

Sulikowska A, Grzesiowski P, Sadowy E, Fiett J, Hryniewicz W 2004. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from the nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharynx. *J Clin Microbiol* 42: 3942–3949.

Sunit C S, Mohankumar D, Pratibha D, Singhi S, Sapru NK 2002. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosing *Haemophilus influenzae* b meningitis. *Ann Trop Paed* 22: 347–353.

Talon D, Leroy J, Dupont MJ, Bertrand X, Mermet F, Thouverez M, Estavoyer MJM 2000. Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of *Haemophilus influenzae* strains isolated from nasopharyngeal specimens from children in day-care centers in eastern France. *Clin. Microbiol Infect* 6: 519–524.

Takemura NS, Andrade SM 2001. Meningite por *Haemophilus Influenzae* tipo b em cidades do Paraná. *J Pediatr* 77: 387-392.

[Teele DW, Klein JO, Chase C, Menyuk P, Rosner BA, 1990.](#) Otitis media in infancy and intellectual ability, school achievement, speech, and language at age 7 years. Greater Boston Otitis Media Study Group. *J Infect Dis* 162: 685-694.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Coering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233–2239.

Teixeira LM 1994. Characteristics of bacteria as etiological agents of acute respiratory infections in children: considerations for diagnosis. Section II: Etiological Aspects, chapter 6. Disponível em: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/AIEPI-1-2.6.pdf>. Acessado em 27/03/2005.

Tikhomirov E, Santa MM, Eastern K 1997. Meningococcal diseases: Public health burden and control. *Wor Heal Statis Quart* 50 :170-177.

Thornsberry C, Ogilvie PT, Holley HP Jr, Sahn DF 1999. Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. Isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective US Study. *Antim Ag Chem* 43: 2612-2623.

Todar K 2004. University of Wisconsin Todar's Online Textbook of Bacteriology. Disponível no endereço: [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net). Acessado em 20/12/2004.

Tognotti E 2003. Scientific triumphalism and learning from facts: bacteriology and the "Spanish flu" challenge of 1918. *Soc Hist Med* 16: 97-110.

Trotter CL, Ramsay ME, Slack MP 2003a. The epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease in England and Wales, 1990-2002. *Com Dis Pub Heal* 6: 55-58.

Ubukata K 2003. Problems associated with high prevalence of multi-drug resistant bacteria in patients with community-acquired infections. *J Infect Chemother* 9: 285-291.

Uno Y 2003. Investigate of nasopharyngeal flora in infants and children with influenza. *Kansensh Zasshi* 77: 1024-1031.

Urwin G, Krohn JA, Deaver-Robinson K, Wenger JD, Farley MM, and the *Haemophilus influenzae* Study Group 1996. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. *Clin Infect Dis* 22: 1069-1076.

Uzuka R, Kawashima H, Hasegawa D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Chiba K 2004. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR. *Pediatr Int* 46: 551-554.

van Ham SM, van Alphen L, Mooi FR, van Putten JP 1993. Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell* 73: 1187-1196.

van Ketel RJ, Wever B, van Alphen L 1990. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol* 33: 271-276.

[Venkatesh VC, Steinhoff MC, Moses P, Jadhav M, Pereira SM 1985](#). Latex agglutination: an appropriate technology for the diagnosis of bacterial meningitis in developing countries. *Ann Trop Paed* 5: 33-36.

Vega-Briceno LE, Perret C, Holmgren N, Sanchez I 2005. Non-typable *Haemophilus influenzae* severe pneumonia in an infant: case report *Rev Chil Infec* 22: 89-92.

Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, Inoue M 1999. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 38: 625–629.

Waggoner-Fountain LA, Hendley JO, Cody EJ, Perriello VA, Donowitz LG 1995. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin Infect Dis* 21: 1322–1324.

Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T 2004. Possible High Rate of Transmission of Nontypeable *Haemophilus influenzae*, Including Beta-Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant Strains, between Children and Their Parents. *J Clin Microbiol* 42: 362–365.

Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong Ple T, Anh NT, Huong VT, Phuong HV, Thi NT, Suu PT, Nguyet NT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K 2005. Comparative molecular analysis of *Haemophilus influenzae* isolates from young children with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 43: 2474–2476.

Willians B 2002. Estimates of worldwide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infec Dis* 2: 25-32.

World Health Organization 1999. Laboratory manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Disponível no endereço <http://www.who.int/emcdocuments/meningitis/does/whocdscsredc997.pdf>. Acessado em 15/01/2005.

World Health Organization 2001. Countries having introduced Hib vaccine. Geneva 2001. Disponível no endereço: <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hib.map.htm>. Acessado em 15/01/2005.

World Health Organization 2002a. *Haemophilus influenzae* tipo b Hib meningitis in the pre-vaccine era: a global review of incidence, age distributions, and case fatality rates. Geneva; 2002. Disponível no endereço: <http://www.who.int/vaccinesocuments/DocsPDF02/www696.pdf>. Acessado em 15/01/2005.

World Health Organization 2002b. The database with studies of acute respiratory infections (ARI) in children under five years in developing countries. Disponível no endereço [http://www.who.int/child-adolescent-Health/new\\_publications/overview/ari\\_db.htm](http://www.who.int/child-adolescent-Health/new_publications/overview/ari_db.htm). Acessado em 15/01/2005.

Zacharisen MC, Watters SK, Edwards J 2003. Rapidly fatal *Haemophilus influenzae* serotype f sepsis in a healthy child. *J Infect* 46:194–196.

Zhao G, Meier TI, Kahl SD, Gee KR, Blaszcak LC 1999. Bocillin FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Ant Ag Chem* 43: 1124–1128.

