



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



Programa de Pós-Graduação em Imunologia

TESE DE DOUTORADO

**MENINGITE POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EM SALVADOR,
BAHIA: ASPECTOS DO PERÍODO PRÉ E PÓS VACINAL**

JOSILENE BORGES TORRES LIMA

Salvador - Bahia - Brasil
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Programa de Pós-Graduação em Imunologia

TESE DE DOUTORADO

**MENINGITE POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EM SALVADOR,
BAHIA: ASPECTOS DO PERÍODO PRÉ E PÓS VACINAL**

JOSILENE BORGES TORRES LIMA

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Co-orientadora: Dra. Joice Neves Reis

Tese apresentada ao colegiado do curso de
Pós graduação em Imunologia para obtenção
do grau de Doutor em Imunologia.

Salvador - Bahia - Brasil
2007

Meningite por *Haemophilus influenzae* em Salvador, Bahia: Aspectos do período pré e pós vacinal

JOSILENE BORGES TORRES LIMA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comissão Examinadora

Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Presidente

Pesquisador Titular do CPqGM - FIOCRUZ

A Deus, pela vida.

*A meu marido Marcos André Matos de Oliveira, pelo
incentivo e força nos momentos difíceis.*

A minha filhinha Luiza.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela oportunidade de concluir esta etapa.
- À minha família sempre presente, pais e irmão.
- Aos orientadores Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Dra. Joice Neves Reis e Dr. Albert Icksang Ko pela orientação indispensável.
- À professora e amiga Soraia Machado Cordeiro pelo trabalho realizado sempre em equipe, e pela força nos momentos difíceis.
- Um agradecimento especial aos colegas de equipe Guilherme de Sousa Ribeiro e Edilane Gouveia, especialmente na execução do levantamento de dados epidemiológicos e auxílio na parte epidemiológica do trabalho.
- À amiga Cristiane Ferraz, sempre presente com seu apoio.
- Às colegas da Equipe do grupo de Epidemiologia Molecular das Meningites Bacterianas: Ana Paula Menezes, Milena Soares, Leila Campos.
- Aos colegas do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, especialmente Andréa Carvalho, Cleiton Santos, Adriano Queiroz, Déborah Fraga, por compartilharem momentos difíceis e pelo apoio indispensáveis.
- Aos pesquisadores do LPBM: Dra. Marilda Gonçalves, Theomira e Eliana Reis.
- Ao Dr. Roberto Meyer, Dra. Songeli Menezes Freire e Dra. Cláudia Ida Brodskyn, coordenadores do Curso de Pós-graduação em Imunologia, pela competência com que têm conduzido o curso.
- Às secretárias do curso, Sra. Diléia e Luciane Tourinho, pela dedicação e com que vem exercendo suas atividades.
- À Sra. Ana Maria Fiscina Sampaio, coordenadora da Biblioteca, pela organização das referências bibliográficas, ficha catalográfica e normalização da dissertação.
- Ao corpo clínico do HCM e às bioquímicas Kátia Salgado e Neide Oliveira Silva, pelos isolamentos e fornecimentos das amostras bacterianas.
- Aos pacientes e familiares que consentiram em participar do estudo, permitindo assim, o desenvolvimento do projeto.
- A todos aqueles que, embora não citados, também contribuíram para o nosso êxito.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	06
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	07
RESUMO	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	10
1.2 INFECÇÕES INVASIVAS CAUSADAS PELO <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	12
1.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA.....	16
1.4 VACINAS CONTRA O <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> TIPO B.....	18
1.5 EPIDEMIOLOGIA DE INFECÇÕES INVASIVAS CAUSADAS PELO <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> SOROTIPO “B”.....	20
1.6 EPIDEMIOLOGIA DE INFECÇÕES INVASIVAS PELO <i>H. INFLUENZAE</i> DE SOROTIPO NÃO “B”.....	24
1.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 HIPÓTESES	30
4 OBJETIVOS	31
4.1 GERAL.....	31
4.2 ESPECÍFICOS.....	31
5 RESULTADOS	32
5.1 ARTIGO 01	32
<i>Haemophilus influenzae</i> meningitis 5 years after introduction of the <i>Haemophilus influenzae</i> type b conjugate vaccine in Brazil.....	33
5.2 ARTIGO 02	42
Non-type b <i>Haemophilus influenzae</i> meningitis in the <i>Haemophilus influenzae</i> type b vaccine era.....	43
5.3 ATUALIZAÇÃO DOS DADOS DA VIGILÂNCIA.....	67
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO A – Questionário epidemiológico.....	96
ANEXO B – Termo de consentimento.....	99
ANEXO C – Parecer do Comitê de ética.....	101
ANEXO D – Cidades que ficam no raio de 75 Km de Salvador.....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Typing Culture Collection</i>
BHC	Barreira hematoencefálica
BHI	<i>Broth heart infusion</i>
ET	Tipo eletroforético
Hai	Adesina de <i>Haemophilus influenzae</i>
Hap	Proteína de <i>Haemophilus</i> de aderência e penetração
HCM	Hospital Couto Maia
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HMW	Proteína de elevado peso molecular
Hsf	Fibrila de superfície de <i>Haemophilus</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LOS	Lipo-oligossacarídeo
MLEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NC	Não encapsulado
OMP	Proteína de membrana externa
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PFGE	<i>Pulse field gel electrophoresis</i>
PRP	Polirribosil ribitol fosfato
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
ST	<i>Sequence typing</i>
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
UPGMA	<i>Unweighted pair group method arithmetic averages</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Patogênese e patofisiologia das meningites bacteriana.....Pg.15
- Figura 2 - Países que implementaram a vacina conjugada anti-Hib no Programa Nacional de Imunizações, 2006.....Pg.20
- Figura 3 - Distribuição mensal dos casos de meningite por *Haemophilus influenzae* identificados em 11 anos de vigilância, de acordo com o sorotipo do isolado (n=546).....Pg.69
- Figura 4: Redução na incidência de meningite por Hib em crianças menores de 5 anos após introdução da vacina, na região metropolitana de Salvador (porcentagem de redução nos quadros) (n=345 casos).....Pg.70
- Figura 5: Incidência anual de meningite por Hib na região metropolitana de Salvador, estratificado por faixa etária.....Pg.71
- Figura 6: Incidência anual de meningite por *Haemophilus influenzae* em menores de 5 anos na região metropolitana de Salvador, estratificado pelo sorotipo do isolado.....Pg.72
- Figura 07: Incidência anual de meningite bacteriana em crianças menores de 5 anos entre Agosto de 1996 a Julho de 2007, por agente etiológico.....Pg.73
- Tabela 1: Classificação do *Haemophilus influenzae* em biotipos, segundo reações bioquímicas.....Pg.11
- Tabela 2: Distribuição dos sorotipos de 507 casos de meningite por *Haemophilus influenzae* identificados no Hospital Couto Maia no período de agosto de 1996 a julho de 2007.....Pg.67