**Prevalência e tipagem capsular de *Haemophilus influenzae*  
isolados da nasofaringe de crianças  
pós-introdução da vacina Hib  
no município de Goiânia**

Artigo a ser submetido à publicação na Revista de Patologia Tropical

## **Prevalência e tipagem capsular de *Haemophilus influenzae* isolados da nasofaringe de crianças pós-introdução da vacina Hib pós-introdução da vacina Hib em Goiânia**

Frederico Mendes<sup>1</sup> Machado Neto, Sérgio Bokerman<sup>2</sup>, Maria Cristina Brandileone<sup>2</sup>, Ana Lúcia S. S. Andrade, Fabiana Cristina Pimenta<sup>1</sup>

1. Instituto de Patologia e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás –Goiânia, Goiás
2. Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

Endereço para comunicação: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Rua Delenda Rezende de Melo, S/N Setor Universitário. 74605-050 Goiânia, GO, Brasil

e-mail: fhred\_mmn@hotmail.com

e-mail:pimenta@iptsp.ufg.br

### **RESUMO**

**Antecedentes:** A microbiota da nasofaringe (NF) de crianças é o principal reservatório ecológico do *Haemophilus influenzae*, que em seu estado portador, configura um importante papel na disseminação da bactéria. Em Goiânia após a introdução da vacina Hib-conjugada, em julho de 1999, a incidência de casos de meningites, passou de  $10,8 \times 10^5$ , para  $2,3 \times 10^5$  habitantes, em 2001. **Objetivos:** Determinar a prevalência de *H. influenzae*, em amostras de NF de crianças menores de cinco anos; avaliar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *H. influenzae* a dois antimicrobianos; e caracterizar os isolados de *H. influenzae* pela tipagem molecular da PCR. **Material e Métodos:** De maio de 2000 a agosto de 2001, foram coletados *swabs* da nasofaringe de 648 crianças menores de 5 anos, onde, 269 estavam com IRA, incluindo-se pneumonia, 77 com meningites e 302 crianças saudáveis. Realizou-se o cultivo das amostras em ágar chocolate e posteriormente os isolados foram identificados de acordo com os procedimentos recomendados, e o perfil de

resistência foi determinado para dois antimicrobianos. A tipagem capsular foi realizada pela técnica de PCR. **Resultados:** A prevalência de *H. influenzae* foi de 18,2% (118 isolados) na NF de crianças. O resultado da tipagem pela PCR caracterizou 3 Hib (2,5%), 1 Hia (0,8%), 2 Hif (1,7%) e 112 NC (94,9%). Os Hib foram isolados de uma criança com IRA, outra com pneumonia e a última com meningite. O Hia foi isolado de criança com IRA. Os tipos Hif foram isolados de uma criança com IRA e outra com pneumonia. Das crianças que se isolaram os tipos NC, 11 (9,8%) apresentavam-se saudáveis, 81 (72%) apresentavam algum quadro de IRA, 3 (2,7%) apresentavam meningite e 17 (15,2%) pneumonia. Dos 112 tipos NC, 35 (31,3%), e todos Hia e Hif mostraram-se resistente apenas ao trimetoprim-sulfametaxazol mas sensíveis a ampicilina, e 8 (7,1%) NC foram resistentes a ampicilina. Todos Hib, foram sensíveis aos dois antimicrobianos. **Conclusão:** Observou-se uma redução na taxa de prevalência do Hib, na nasofaringe de crianças menores de cinco anos, assim como uma emergência dos tipos NC, pós-introdução da vacina Hib-conjugada, fato que deve ser monitorado por programas de vigilância epidemiológica.

**Unitermos:** Nasofaringe, crianças, *H. influenzae*, vacina, PCR, resistência

## ABSTRACT

**Background:** The nasopharyngeal of children, is the main ecological reservoir of the *Haemophilus influenzae*, especially type b (Hib), that in his state carriage configures an important reservoir, acting in the dissemination of the bacterium. In Goiania after the introduction of the vaccine Hib-conjugated, in July of 1999, the incidence of cases of meningites, passed from  $10.8 \times 10^5$ , to  $2.3 \times 10^5$  inhabitants, in 2001. **Objective:** To determine the prevalence of *H. influenzae*, PCR capsular type and profile of susceptibility, in samples from nasopharyngeal of healthy infants or with some acute respiratory infection (ARI), or meningitis, post-introduction of the vaccine Hib-Conjugated, in the town of Goiânia.

**Materials and Methods:** From May of 2000 to August of 2001, were collected swabs of the nasopharyngeal of 648 infants less than 5 years, where, 269 were with ARI, including itself pneumonia, 77 with meningitis and 302 healthy infants. It carried out cultivated of the samples in chocolate agar supplemented with bacitracina and subsequently the isolated were identified agreement with the procedures recommended, and the profile of susceptibility was determined for trimethoprim-sulfametaxazole (STX) and ampicillin (AMP). The molecular typing capsular was carried out by the technical of the PCR.

**Results:** The prevalence of *H. influenzae* was of 18,2% (118) in the nasopharygeal. Agreement with to typing capsule by PCR. Three(2,5%) isolates of the *H. influenzae* were identified like Hib, one isolate was characterized like Hia (0,8%), two (1,7%) were identified like Hif, and 112 (94,9%) were characterized like *H. influenzae* noncapsulados (NC). Regarding the clinical status of the infants, the Hib b were isolated from cases of meningite (n=1), ARI (n=1) and pneumonia (n=1), the Hia from case of ARI, the Hif from case of IRA, and the NC, 11 (9.8%) from healthy children; 81 (72.3%) from cases of IRA;

3 (2,7%) from cases of meningitis and 17 (12.2%) from case of pneumonia. Of the 112 NC, 35 (31,3%), and the kinds capsules to and f showed itself resistant barely to the (STX) and sensible to AMP. Eight (7,1%) NC presented resistance to ampicillin. The Hib, were sensible ampicilina and STX. **Conclusion:** It was verified a reduction in the prevalence of the Hib, in the nasopharyngeal of infants less than five years, with an emergency of the types NC, post-introduction of the vaccine Hib-conjugated, fact that should be monitored by programs of epidemiological surveillance. .

**Keywords:** *H. influenzae*, nasopharyngeal, ARI, PCR, resistance

## Introdução

As infecções respiratórias agudas (IRA), entre elas a pneumonia e meningites, constituem um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo. Estas infecções representam um número de aproximadamente dois milhões e duzentas mil de mortes anuais, especialmente em crianças menores de cinco anos (41,35,64,53). O *Haemophilus influenzae* é um dos agentes etiológicos mais freqüente em casos de pneumonia e meningite, nos países em desenvolvimento (48,21).

A colonização da mucosa do trato respiratório superior é o primeiro evento para que a infecção se estabeleça. O estado de portador é um processo dinâmico, onde as bactérias colonizadoras são adquiridas, eliminadas e readquiridas em vários momentos da vida, sendo que a transmissão ocorre por contato direto ou por inalação de aerossóis expelidos pela nasofaringe. A nasofaringe também é o local onde ocorrem os processos de recombinação, transformação e transdução bacteriana, determinantes na aquisição de fatores de resistência (42,28,34,18,44,13,27,4). É fato estabelecido, que as doenças invasivas, como pneumonias e meningites causadas por agentes como *H. influenzae*, ocorrem através da disseminação destes, presentes na nasofaringe, para o sangue e posteriormente para outros sítios, como as meninges (6,25,36,26). Esta bactéria é altamente adaptada ao hospedeiro humano, presente em 6 a 11% da nasofaringe de crianças saudáveis. Já em crianças que apresentam algum quadro clínico indicativo de IRA, a taxa de isolados na nasofaringe, varia entre 37% a 40% (29,47).

O *H. influenzae* pode apresentar seis tipos capsulares diferentes de (a-f), diferenciados pela estrutura bioquímica da cápsula polissacarídica (50). O material da

cápsula é um fator de virulência de importante propriedade antifagocitária, que auxilia tanto na colonização como na invasão de sítios como o sangue ou do fluido cefalorraquidiano, (42,19,31,1). Dentre esses tipos, o *H. influenzae* tipo b (Hib), que possui uma polirribose ribitol fosfato como antígeno capsular (PRP), corresponde a 20 a 60% dos casos de meningites e pneumonias de causa bacteriana (48). Determinados *H. influenzae* não apresentam cápsula polissacarídica, e são conhecidos como *H. influenzae* não tipáveis (NTHi) ou não capsulados (NC) (25,52).

A tipagem do *H. influenzae* pode ser realizada em laboratório, a partir métodos sorológicos, utilizando-se anti-soros específicos para os antígenos capsulares dos seis tipos capsulares (sorotipagem por aglutinação em lâmina). Quando não ocorre nenhuma reação de aglutinação, o isolado é considerado NC. Esta técnica de caracterização fenotípica, é bastante empregada nos laboratórios de forma rotineira com boas vantagens, mas apresenta diversos problemas de realização e interpretação dos resultados (8,32). O advento das técnicas moleculares de genotipagem, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitou várias aplicações na identificação e análise comparativa entre o genoma de diversos patógenos, fornecendo dados epidemiológicos mais precisos, especialmente na avaliação da efetividade das vacinas (16,30,24,32,8,55). Atualmente o método ouro para tipagem capsular do *H. influenzae* é baseado em técnicas de PCR, que se fundamenta na região do cromossomo bacteriano, chamada de *cap*. O locus *cap* apresenta três regiões (1, 2 e 3): as regiões 1 e 3 são comuns a todos tipos capsulares. Já a região 2 apresenta uma pequena porção variável, codificante do polissacarídeo de cápsula, específico para cada tipo capsular. Assim a tipagem capsular realizada pela PCR é determinada pela variabilidade da região 2 específica para cada um dos seis tipos encapsulados de *H. influenzae* e pela

presença do gene *bexA*, localizado na região 1, responsável pelo transporte da cápsula para fora da célula. Desta forma as cepas encapsuladas, possuem o gene *bexA*, ausente nos tipos NC, utilizado para a diferenciação entre os *H. influenzae* capsulados dos NC (24).

Um dos mais eficazes instrumentos profiláticos para as infecções causadas pelo *H. influenzae*, em especial o tipo b, é a utilização de vacinas por crianças menores de dois anos. As vacinas empregadas atualmente, utilizam uma proteína carreadora com o antígeno de cápsula do *H. influenzae* tipo b (vacina Hib-conjugada), foram introduzidas entre os anos de 1987 a 1993, promovendo uma redução espetacular no número de casos de doenças, especialmente as invasivas como pneumonia e meningite, causadas pelo Hib, propiciando também uma redução drástica na colonização do Hib, na nasofaringe de portadores, contribuindo indiretamente para a proteção de crianças não vacinadas (7,36,3,12,48,22,2).

No Brasil, a vacina Hib-conjugada foi introduzida de forma experimental em 1996, em duas cidades do Paraná, na Região Sul do país: Londrina e Curitiba, observando em ambas cidades uma redução na incidência de meningite por Hib de  $23,91 \times 10^5$  habitantes para  $2,79 \times 10^5$  habitantes em três anos após a introdução da vacina (61). Em Goiânia a vacina Hib-conjugada (HbOC; HibTITER, Wyeth- Lederle) foi introduzida em julho de 1999, sendo que o número de casos de meningites, antes da introdução da vacina, era de  $10,8 \times 10^5$  habitantes, atingindo  $2,3 \times 10^5$  habitantes depois de dois anos de seu uso (57).

Observações desenvolvidas após a introdução das vacinas Hib-conjugadas mostram um declínio no número de casos de meningite pelo Hib, e vários sistemas de vigilância epidemiológica são estruturados para acompanhar o impacto da vacina Hib-conjugada. A

partir de análises promovidas por esses sistemas de vigilância, surgem alguns relatos que demonstram uma re-emergência do Hib em cenários diferentes como no Reino Unido, Alaska e na Espanha, ou um aumento no número de doenças invasivas causadas por tipos não-b (como os Hia e Hif) ou por tipos NC (48,2,3,41,57). No Brasil, logo após o primeiro ano de introdução da vacina, detectou-se um aumento da prevalência do tipo NC (51).

Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência de *H. influenzae* na nasofaringe de crianças menores de cinco anos, saudáveis, com alguma IRA ou com meningite, após a introdução da vacina Hib-conjugada, no município de Goiânia.

## **Material e Métodos**

**População de Estudo.** O estudo foi realizado em Goiânia, localizada na região central do Brasil, durante o monitoramento da rede de vigilância epidemiológica *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, entre maio de 2001 e julho de 2002. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), assim como pelo Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP). Na rede de vigilância estabelecida para o projeto, foram incluídos 20 hospitais pediátricos, dos setores público, privado, universitário e filantrópico, responsável por 90,0% do atendimento a crianças no município, assim como 7 hospitais que notificaram os casos de meningite. A coleta realizada abrangeu um total de 648 crianças menores de 5 anos, apresentavam as seguintes características: (i) crianças hospitalizadas com pneumonia radiologicamente confirmada por condensação e/ou derrame; (ii) crianças hospitalizadas com alguma outra infecção do trato respiratório inferior (IRA) (63), incluindo principalmente bronquite, pneumonia de padrão radiológico não bacteriano, asma e viroses; (iii) crianças com meningite bacteriana aguda de acordo com critérios da OMS (63); (iv)

crianças saudáveis que procuravam os centros de saúde por outras razões. Dessas crianças, 269 estavam com quadro de IRA, incluindo-se pneumonia, 77 com meningites e 302 crianças sem nenhum sintoma clínico estabelecido, que procuravam os mesmos centros de saúde por outras razões. A coleta de amostras de nasofaringe foi realizada com swabs (Medical Wire & Equipment Corsham, UK) ultrafino e flexível.

**Procedimentos laboratoriais.** Os swabs da nasofaringe coletados foram processados de acordo com os procedimentos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (63), no laboratório de bacteriologia, do Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. O perfil fenotípico de sensibilidade a antimicrobianos, e a tipagem pela técnica de PCR, foram realizadas nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo.

**Cultura das amostras.** As amostras de nasofaringe foram semeadas em placas de ágar chocolate suplementadas com bacitracina (300 µg para cada 100mL), e incubadas em jarras de anaerobiose com 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 a 48 horas.

Colônias com características macroscópicas de *H. influenzae* foram submetidas à coloração de Gram e os isolados de característica de cocobacilos Gram-negativos foram submetidos à prova do satelitismo e série bioquímica (fermentação da glicose, xilose, lactose, manose, sacarose; descarboxilação da ornitina, produção de indol e urease) de acordo com o Manual de Identificação de *H. influenzae*, da Organização Mundial da Saúde (63).

**Serotipagem pela PCR.** Para a realização do PCR, utilizou-se os *primers* (Tabela 1) HI-1 e HI-2, para a detecção do gene *bexA*, presente nos tipos capsulares, para diferenciação dos tipos NC, e os *primers* específicos (a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>/ b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub>/ c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub>/ d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, d<sub>3</sub>/ e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>, e<sub>3</sub>/ f<sub>1</sub>, f<sub>2</sub>, f<sub>3</sub>), de acordo com Falla e colaboradores (1994). Utilizando-se os *primers* HI1, HI2, juntamente com os *primers* 1 e 2 para cada tipo (a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>/b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>/c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>/d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>/e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>/f<sub>1</sub>, f<sub>2</sub>), e um *primer*

interno formado *primers* 3 ( $a_3/ b_3/c_3/d_3/e_3/f_3$ ). Para a confirmação dos casos onde a amplificação foi negativa, era realizada uma segunda amplificação, desta vez com os *primers* HI1 e HI3, e 2 e 3 de cada tipo ( $a_2, a_3/ b_2, b_3/ c_2, c_3/ d_2, d_3/ e_2, e_3/ f_2, f_3$ ) (24).

**Teste de suscetibilidade a antimicrobianos** - Todos os isolados de *H. influenzae* identificados foram submetidos ao teste de disco difusão, conforme preconizado pelo NCCLS (43). Após subcultivos em ágar chocolate e por 16-18 horas a 37°C, um inóculo padrão de 3 a 4 x 10<sup>8</sup> ufc/mL (metade da escala 1,0 de MacFarland) foi utilizado para a semeadura em placas de MHT com o auxílio de um swab estéril. Sobre as placas já inoculadas foram depositados discos de trimetoprim-sulfametaxazol (1,25µg) e de ampicilina (10µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Utilizaram-se as cepas *H. influenzae* ATCC 49247 e *H. influenzae* ATCC 49766 com controle.

## Resultados

O *H. influenzae* foi isolado em 118 das 648 amostras de nasofaringes. Destas amostras, 112 (94,9%) foram identificadas como NC, três (2,5%) eram Hib, 1 (0,8%) era tipo a e 2 (1,8%) eram tipo f, conforme a tipagem molecular da cápsula realizada pela técnica da PCR. A prevalência total do *H. influenzae*, na nasofaringe das crianças foi de 18,2% (tabela 2).

Com relação estado clínico das crianças, os Hif, foram isolados de uma criança com IRA e outra com pneumonia, e o Hia foi isolado de uma criança com IRA. Dos três Hib, um foi isolado de criança saudável, outra com IRA, e uma com meningite. Das crianças as quais se isolaram os 112 NC, 11 (9,8%) apresentavam estado clínico considerado saudável, 81 (72%) apresentavam algum quadro de IRA, três (2,7%) apresentavam meningite e 17 (15,2%) pneumonia (tabela 3).

O perfil de suscetibilidade caracterizou uma resistência do Hia apenas ao trimetoprim-sulfametaxazol, da mesma forma que os dois isolados de Hif. Os três isolados foram sensíveis tanto a ampicilina como ao trimetoprim-sulfametaxazol. Com relação aos 112 tipos NC, 35 (31,3%) foram resistentes ao trimetoprim-sulfametaxazol, e oito (7,1%) foram resistentes a ampicilina (tabela 4).