RESUMO

A introdução de vacinas conjugadas contra o *Haemophilus influenzae* sorotipo “b” (Hib) foi um avanço de grande impacto na Saúde Pública, praticamente eliminando a meningite por Hib nos países onde foi implementada. O presente trabalho descreveu a meningite por *H. influenzae* em Salvador, Bahia, estudando o impacto da vacina, e caracterizou os isolados do sorotipo não “b”, identificados durante vigilância ativa populacional. A população estudada foi composta de pacientes identificados por cultura positiva para *H. influenzae*, e os dados clínicos obtidos através de entrevista e revisão de prontuário. O sorotipo dos isolados foi determinado utilizando anti-soros, e reação em cadeia pela polimerase (PCR). A tipagem molecular foi realizada pelas técnicas de eletroforese em campo pulsátil e *multilocus sequence typing*; e para identificação de mecanismo de virulência, foi utilizada PCR e sequenciamento da região de deleção *IS1016-bexA*. Para cálculos de incidência foram utilizados números de casos da região Metropolitana de Salvador, e a população do censo do ano de 2000. Após 5 anos de introdução da vacina anti-Hib, a incidência da meningite pelo *H. influenzae* teve uma redução de 97,6% na população total, e de 97,5% em menores de cinco anos. Em 11 anos de vigilância, foram identificados 40 casos de meningite por isolados do sorotipo não b, sendo 80% após o uso da vacina. Na caracterização molecular, os isolados do sorotipo “a” foram agrupados em dois clones, sendo que um deles apresentava o fator de virulência, a deleção parcial *IS1016-bexA*, o qual foi associado com elevada mortalidade (OR 10,8 e IC 0,7-345). Estudos de epidemiologia molecular são importantes para estimar a eficácia da vacina, bem como monitorar a emergência de isolados de outros sorotipos para avaliar a necessidade de intervenção na composição da vacina.

Palavras-chaves: *Haemophilus influenzae*. Meningite. Vacina. Vigilância populacional. Epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Introduction of polysaccharide conjugate vaccines against *Haemophilus influenzae* type “b” (Hib) was a major public health advances, practically eliminating the Hib meningitis in countries where it was implemented. The aims of this work were to describe the *H. influenzae* meningitis in Salvador, Bahia, looking for the impact of vaccination, and to characterize non-type “b” isolates of *H. influenzae*, identified during active surveillance. The study population included patients identified through positive cultures for *H. influenzae*, and clinical data obtained through interview and medical chart review. The serotype of the strains was determined using anti-sera and polymerase chain reaction. Molecular typing was performed through pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing; and to identify a virulence mechanism, we performed a polymerase chain reaction and sequencing of *IS1016-bexA* deletion region. For the incidence numbers, it was utilized the number of cases of Metropolitan region of Salvador, and census for the population in 2000. Five years after the implementation of vaccine, the incidence of meningitis caused by *H. influenzae* reduced to 97.6% in the total population, and 97.5% at children < 5 years old. In 11 years of surveillance, it was identified 40 cases of meningitis due to non-type b isolates, being 80% after vaccine. In the molecular characterization, it was identified two clones of type a isolates, one of those presenting the *IS1016-bexA* deletion as a virulence factor associated with high mortality (OR 10.8; CI 0.7-345). Concluding, studies of molecular epidemiology are important to evaluate the efficacy of vaccines, and to monitor the sprouting of isolates from others serotypes (non-type b) to evaluate if it is necessary a vaccine’s composition intervention.

Key Words: *Haemophilus influenzae*. Meningitis. Vaccines. Active surveillance. Molecular epidemiology.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HAEMOPHILUS INFLUENZAE

O *Haemophilus influenzae* é um cocobacilo Gram negativo pleomórfico, imóvel, não formador de esporos, exclusivamente encontrado no trato respiratório superior de humanos. São anaeróbios facultativos, e para crescimento *in vitro* necessitam de fatores de crescimento presentes no sangue, que são: o fator X – hemina, e o fator V – nicotinamida adenina nucleotídeo (NAD). Para crescimento ideal, necessitam ainda de ambiente rico em umidade, atmosfera com 5 a 10% de CO₂, e temperatura ótima entre 35°C a 37°C (KILIAN, 2003)

O *H. influenzae* possui seis tipos capsulares que são antigenicamente e sorologicamente distintos, os quais foram descritos por Margaret Pittman em 1931 (PITTMAN, 1931). Os seis sorotipos são denominados como: “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f”; existindo ainda a variante não tipável ou não capsulado (NC), quando a bactéria não possui cápsula ou não pode ser tipada por métodos sorológicos. Dentre os sorotipos do microorganismo, o mais comumente associado com doenças invasivas na era pré-vacina foi o sorotipo “b”. A composição da cápsula do *H. influenzae* sorotipo b (Hib) foi descrita primeiramente em 1953 por Zamenhof e cols. (ZAMENHOF *et al.*, 1953), como sendo composta de cadeias de polirribose-fosfato com ligações ribose, um conhecido fator de virulência do microorganismo. Pode-se classificar o *H. influenzae* em três grupos utilizando como base a estrutura dos tipos capsulares e resistência ao complemento: o primeiro grupo seria formado pelos sorotipos “a” e “b”, que são mais virulentos e compostos de um açúcar neutro, um álcool (ribitol), e um grupo fosfodiéster; o segundo grupo contendo os sorotipos “c” e

“f”, apresentam menor resistência ao complemento e baixa virulência, e são compostos de um açúcar amino N-acetilado; e o terceiro grupo, formado pelos sorotipos “d” e “e”, são rapidamente lisados pelo complemento, e têm uma unidade repetitiva de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico (SUTTON *et al.*, 1982) (JIN *et al.*, 2007).