#### ***1.1.1.1 Discussão***

Os primeiros impactos em decorrência da vacinação contra o Hib, consistem em uma rápida redução dos índices de incidência das doenças causadas por esse patógeno, que variam em torno de 89-90%, especialmente nos casos de pneumonia, meningites e outras doenças invasivas (9,10,112,37).

Esse mesmo panorama de substituição do Hib é verificado no município de Goiânia (57). Ressaltando-se que não existem dados significativos da prevalência desse tipo capsular, na nasofaringe de crianças no município de Goiânia, analisa-se que a baixa prevalência do Hib na nasofaringe de 1,8% encontrada neste estudo, é muito inferior a prevalência desse tipo capsular na nasofaringe de portadores não vacinados, em torno de 40%, atestando a eficácia da vacina (10). A tipagem capsular dos isolados, pela PCR, mostrou a substituição do tipo prevalente b, anterior a introdução da vacina Hib-conjugada, por outros tipos encapsulados (Hia e Hif) e em especial, pelo tipo NC, como descritos em outras regiões (33,62,45,5,15).. Esse fenômeno é teoricamente explicado pela pressão seletiva exercida pela vacina Hib-conjugada. Assim, com a introdução da vacina Hib-conjugada, especula-se que ocorra um vácuo ecológico, que segundo uma tendência mundial, é ocupado prevalentemente pelos tipos NC. Desta forma, os tipos NC, sem o fator

da competição com o Hib, iniciam um processo de expansão colonizante das vias aéreas, especialmente de crianças vacinadas (36,6,52,39). Observa-se também, que este é o possível mecanismo que explica a substituição do Hib por outros tipos encapsulados, como o Hia e Hif. Já o resultado do perfil de suscetibilidade demonstrou que nenhum Hib era resistente a ampicilina ou ao trimetoprim-sulfametaxazol. Recomenda-se a utilização desses dois antimicrobianos em testes primários de rotina epidemiológica, de acordo com normas preconizadas pelo NCCLS (43). A ampicilina é uma das drogas de escolha, juntamente com uma cefalosporina de terceira geração, e o cloranfenicol, para o tratamento de crianças que apresentem alguma morbidade causada pelo *H. influenzae*, especialmente pneumonia e meningite, de acordo com normas do Ministério da Saúde (40). Já o trimetoprim-sulfametaxazol é empregado de forma empírica em algumas instituições de saúde para tratamento de quadros de pneumonias, sendo recomendado por sua eficácia, seu largo espectro e sua facilidade de administração (apenas duas doses ao dia), além de seu baixo custo e poucos efeitos colaterais (46).

De acordo com os resultados obtidos, dos 118 isolados de *H. influenzae*, das 648 amostras, 112 (94,9%) foram tipados como NC. O *H. influenzae* NC é encontrado em toda mucosa das vias aéreas de portadores, sendo um importante agente de otite média aguda, e de infecções do trato respiratório superior como sinusites, e inferior como bronquites e pneumonia (60,58,59,56,5,15). Em Goiânia, também não existem dados consistentes da prevalência do tipo NC na nasofaringe de crianças, mas estudos indicam um aumento de sua prevalência em portadores e associado a doenças invasivas. Na Espanha, entre os anos de 1999-2000, foram detectados que de 91 isolados, 61 (73,6%) eram NC, especialmente em indivíduos pertencentes a faixas etárias extremas (15). Esse quadro também foi

verificado também em Portugal, e na Inglaterra, onde a taxa de isolamento do tipo NC atingia aproximadamente 60% após a introdução da vacina Hib-conjugada (5,59). Com relação à taxa de crianças com algum quadro de IRA, pneumonia ou meningite, o isolamento do tipo NC, foi de 77,1%. Outro fator que chama a atenção sobre o aumento de infecções por *H. influenzae* NC, refere-se a sua grande diversidade genética, em comparação com os tipos capsulados, explicada por mecanismos de recombinação (38,15,4). Esta maior diversidade sugere uma atenção nas possíveis implicações práticas, dentro da cadeia epidemiológica, e em especial nas doenças invasivas causadas por este patógeno. Quanto ao perfil de resistência detectado, os tipos NC, mostraram que 104 isolados (92,9%) eram sensíveis a ampicilina, configurando-se uma baixa resistência a esse antimicrobiano utilizado na terapêutica, e 35 (31,3%) demonstraram ser resistentes ao trimetoprim-sulfametaxazol.

A detecção de duas cepas Hif (1,7%) e uma Hia, são dados preocupantes. O Hif é caracterizado como um patógeno associado usualmente a infecções invasivas, mesmo em pacientes imunocompetentes, em períodos anteriores ao advento das vacinas Hib-conjugadas e em maiores de 14 anos. Comparativamente, com a redução dos casos de Hib, o número de doenças invasivas causadas pelo Hif nos Estados Unidos, passou de 0,5 por 100.000 em 1989, para 1,9 por 100.000 em 1994 (26,62,67). Os dois isolados de Hif, apresentaram resistência ao trimetoprim-sulfametaxazol, mas não a ampicilina, da mesma forma, que o isolado do Hia. Em recente estudo utilizando técnicas moleculares, analisando-se cepas de Hif, da Dinamarca e dos Estados Unidos, isolados a partir de doenças invasivas e não-invasivas, observou-se que se tratavam de um mesmo clone, sugerindo-se que ele estaria em expansão no cenário pós-vacinação (67). Essa análise

reforça a necessidade de se implementar a correta tipagem capsular, pela PCR, e de outras técnicas de análise moleculares, para o monitoramento epidemiológico de uma possível emergência desse tipo capsular (14). Alguns casos de doenças invasivas, pelo Hia, são descritos em regiões diferentes do mundo. Em Salvador, detectou-se um aumento de oito vezes (de 0,02 para 0,16 por 100.000 habitantes) na prevalência do Hia, após a introdução da vacina Hib-conjugada, em casos de meningites, em crianças imunizadas com a vacina Hib-conjugada (51). A possível emergência do Hia, nos cenários pós-introdução da vacina Hib-conjugada, talvez seja condicionada em consequência da aquisição do fator de virulência do Hib, a cópia com deleção do segmento *IS1016-bexA*. Atualmente pouco se sabe sobre qual a influência direta desta mutação no aumento da virulência do Hia. Essa mutação determina no Hib, um aumento na produção de cápsula pela bactéria, significando uma resistência maior a dissecação durante a transmissão, além de promover uma inibição da opsonização por fagócitos, fenômenos que possivelmente estariam presentes no Hia, explicando esse aumento da virulência em algumas cepas. Supõe-se também, que a cópia com deleção do segmento *IS1016-bexA* pode estar relacionada com a expressão de outros genes que seriam importantes na colonização e invasão de tecidos, e de outros associados a mecanismos de virulência. (19,30,1). Ainda é necessária a análise de mais estudos de caracterização moleculares, correlacionados com a clínica dos pacientes para verificarem a validade dessas hipóteses. Esses dados contribuem de forma premente para a necessidade do monitoramento dos casos de morbidades causadas pelo *H. influenzae*, em especial, através da tipagem capsular pela PCR como padrão ouro de caracterização desse microrganismo, analisando-se a presença de fatores de virulência como a cópia com deleção do segmento *IS1016-bexA*, pelo Hia, o acompanhamento de uma possível expansão

clonal do Hif, a partir de estudos de caracterização genotípica, fornecendo resultados mais confiáveis para a cadeia de vigilância epidemiológica.

#### **1.1.1.1.2 Conclusão**

- ❖ A prevalência de *H. influenzae*, isolados da nasofaringe de crianças menores de cinco anos, foi de 18,2%.
- ❖ Detectou-se uma redução na prevalência dos isolados de Hib, na nasofaringe de crianças.
- ❖ Observou-se um aumento na prevalência de isolados NC, detectando-se uma emergência patógeno.

## Referências Bibliográficas

1. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyeh M, Carroll K, Mottice S, Korgenski EK, Christenson JC, Pavia AT. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: Emerging pathogen in the vaccine era? Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: Emerging pathogen in the vaccine era? *Pedia* 108: E18, 2001.
2. Andrade, ALSS, Andrade, JG, Martelli, CMT, Silva, SA, Oliveira, RM, Costa, MSN, Laval, CB, Ribeiro, LHV, Di Fabio JL. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine on childhood pneumonia: a case-control study in Brazil. *Epidem* 33:173–181, 2004.
3. [Adegbola RA](#), [Secka O](#), [Lahai G](#), [Lloyd-Evans N](#), [Njie A](#), [Usen S](#), [Oluwalana C](#), [Obaro S](#), [Weber M](#), [Corrah T](#), [Mulholland K](#), [McAdam K](#), [Greenwood B](#), [Milligan PJ](#). Elimination of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease from The Gambia after the introduction of routine immunisation with a Hib conjugate vaccine: a prospective study. *J Infect Dis* 177: 1758–1761, 1998.
4. [Allen S](#), [Zaleski A](#), [Johnston JW](#), [Gibson BW](#), [Apicella MA](#). Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 73(9): 5291-5300, 2005.
5. Bajanca P, Canica M, Multicenter Study Group. Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus*

- influenzae isolates in Portugal (1989-2001). *J Clin Microbiol* 42(2):807-810, 2004.
6. Bergstrom CT, McElhany P, Real LA. Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96:5095–5100, 1999.
  7. Bijlmer HA, van Alphen L, van den Broek LG, Greenwood BM, Valkenburg HA, Dankert. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b in The Gambia. *J Clin Microbiol* 165: 386-390, 1992.
  8. Bokermann S, Zanella RC, Lemos APS, Andrade AALS, Brandileone MCC. Evaluation of Methodology for Serotyping Invasive and Nasopharyngeal Isolates of *Haemophilus influenzae* in the Ongoing Surveillance in Brazil. *J Clin Microbiol* 41: 5546–5550, 2003.
  9. Black SB, Shinefield HR, Fireman B, Hiatt R, Polen M, Vittinghoff E. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61080 children. *Ped Infect Dis J* 10: 97–104, 1991.
  10. Booy R, Heath PT, Slack MP. Vaccine failures after primary immunisation with *Haemophilus influenzae* type-b conjugate vaccine without booster. *Lancet* 349:1197-11202, 1997.
  11. Booy R, Kroll JS 1997. Is *Haemophilus influenzae* finished? *J Ant Chem* 40: 149–153.
  12. Breukels, MA, Rijkers GE, Voorhorst-Ogink MM, Zegers BJM. Regulatory T Cells in the Antibody Response to *Haemophilus influenzae* Type b Polysaccharide. *Infect Immunol* 67: 789–793, 1999.

13. [Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A.](#) The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 18: S87-95, 2000.
14. Bruun B, Gahrn-Hansen B, Westh H, Kilian M. Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States. *J Med Microbiol* 53: 1161-1165.
15. Campos J, Hernando M, Román F, Vázquez MP, Aracil B, Oteo J, Lázaro E, Abajo F and the Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain. Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae* Infections after Extensive Vaccination against *H. influenzae* Type b. *J Clin Microbiol* 41: 524–529, 2004
16. Catlin BW, Bendler JW, Goodgal SH. The type b capsulation locus of *Haemophilus influenzae*: map location and size. *J Gen Microbiol* 70:411-422, 1972.
17. Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Renna G, Tozzi AE, Garlaschi ML, Mastrantonio P. Characterization of non-type b *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. *J Clin Microbiol* 38:4649–4652, 2000.
18. Cole AM, Tahk S, Orien A, Yoshioka D, Kim YH, Park A, Ganz T. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Diagn Labor Immunol* 8: 1064-1069, 2001.
19. Corn PG, Anders J, Takala AK, Kayhty H, Hoiseh S K. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. *J Infect Dis* 167: 356–364, 1993.