O *H. influenzae* pode ser subdividido em oito biotipos, de acordo com três reações bioquímicas a seguir: produção de indol, presença de urease, e atividade de ornitina descarboxilase, descritas na tabela 1. Existe correlação dos biotipos de *H. influenzae* com o sítio de isolamento (HARPER e TILSE, 1991) (OBERHOFER e BACK, 1979), e também com o sorotipo, sendo a maioria de cepas dos sorotipos “a”, “b”, e “f” do biotipo I (KILIAN, 1976).

Tabela 1: Classificação do *Haemophilus influenzae* em biotipos, segundo reações bioquímicas.

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

Traduzido de Murray, Baron, Jorgensen, Pfaller e Tenenbaum. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, 8th edition, Vol 1, pg 629, 2003.

1.2 INFECÇÕES INVASIVAS CAUSADAS PELO *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Dentre as infecções causadas pelo *H. influenzae*, tem-se a epiglote, pneumonia, celulite, bacteremia, artrite séptica e meningite, mais comumente relacionadas com cepas encapsuladas; e ainda otite média, sinusite, seps neonatal, conjuntivite e bacteremia, causadas por cepas não tipáveis ou não capsuladas (MOXON, 2000).

A pneumonia é a síndrome clínica mais freqüente em pacientes com idade acima de 60 anos, acometidos pelo *H. influenzae* do sorotipo “f”, seguida de meningite, septicemia, e outras síndromes clínicas (URWIN *et al.*, 1996). Cerca de 78% dos adultos e 26% das crianças apresentam doenças preexistentes, nas infecções pelo sorotipo “f” (URWIN *et al.*, 1996).

Um estudo de revisão avaliando a etiologia da pneumonia em crianças na América do Norte e Europa identificou o *H. influenzae* como agente em 7% dos casos, enquanto que na África e América do Sul, o microorganismo foi isolado em 21% dos casos (Apud (NASCIMENTO-CARVALHO, 2001)).

Antes da estratégia de prevenção contra o *Haemophilus influenzae* sorotipo “b” (Hib), este microorganismo era o principal causador de meningites bacterianas no Brasil. A principal faixa etária acometida eram crianças com idade inferior a 2 anos, devido à falha na produção de anticorpos específicos contra o antígeno capsular do microorganismo (MAKELA *et al.*, 1992). A figura 1 descreve bem a patogênese das meningites bacterianas.

O *H. influenzae* coloniza o trato respiratório superior, e sabe-se que fímbrias estão envolvidas na adesão do microorganismo nas células do trato respiratório, apesar da presença dessas fímbrias não ser necessária para o desenvolvimento de

doenças invasivas (TUNKEL e SCHELD, 1993). Após colonização nasofaringeana, a invasão na corrente sanguínea parece ocorrer através das junções entre as células epiteliais, levando à invasão por um mecanismo inter-celular. A cápsula polissacarídica também é um fator importante para a colonização nasofaringeana e invasão sistêmica de patógenos na meninge. A aderência do microorganismo à superfície mucosa pode ser inibida por anticorpos encontrados nas secreções, como IgA, mas o *H. influenzae* produz proteases IgA1 que clivam os anticorpos, conseqüentemente facilitando a aderência (TUNKEL e SCHELD, 1993).

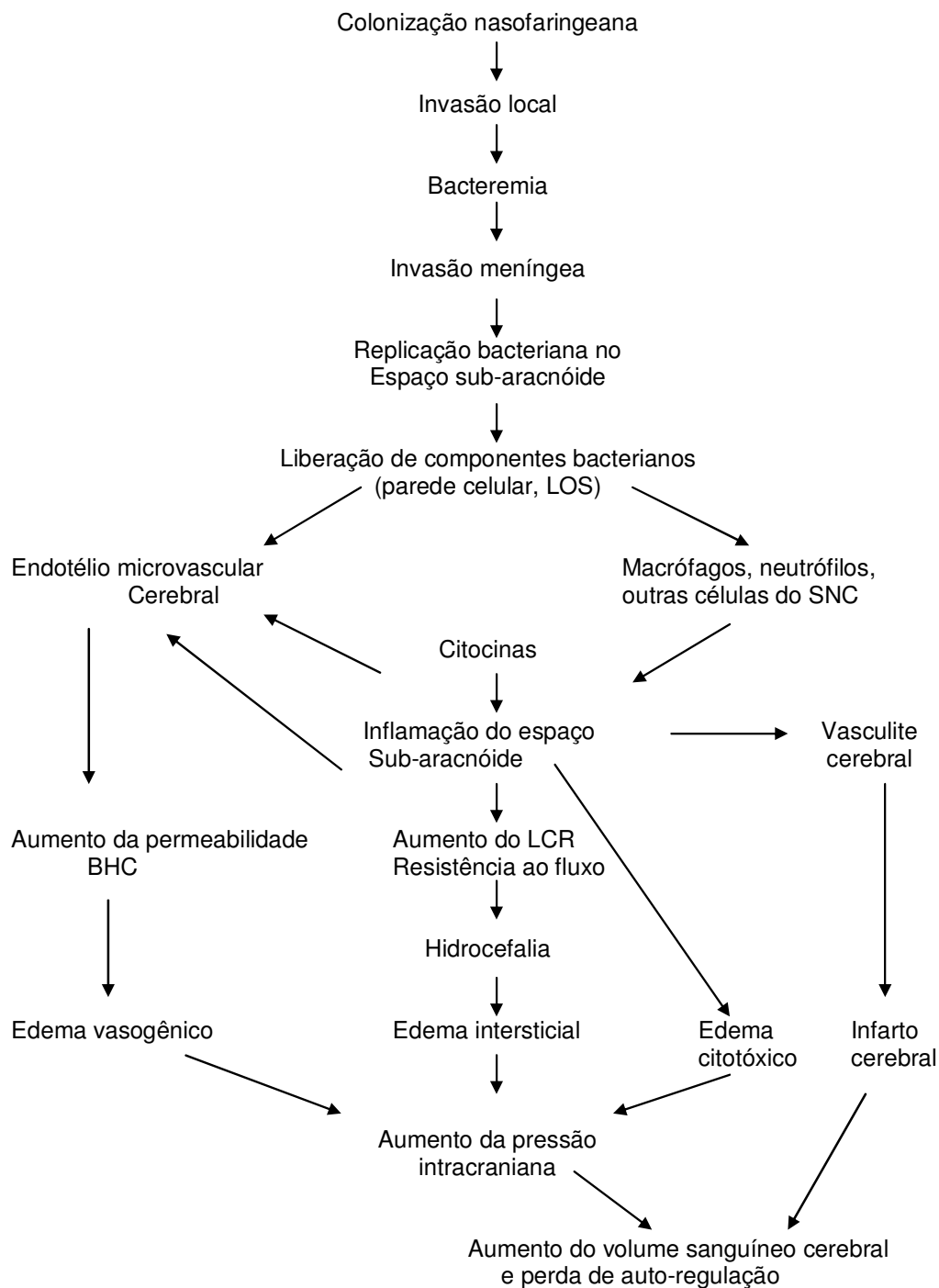
Uma vez que a bactéria atravessa a barreira mucosa e tem acesso à corrente sanguínea, precisa sobreviver a mecanismos de defesa do hospedeiro, e nesse sentido, a presença da cápsula polissacarídica tem novamente importância, inibindo a fagocitose e resistindo à atividade bactericida mediada pelo complemento, o que permite a sobrevivência do microorganismo na corrente sanguínea, e facilita a replicação intravascular (TUNKEL, 2000).