20. Dawid S, SJ Barenkamp, St Geme III JW. Variation in expression of *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 96:1077–1082, 1999.
21. Debbia E A, Schito G C, Zoratti A, Gualco L, Tonoli E, Marchese A. Epidemiology of major respiratory pathogens. J Chemoter Spec 1: 205-210, 2001.
22. Dennehy PH. Active Immunization in the United States: Developments over the Past Decade. Clin Microbiol 4: 872–908, 2001.
23. Erwin AL, Nelson KL, Mhlanga-Mutangadura T, Bonthuis PJ, Geelhood JL, Morlin G, Unrath WCT, Campos J, Crook DW, Farley MM, Henderson FW, Jacobs RF, Muhlemann K, Satola SW, van Alphen L, Golomb M, Smith AL. Characterization of Genetic and Phenotypic Diversity of Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infec Immun 73: 5853–5863, 2005.
24. Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskell D, Kroll KS, Moxon ER 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 32: 2382–2386, 1994.
25. Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. Microbiol. Mol Biol Rev 62: 294–308, 1998.
26. Frayha HH, Kalloghlian AK, deMoor MM. Endocarditis due to *Haemophilus influenzae* serotype f. Clin Infect Dis 23:401–402,1996 .
27. Garcia-Rodrigues, J. A., and M. J. Fresnadillo Martinez. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. J. Antimicrob. Chemother. 50(Suppl. S2):59–73. epidemiology of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 40: 2832–2836, 2002.

28. [Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr.](#) J Inf Dis 142: 923-33, 1980.
29. Greenberg D, Broides A, Blancovich I, Peled N, Givon-Lavi N, Dagan R. Relative Importance of Nasopharyngeal versus Oropharyngeal Sampling for Isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from Healthy and Sick Individuals Varies with Age. J Clin Microbiol 10: 4604–4609, 2004.
30. Kroll JS, Zamze S, Loynds B, Moxon ER. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. J Bacteriol 171: 3343-3347, 1989.
31. Kroll JS, Moxon ER, Loynds BM.. Natural genetic transfer of a putative virulence-enhancing mutation to *Haemophilus influenzae* type a. J Infect Dis 169: 676–679, 1994.
32. LaClaire LL, Tondella ML, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE, Popovic T. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing.. J Clin Microbiol 41: 393–396, 2003.
33. Leaves NI, Jordens JZ. Analysis of the prevaccine population of noncapsulate *Haemophilus influenzae* and identification of a putative epidemic clone. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15: 410–414, 1996.
34. Leibovitz E, Dagan R Antibiotic treatment for acute otitis media. Inter J Antim Ag 15: 169-177, 2000.
35. Levine OS, Lagos R, Munoz A, Villaroel J, Alvarez AM, Abrego P. Defining the burden of pneumonia in children preventable by vaccination

- against *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr Infect Dis* 18: 1060-1064, 1999.
36. Lipsitch M. Vaccination against colonizing bacteria with multiple serotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6571–6576, 1997.
37. McVernon, J., N. Andrews, M. P. E. Slack, and M. E. Ramsay. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b (HiB) combinations vaccines with acellular pertussis. *Lancet* 361: 1521–1523, 2003.
38. Meats E, Feil EJ, Stringer S, Cody AJ, Goldstein R, Kroll JS, Popovic T, Spratt BG. Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 41: 1623–1636, 2003.
39. [Mikolajczyk MG, Concepcion NF, Wang T, Frazier D, Golding B, Frasch CE, Scott DE.](#) Characterization of antibodies to capsular polysaccharide antigens of *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* in human immune globulin intravenous preparations. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 1158-1164, 2004.
40. Ministério da Saúde do Brasil 2004. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Meningite por *Haemophilus influenzae*. In: Guia de Bolso vigilância epidemiológica, 3<sup>a</sup> ed, Ministério da Saúde do Brasil, Brasília-DF Junho de 2004.
41. Mulholland K, Hilton S, Adegbola R, Usen S, Oparaugo A, Omosigho C, et al. Randomized trial of *Haemophilus influenzae* type-b tetanus protein conjugated vaccine for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants. *Lancet* 349: 1191-1197, 1997.

42. Musher, DM - *Haemophilus influenzae* infections. Hosp Pract (Off Ed). 8(8):158-161, 166, 169-170, 1983.
43. NCCLS/Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement* . CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
44. [O'Brien K.](#) Disease transmission: routes, contributing factors and herd immunity. Int J Clin Pract 118: 5-7, 2001.
45. Omikunle A, Takahashi S, Ogilvie CL, Wang Y, Rodriguez CA, St. Geme JW III, Adderson EE. Limited genetic diversity of recent invasive isolates of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 40: 1264–1270, 2002.
46. Pan American Health Organization (PAHO) 2004. Acute Respiratory Infection. Disponível para download no endereço: <http://www.paho.org/Portuguese/AD/DPC/CD/aiepi1.htm>
47. Peerbooms PG, Engelen MN, Stokman DA, van Benthem BH, van Weert ML, Bruisten SM, van Belkum A, Coutinho RA. Nasopharyngeal carriage of potential bacterial pathogens related to day care attendance, with special reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 40: 2832-2836, 2002.
48. Peltola, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years

after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 13: 302–317, 2000.

49. Pettigrew, M. M., B. Foxman, Z. Ecevit, C. F. Marrs, and J. Gilsdorf. Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 40: 660–662, 2002.
50. Pittman, Margaret. Variation and type specificity in the bacterial species hemophilus influenzae. J Exp Med 53: 471-492, 1931.
51. Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM, Lima SBT, Gouveia EL, Petersen M, Salgado K, Silva HR, Zanella RC, Almeida SCG, Brandileone MC, Reis MG. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. J Infect Dis 187: 109–116, 2003.
52. Rodriguez CA, Avadhanula V, Buscher A, Smith AL, St. Geme III JW, Adderson EE. Prevalence and Distribution of Adhesins in Invasive Non-Type b Encapsulated *Haemophilus influenzae*. Infect Immun 71: 1635–1642, 2003.
53. Rudan I, Tomaskovic L, Boschi-Pinto C, Campbell H. Estimating the incidence of acute lower respiratory infections (ALRI) in children under five years in developing countries: I Global Estimate. Bull WHO, 2003.
54. Saito M, Umeda A, Yoshida SI. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 37: 2142–2147, 1999.

55. Satola SW, Schirmer PJ, and Farley MM. Complete Sequence of the *cap* Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype b and Nonencapsulated b Capsule-Negative Variants. *Infect Immun*: 3639–3644, 2003.
56. Sarangi J, Cartwright K, Stuart JM, Brookes S, Morris R, Slack MP. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. *Epidemiol Infect* 124: 441–447, 2000.
57. Simões LLP, ALLS Andrade ALLS, Laval CA, Oliveira RM, Silva AS, Martelli CMT, Silva SLA, Almeida RM, Andrade JG. Impacto da vacinação contra o *Haemophilus influenzae* b na redução de meningites, Goiás. *Rev Sa Públ* 38: 664-670, 2004.
58. Slack MP, Azzopardi HJ, Hargreaves RM, Ramsay ME. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 17: S204–S207, 1998.
59. Smith-Vaughan, HC, Spiprakash KS, Leach AJ, Mathews JD, Kemp DJ. Low genetic diversity of *Haemophilus influenzae* type b compared to nonencapsulated *H. influenzae* in a population in which *H. influenzae* is highly endemic. *Infect Immun* 66: 3403–3409, 1998.
60. St. Geme JW III. Nontypeable *Haemophilus influenzae* disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. *Infect Ag Dis* 2:1–16 1993.
61. Takemura NS, Andrade SM. Meningite por *Haemophilus Influenzae* tipo b em cidades do Paraná. *J Pediatr (Rio J)*. 2001; 77:387-92.

62. Urwin G, Krohn JA, Deaver-Robinson D, Wenger JD, Farley MM, and the *Haemophilus influenzae* Study Group. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. *Clin Infect Dis* 22: 1069–1076, 1996.
63. Waggoner-Fountain, LA, Hendley JO, Cody EJ, Perriello VA, Donowitz LG. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin Infect Dis* 21: 1322–1324, 1995.
64. World Health Organization. Laboratory manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Geneva; 1999. (WHO/CDS/CSR/EDC/99.7).  
Disponível para download no site:  
<http://www.who.int/emcdocuments/meningitis/does/whocdscsredc997.pdf>.
65. World Health Organization. The database with studies of acute respiratory infections (ARI) in children under five years in developing countries.  
[http://www.who.int/child-adolescent-health/new\\_publications/overview/ari-db.htm](http://www.who.int/child-adolescent-health/new_publications/overview/ari-db.htm)
66. Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, Inoue M. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 38: 625–629, 1999.
67. Zacharisen MC, Watters SK, Edwards J. Rapidly fatal *Haemophilus influenzae* serotype f sepsis in a healthy child. *J Infect* 46:194–196, 2003.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados na PCR para o gene *bexA* e os tipos capsulares

Tipo capsular	Nome do <i>Primer</i>	<i>Primer</i> (5'-3')
a	a <sub>1</sub>	CTACTCATTGCAGCATTTC
	a <sub>2</sub>	
	a <sub>3</sub>	GAATATGACCTGATCTTCTG
b		AGTGGACTATTCTGTTACAC
	b <sub>1</sub>	GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC
	b <sub>2</sub>	
	b <sub>3</sub>	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA
c		ACCATGAGAAAGTGTTAGCG
	c <sub>1</sub>	TCTGTGTAGATGATGGTTCA
	c <sub>2</sub>	
	c <sub>3</sub>	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA
d		TGGCAGCGTAAATATCCTAA
	d <sub>1</sub>	TGATGACCGATAACAACCTGT
	d <sub>2</sub>	
	d <sub>3</sub>	TCCACTCTTCAAACCATTCT
e		CTCTTCTTAGTGCTGAATTA
	e <sub>1</sub>	GGTAACGAATGTAGTGGTAG
	e <sub>2</sub>	
	e <sub>3</sub>	GCTTTACTGTATAAGTCTAG
f		CAGCTATGAACAAGATAACG
	f <sub>1</sub>	GCTACTATCAAGTCCAAATC
	f <sub>2</sub>	
	f <sub>3</sub>	CGCAATTATGGAAGAAAGCT
<i>BexA</i>		AATGCTGGAGTATCTGGTTC
	HI1	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC
	HI2	
	HI3	TGTCCATGTCTITCAAAATGATG
		TGATGAGGTGATTGCAGTAGG

Fonte: PCR for Capsular Typing of *Haemophilus influenzae*. Falla et al., 1994

Tabela 2 -Tipagem capsular pela PCR dos 118 isolados de *H. influenzae* da nasofaringe de crianças.

1.1.1.2	Tipo Capsular	n	%
	a	1	(0,8)
	b	3	(2,5)
	f	2	(1,8)
	NC*	112	(94,9)
	Total	118	(100,0)

NC\* – não-capsulado

Tabela 3: Estado clínico das 118 crianças

Tipos Capsulares	<b>2.1.1.1.1.1 Condição Clínica das Crianças</b>			
	S	IRA	P	M
a	-	1	-	-
b	-	1	1	1
f	-	1	1	-
NC	11	81	17	3
Total	11 (9,3%)	84 (71,2%)	19 (16,1%)	4 (3,4%)

NC - *H. influenzae* Não Capsulado

S – saudável

IRA – infecção respiratória aguda

P – pneumonia

M - meningite

Tabela 4 – Perfil de suscetibilidade dos 118 *H. influenzae* isolados da nasofaringe de

Tipos Capsulares	Trimetoprim-sulfametoxazol				Ampicilina				
	R		S		R		S		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
a	1	(100)	-	-	-	1	(100)		
b	-	-	3	(100)	-	3	(100)		
f	2	(100)	-	-	-	2	(100)		
NC	35	(31,3)	77	(68,7)	8	(7,1)	104	(92,9)	

crianças

NC - *H. influenzae* Não Capsulado

R – resistente

S - sensível

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)