O próximo passo do microorganismo é atingir o sistema nervoso central, mas o mecanismo pelo qual esse acesso ocorre ainda é desconhecido. No entanto, uma vez que os patógenos conseguem penetrar no espaço sub-aracnóide, os mecanismos de defesa do hospedeiro são inadequados para controlar a infecção (TUNKEL e SCHELD, 1993), já que a concentração de componentes do complemento é ausente ou mínima, dificultando a opsonização de cepas encapsuladas, e conseqüentemente, a fagocitose; e também a concentração de imunoglobulinas é baixa em comparação às concentrações encontradas no soro. Dessa forma, por falta de atividade funcional opsonizante e bactericida, a bactéria pode se multiplicar e atingir concentrações elevadas no sistema nervoso central durante a meningite.

Alguns fatores bacterianos e até mesmo do hospedeiro contribuem para a inflamação do espaço sub-aracnóide. Dentre os fatores bacterianos estão: componentes da parede celular, peptidoglicano, lipo-oligosacarídeo (LOS), e vesículas de membrana externa; e os fatores do hospedeiro como prostaglandinas, interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12), INF γ , TNF α , molécula de adesão inter-celular 1, e outros fatores. Ocorre então uma alteração na barreira hemato-encefálica (BHC) e o aumento da pressão intracraniana em decorrência do edema cerebral. A origem deste edema pode ser vasogênica, citotóxica, intersticial ou da combinação destes fatores (TUNKEL, 2000).

Nenhum dos sintomas clínicos devido à meningite pelo *H. influenzae* pode distinguir tal infecção de outras formas de meningite bacteriana. Os sintomas incluem febre e alterações nas funções do sistema nervoso central, podendo levar ao coma à medida que a doença evolui. Pode ocorrer ainda efusão subdural, tensão anterior da fontanela, convulsões, hemiparesia, ou deterioração neurológica (MOXON, 2000). Em crianças muito jovens, a meningite pelo *H. influenzae* pode ser fulminante, com o óbito ocorrendo em poucas horas, e em crianças de mais idade, pode-se observar alteração do estado mental (MOXON, 2000).

Figura 1: Patogênese e fisiopatologia das meningites bacterianas



Traduzido de Mandell, Douglas e Bennettts. Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, 5th edition, Vol 1, pg 965, 2000; e Tunkel e Scheld. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis, Clin Microbiol Rev, pg 118-136, 1993.

1.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA

A cápsula polissacarídica do *H. influenzae* sorotipo “b” (Hib), é o principal fator de virulência do microorganismo, e já foi bem caracterizada com a organização genética do locus capsular descrita (KROLL *et al.*, 1989) (KROLL *et al.*, 1993). Ela contém a duplicação de um segmento de DNA de 18Kb (HOISETH *et al.*, 1986) e uma região de ponte de 1,3Kb contendo o cluster do gene *bex* (*bexA*, *bexB*, *bexC* e *bexD*) (KROLL, 1992), responsável pela exportação do polissacarídeo para a superfície bacteriana (KROLL e MOXON, 1988). Essa organização permite a duplicação ou perda da estrutura capsular por recombinação homóloga.

Um evento muito comum em cepas invasivas do sorotipo “b” é a ocorrência de uma duplicação parcial do locus *cap*, sendo uma cópia intacta e outra com deleção parcial do gene *bexA* e do elemento de inserção IS1016 (KROLL *et al.*, 1988). Essa deleção parcial, denominada deleção *IS1016-bexA* estabiliza a duplicação, aumentando o número de cópias do locus capsular e a produção da cápsula polissacarídica. Já foram desenvolvidas técnicas para quantificar o número de cópias do locus capsular de isolados do sorotipo “b” (CORN *et al.*, 1993) e de outros sorotipos (OGILVIE *et al.*, 2001), e foi observado que o aumento do número de cópias do locus capsular pode estar contribuindo para a virulência de cepas encapsuladas do sorotipo não “b” (OGILVIE *et al.*, 2001).

A deleção *IS1016-bexA* que foi inicialmente identificada em isolados do sorotipo “b” como um importante fator de virulência (KROLL *et al.*, 1993), foi detectada por KROLL *et al.* (1994) em isolados do sorotipo “a”. Mais recentemente, alguns estudos também identificaram a deleção *IS1016-bexA* em isolados de *H.*

influenzae do sorotipo “a”, que estavam associados a casos de doenças invasivas (ADDERSON *et al.*, 2001) (KAPOGIANNIS *et al.*, 2005).

Para isolados de *H. influenzae* do sorotipo “b” e de cepas não tipáveis ou cepas não encapsuladas (NC), já foram descritos diversos fatores de virulência (MOXON, 1992) (ST GEME, 2000). Em isolados do sorotipo “b”, alguns fatores de virulência estão relacionados à cápsula, como o efeito da amplificação do locus Cap b, que está associado com a diminuição da susceptibilidade da lise do patógeno, mediada pelo complemento; bem como a dificuldade de opsonização mediada pelo complemento (NOEL *et al.*, 1996). Existem ainda outros fatores de virulência, como proteínas de membrana: protease IgA1, lipopolissacarídeo e proteínas de membrana externa (OMPs) (TURK, 1984). Para isolados NC, existem adesinas que estão relacionadas com a aderência do microorganismo na superfície do epitélio (RAO *et al.*, 1999), que são adesinas tipo pili, como as hemaglutininas (HifA, HifB, HifC, HifD e HifE) ou adesinas não pili, dentre elas a Hap (proteína de *Haemophilus* de aderência e penetração), HMW1 e HMW2 (proteínas de elevado peso molecular), Hai (adesina de *H. influenzae*), e Hsf (fibrila de superfície de *Haemophilus*) (ST GEME *et al.*, 1993) (ST GEME, 2000). Além disso, em 1995 SHEN e cols. (SHEN *et al.*, 2005) identificaram 72 genes de cepas de *H. influenzae* não capsuladas que foram isoladas de pacientes com otite média, genes estes não relacionados com a cepa do genoma Rd, um isolado não capsulado e não virulento, que foi seqüenciado em 1995 (FLEISCHMANN *et al.*, 1995). Algumas seqüências desses genes mostraram ter homologia com genes de proteínas já identificadas em outros isolados virulentos, tais como clusters de genes para pili de hemaglutininas, *hif*, e *hmw*, mas foram também identificados novos genes de proteínas de ligação à hemoglobina, proteínas auto-transportadoras, e proteína com homologia a ilhas de patogenicidade

de *Shigella* (SHEN *et al.*, 2005). Embora os diversos fatores de virulência de cepas do sorotipo “b” e cepas não capsuladas sejam bem reconhecidos, pouco se sabe sobre a virulência de isolados de *H. influenzae* do sorotipo não “b”.

1.4 VACINAS CONTRA O *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TIPO B (HIB)

Desde o início dos anos de 1970, começaram a ser desenvolvidas vacinas compostas pelo polissacarídeo polirribosil ribitol fosfato (PRP), componente da camada externa do *H. influenzae* sorotipo “b” (CRISEL *et al.*, 1975), mas que não foram muito eficazes na prevenção por não conferir proteção a crianças com idade inferior a 18 meses (PELTOLA e VIRTANEN, 1984), faixa etária mais atingida por infecções invasivas pelo *H. influenzae* sorotipo “b”.

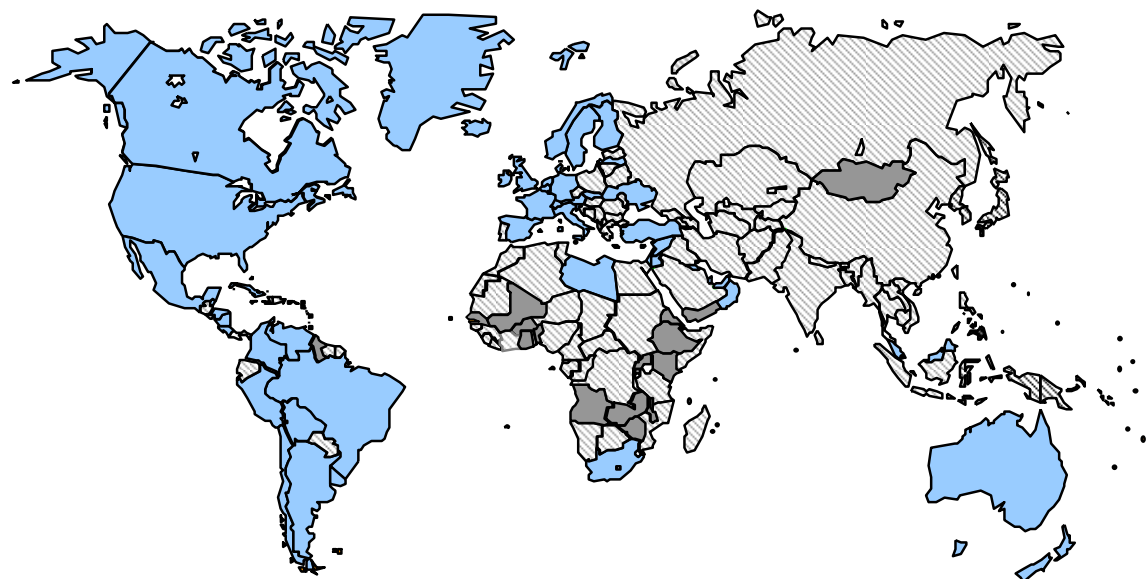
A imunidade adquirida contra bactérias encapsuladas, como é o exemplo do *H. influenzae*, depende da resposta de anticorpos; portanto, vacinas contra este microorganismo precisam induzir níveis de anticorpos satisfatórios para induzir proteção contra a doença, e a vacinação também precisa induzir uma memória imunológica. Em se tratando de antígenos protéicos, esta memória é montada pela expansão de células B atuando em combinação com células T. No entanto, o polissacarídeo, que é justamente o componente da camada externa do *H. influenzae* sorotipo “b”, não é reconhecido por células T, conferindo então uma resposta T-independente muito fraca (MCVERNON *et al.*, 2004). Para solucionar esse problema da vacina polissacarídica, foram testadas vacinas conjugadas combinando o antígeno capsular (PRP) com uma proteína carreadora que confere resposta dependente de célula T; já que as duas partes não precisam necessariamente ser parte da mesma molécula para ocorrer o reconhecimento pela célula T, mas sim,

devem estar fisicamente ligadas (LANZAVECCHIA, 1986) (MITCHISON, 1992). Quatro combinações para uma vacina conjugada tornaram-se disponíveis comercialmente, sendo: conjugação com o toxóide diftérico (PRP-D, ProHIBiT) (ESKOLA *et al.*, 1990), com a toxina mutante da difteria (PRP-CRM ou HbOC, HibTITER) (ANDERSON, 1983), com proteína de membrana externa de meningococo (PRP-OMP, PedvaxHIB) (SANTOSHAM *et al.*, 1991), e com toxóide tetânico (PRP-T, ActHIB, OmniHIB ou Hiberix) (CHU *et al.*, 1983). Em comparação com as outras três vacinas, a vacina conjugada com o toxóide diftérico (PRP-D) é menos imunogênciã em crianças com menos de 18 meses, e por este motivo vem sendo retirada do mercado, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006).

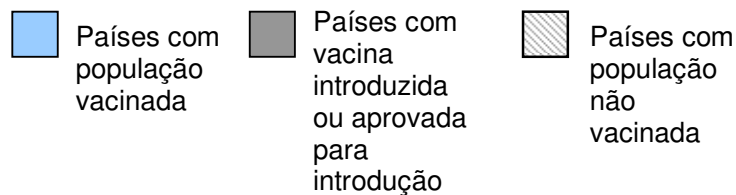
A recomendação pela OMS para que a vacina conjugada contra o *H. influenzae* sorotipo “b” (Hib) fosse incluída nos programas de imunização infantil ocorreu em 1998 (1998), sendo efetivamente implementada no Brasil em Agosto de 1999. Em Salvador-Ba, a vacina administrada no primeiro ano de vacinação foi conjugada com a toxina mutante da difteria CRM 197 (HbOC); sendo substituída nos anos seguintes pela conjugação com o toxóide tetânico (PRP-T).

Como conseqüência da vacinação, o quadro epidemiológico de infecções invasivas pelo *H. influenzae* teve uma mudança importante em diversos países, incluindo o Brasil; porém muitos países ainda continuam sem vacinação, principalmente países da África e Ásia:

Figura 2: Países que implementaram a vacina conjugada anti-Hib no Programa Nacional de Imunizações, 2006.



Implementação da vacina anti-Hib



Adaptado de The Hib Initiative. WHO/IVB Database. Nov, 2006

http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/Hib/en/index.html.

1.5 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES INVASIVAS CAUSADAS PELO *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* SOROTIPO “B”

A situação atual descrita em diversos países é de que a introdução de vacinas conjugadas contra o *H. influenzae* sorotipo “b” (Hib) tem reduzido as taxas de infecções invasivas por este microorganismo, com efetividade em torno de 90-100%

(SANTOSHAM *et al.*, 1991) (2002) (ADEGBOLA *et al.*, 2005) (FARHOUDI *et al.*, 2005).

Na Europa, estima-se que a vacina anti-Hib tenha praticamente eliminado infecções pelo *H. influenzae* sorotipo “b” em mais de 10 países, e esteja prevenindo mais de 10.000 casos de meningite por ano em crianças com idade inferior a 5 anos (PELTOLA, 1998).

Nos Estados Unidos, sabe-se que doenças invasivas pelo *H. influenzae* sorotipo “b” tiveram um declínio maior que 99% em crianças menores de 5 anos (2002). Como exemplo, antes da implementação da vacina anti-Hib no Alasca, em 1991, a incidência de doenças invasivas devido ao *H. influenzae* tipo “b” era uma das mais altas no mundo, chegando a 309,4 casos/100.000 hab. em crianças nativas, e 84,8 casos/100.000 hab. em crianças não nativas. Após 4 anos de imunização, essas taxas foram reduzidas para 18,3 casos/100.000 hab., e 3,5 casos/100.000 hab. respectivamente (SINGLETON *et al.*, 2006), enfatizando a importância da vacina para a saúde Pública.

Em Cuba, a cobertura nacional da vacinação atingiu 97% da população-alvo, tendo uma efetividade em torno de 99%, favorecendo uma diminuição de 52,8% nos casos de meningoencefalite por *H. influenzae* sorotipo “b” na população geral (DICKINSON *et al.*, 2001). No Chile, a intervenção da vacina teve boa efetividade, sendo de 91,7% para doenças invasivas, em crianças que receberam as três doses da vacina anti-Hib (LAGOS *et al.*, 1996); e ainda no Uruguai, a taxa de cobertura vacinal foi de 76,6% em quatro meses de sua implementação, reduzindo a incidência nos dois primeiros anos de imunização de 15,6 para 0,03 casos/100.000 hab., em crianças com idade inferior a 5 anos (RUOCCO *et al.*, 1999).

No Brasil, a vacina conjugada contra o *H. influenzae* sorotipo “b” foi implementada no programa nacional de imunizações em agosto de 1999. Em Londrina e Curitiba, no Paraná, a vacina anti-Hib foi implementada 30 meses antes em comparação ao restante do país, e permitiu uma visualização prévia do quadro brasileiro. A incidência da meningite reduziu de 23,91 para 2,79 casos/100.000 hab. em Londrina; e de 35,04 para 5,59 casos/100.000 hab. em Curitiba, em crianças menores de 5 anos, após 2 anos de vacinação; enquanto que em outras cidades no estado do Paraná, as taxas de incidência continuavam sem alterações porque ainda não havia sido introduzida a vacina anti-Hib (TAKEMURA e ANDRADE, 2001).

Após agosto de 1999, outros estudos foram realizados em diversos estados brasileiros, para avaliar a efetividade da vacina. Um estudo avaliando o impacto dos programas de vacinação no Brasil, identificou redução na incidência da meningite pelo *H. influenzae* tipo “b”, de 6,83 para 3,26 casos/100.000 hab. no país, em crianças menores de 5 anos de idade, 3 anos após introdução da vacina (MIRANZI SDE *et al.*, 2007). Avaliando os estados de Pernambuco, Santa Catarina e Rio de Janeiro, foi observada uma diminuição na prevalência da meningite de 165 para 33 casos/100.000 hab. após 4 anos de imunização (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Em dois anos após introdução da vacina anti-Hib, a incidência da meningite reduziu bastante em diversos outros estados brasileiros, como: em Goiás, onde a incidência caiu de 10,8 para 2,3 casos/100.000 hab., em menores de 2 anos (SIMOES *et al.*, 2004); no Rio Grande do Sul, a redução foi de 36,5 para 3,4 casos/100.000 hab., em menores de um ano (KMETZSCH, 2003); e no Distrito Federal, a incidência reduziu de 168 para 15 casos/100.000 hab. em crianças de 7 a 35 meses (FREITAS e MERCHAN-HAMANN, 2006).

Em Salvador, a incidência da meningite por Hib reduziu de 53,8 para 12,4 casos/100.000 hab. em menores de 2 anos, um ano após introdução da vacina (RIBEIRO *et al.*, 2003); e um estudo realizado em 2004 na Fundação José Silveira em Salvador, identificou que a implementação da vacina conjugada anti-Hib possivelmente pode reduzir não apenas a ocorrência da meningite pelo *H. influenzae* sorotipo “b”, mas também as meningites bacterianas de etiologia não identificada, fato este observado mas ainda sem explicação clínico-epidemiológica (NASCIMENTO-CARVALHO e MORENO-CARVALHO, 2004).

Outro fato bem descrito é o de que além de ter efetividade muito importante na prevenção em crianças vacinadas, a vacina contra o Hib tem a característica de reduzir a colonização nasofaríngea, conferindo redução de infecções também em crianças não imunizadas através do fenômeno descrito como imunidade de rebanho (MOULTON *et al.*, 2000) (HVIID e MELBYE, 2004).

Um fato que não pode ser ignorado com relação à vacinação é o aumento na incidência de doenças invasivas pelo *H influenzae* sorotipo “b” no Reino Unido (RAMSAY *et al.*, 2003) e Países Baixos (RIJKERS *et al.*, 2003), 7 anos e 9 anos após introdução da vacina, respectivamente. A vacina no Reino Unido foi implementada, em crianças aos 2, 3 e 4 meses de idade, e a efetividade da vacinação foi reduzida ao longo da distribuição da vacina conjugada com um componente diftérico acelular (DTaP-Hib) (MCVERNON *et al.*, 2003), que poderia estar contribuindo para o aumento na incidência de doenças invasivas, segundo a OMS (OMS, 2006). Além disso, como desde 1992 o Reino Unido tem obtido uma cobertura elevada de imunização, a redução da colonização nasofaríngea pode estar reduzindo o reforço natural da vacina (OMS, 2006), (MCVERNON *et al.*, 2004).

Em contrapartida, com a redução de infecções invasivas pelo *H. influenzae* no mundo, países como Indonésia e Bangladesh, onde a vacina contra o Hib ainda não foi implementada nos calendários de imunização infantil, as taxas de incidência de meningite e outras doenças causadas pelo *H. influenzae* continuam elevadas (SAHA *et al.*, 2005) (GESSNER *et al.*, 2005). Um estudo com dados de 11 países da África e Ásia demonstram que a incidência de meningite em crianças ainda atinge taxas que vão de 4 casos /100.000 hab. no Usbequistão (menor incidência), chegando a 59 casos /100.000 hab. na Uganda, e 72 casos/100.000 hab. em Ghana, países com elevadas incidências (FEIKIN *et al.*, 2004). Uma explicação para o atraso na introdução da vacina anti-Hib nos calendários de imunização destes países, assim como em outros países em desenvolvimento seria o custo elevado da vacina associado à escassez de informações da epidemiologia da doença causada pelo *H. influenzae* (DOMINGUEZ e DAUM, 2003; NASCIMENTO-CARVALHO e DE ANDRADE, 2006).

Conseqüentemente à redução de casos de doenças invasivas por Hib após campanhas de imunização infantil, começaram a ser descritos em diversos países, casos de infecções devido a outros sorotipos, designados como sorotipo não “b”, antes raramente associados a doenças graves (CERQUETTI *et al.*, 2003) (OGILVIE *et al.*, 2001) (ADDERSON *et al.*, 2001).

1.6 EPIDEMIOLOGIA DE INFECÇÕES INVASIVAS PELO *H. INFLUENZAE* DE SOROTIPO NÃO “B”

Infecções associadas aos demais sorotipos do *Haemophilus influenzae*, também descritos como sorotipo não “b”, estão se tornando freqüentes em diversos

países. Na Europa, alguns casos foram descritos, como na Itália, onde foram identificados 5 casos de infecções invasivas pelo sorotipo “e” em adultos (CERQUETTI *et al.*, 2003); na Espanha, 26 isolados do sorotipo “e” foram caracterizados (CAMPOS *et al.*, 2003); e na Alemanha, um caso de meningite devido ao sorotipo “f” em criança imunocomprometida (FICKWEILER *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos, alguns estudos relatam casos de infecções devido ao sorotipo não “b” em crianças e adultos, que surgiram após início das campanhas de imunização contra o Hib. Foram descritos casos de infecções pelos sorotipos “e” e “f” (WAGGONER-FOUNTAIN *et al.*, 1995) (URWIN *et al.*, 1996) (OGILVIE *et al.*, 2001), e principalmente infecções por isolados do sorotipo “a” associados com elevada virulência (ADDERSON *et al.*, 2001) (HAMMITT *et al.*, 2005) (MILLAR *et al.*, 2005).

Também no Canadá, foram identificados casos de infecções invasivas pelo sorotipo “a” (26 casos), e por cepas não capsuladas ou não tipáveis (20 casos) maior que o número de casos de infecções pelo sorotipo “b” (apenas 3 casos) (TSANG *et al.*, 2006). Mais recentemente, ainda no Canadá, foi documentado que a incidência de doenças invasivas pelo *H. influenzae* sorotipo não “b” está se aproximando das taxas de infecções pelo tipo “b” que ocorriam antes da vacina (TSANG *et al.*, 2007).

No Brasil, foi identificado um aumento estatisticamente significativo da meningite pelo sorotipo “a” no primeiro ano da campanha de imunização contra o sorotipo “b” (RIBEIRO *et al.*, 2003), e embora esse aumento não tenha persistido nos anos seguintes (RIBEIRO *et al.*, 2007), casos de meningite devido ao sorotipo “a” e outros sorotipo não “b”, continuam ocorrendo.

Ferramentas como a epidemiologia molecular são indispensáveis para tentar identificar fatores associados à emergência de infecções ocasionadas por outros sorotipos do *H. influenzae*, e também para avaliar a efetividade da vacina, que é sorotipo dependente; para isso, diversos estudos utilizando a epidemiologia molecular vem sendo desenvolvidos para responder questões epidemiológicas.

1.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Métodos de tipagem molecular são muito utilizados para auxiliar estudos epidemiológicos. A caracterização de patógenos é importante para compreender a transmissão de doenças, identificar surtos, avaliar a disseminação de cepas hipervirulentas ou a resistência antimicrobiana, e também é fundamental no auxílio de estudos relacionados a programas de vacinação.

Diversos métodos de tipagem vêm sendo utilizados para a caracterização de patógenos. Um dos primeiros a serem utilizados para o *Haemophilus influenzae* foi o *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), que avaliou diferenças genéticas entre o *H. influenzae* tipo “b” e não tipável (MUSSER *et al.*, 1986), demonstrando assim a clonalidade de cepas encapsuladas do *H. influenzae* (MUSSER *et al.*, 1988). Essa técnica determina o genótipo identificando alelos de loci através da análise da variação de mobilidade eletroforética, alelos esses que codificam enzimas constitutivas. Mas tem como desvantagens o tempo longo para sua execução, e a dificuldade de reproduzir os resultados em diferentes laboratórios (ENRIGHT e SPRATT, 1999), o que impossibilita a comparação de tipos eletroforéticos em diversos países.

Para resolver o problema da dificuldade de comparação entre laboratórios do MLEE, foi desenvolvida a técnica de *multilocus sequence typing* (MLST) (MAIDEN *et al.*, 1998), realizando o sequenciamento direto de fragmentos internos de sete genes constitutivos, correspondentes às enzimas do MLEE. A comparação entre os laboratórios pode ser realizada através de um banco de dados via Internet, através do site <http://www.mlst.net>, que armazena informações de milhares de seqüências de genes constitutivos de cepas de diversas espécies bacterianas, dentre elas o *Haemophilus influenzae*, a *Neisseria meningitidis* e o *Streptococcus pneumoniae*, patógenos mais freqüentemente causadores de meningites bacterianas. O MLST foi utilizado para caracterizar 131 isolados capsulados e não capsulados do *H. influenzae* por Meats em 2003 (MEATS *et al.*, 2003), e para estudar a estrutura do *Haemophilus parasuis* por Olvera em 2006 (OLVERA *et al.*, 2006). Além disso, o MLST vem sendo extensivamente utilizado para identificar a transmissão de clones resistentes à penicilina e outros antimicrobianos, de isolados de *Streptococcus pneumoniae*, em diversos países, como os Estados Unidos (PAI *et al.*, 2005); Reino Unido (SMITH *et al.*, 2006); Alemanha (REINERT *et al.*, 2007); Espanha (MARIMON *et al.*, 2006) e Portugal (SOUSA *et al.*, 2005). A única desvantagem do MLST é a necessidade de uma infra-estrutura de alto custo em equipamentos e reagentes, o que pode dificultar a execução da técnica em alguns laboratórios.

Uma das técnicas utilizadas para a tipagem molecular do *Haemophilus influenzae*, a eletroforese em campo pulsátil (*pulsed-field gel electrophoresis*-PFGE), é o método mais utilizado para avaliar surtos (HAMMITT *et al.*, 2005) e para estudar a epidemiologia molecular deste microorganismo (MILLAR *et al.*, 2005). O PFGE é uma eletroforese que separa através de campo pulsátil fragmentos do DNA bacteriano que são gerados através de cortes específicos em sítios de restrição,

quando são utilizadas enzimas de restrição. Estes fragmentos separados vão resultar em padrões de bandas específicos para determinada cepa. Os critérios para analisar a clonalidade entre as cepas pela técnica de PFGE foi desenvolvido por Tenover em 1995 (TENOVER *et al.*, 1995); que classificou a relação epidemiológica através de eventos genéticos que ocorrem entre as cepas. Sendo assim, elas foram classificadas como sendo indistinguíveis, quando apresentam o mesmo número e posição de bandas, gerados pela eletroforese em resultado do corte de restrição; fortemente relacionadas, contando com um único evento genético e gerando até 3 bandas de diferença; possivelmente relacionadas, quando resulta de dois eventos genéticos independentes, com 4 a seis bandas de diferença; e a partir de três eventos genéticos, com mais de 6 bandas de diferença, são isolados não relacionados.

Outros métodos já foram utilizados para a caracterização do *Haemophilus influenzae*, como análises de proteína de membrana externa (DIMOPOULOU *et al.*, 1992), ribotipagem (WANG *et al.*, 2001) e análises de endonuclease de restrição (VAN BELKUM *et al.*, 1994), mas atualmente o método mais utilizado é o PFGE.

A epidemiologia molecular do *H. influenzae* é uma ferramenta muito importante principalmente para tentar explicar a transmissão de doenças entre os isolados do sorotipo não “b”, antes raramente associados a doenças invasivas, e tão freqüentemente descritos após introdução das vacinas conjugadas contra o *H. influenzae* sorotipo “b”. Também tem importância para o monitoramento da efetividade da vacina, para avaliar a necessidade, no futuro, da possível implementação de outro tipo de vacina, que possa oferecer cobertura para outros sorotipos.

2 JUSTIFICATIVA

Após implementação de vacinas conjugadas contra o *Haemophilus influenzae* sorotipo “b” (Hib), o quadro epidemiológico da meningite por este microorganismo apresentou uma mudança global. A meningite, infecção mais séria causada por Hib, praticamente foi eliminada nas populações que introduziram a vacina nos programas de vacinação. A ocorrência, no entanto, de infecções por outros sorotipos vem sendo documentada em diversos países, incluindo o Brasil.

Um sistema de Vigilância Populacional ativa para as meningites bacterianas foi estabelecido no Hospital de referência para doenças infecciosas na cidade de Salvador, desde 1996, 3 anos antes do início das campanhas de imunização contra o *H. influenzae* sorotipo “b”; e um estudo prévio identificou aumento de oito vezes na incidência da meningite pelo *H. influenzae* sorotipo “a” no primeiro ano de imunização, por isolados possivelmente associados ao fenômeno na troca de cápsula, ou *serotype replacement*. Esse achado, em combinação com o aumento da incidência de infecções invasivas pelo *H. influenzae* após sete anos de imunização, em locais como o Reino Unido e Países Baixos, justificam a necessidade de dar seguimento à vigilância populacional para avaliar a efetividade da vacina após longo período de sua implementação; e avaliar se a ocorrência de infecções por outros sorotipos pode apresentar um risco à efetividade da vacina, bem como justificar, no futuro, a introdução de vacinas conjugadas com a adição de outros sorotipos.

3 HIPÓTESES

3.4 A introdução da vacina anti-Hib em 1999 na cidade de Salvador, Bahia promoveu uma significativa redução na incidência da meningite pelo *Haemophilus influenzae* sorotipo “b”;

3.5 Com a redução do número de casos de meningite pelo sorotipo “b”, ocorre aumento no número de casos de meningite por sorotipos não “b”, principalmente pelo sorotipo “a”;

3.6 A caracterização molecular de isolados de *Haemophilus influenzae* do sorotipo não “b”, incluindo o sorotipo “a” permite uma visualização do perfil molecular de cepas virulentas;

3.7 A deleção parcial *IS1016-bexA*, identificada como um fator de virulência dos isolados do sorotipo “a”, está associada com mortalidade elevada.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Descrever a meningite por *Haemophilus influenzae* em Salvador e caracterizar molecularmente os isolados clínicos do sorotipo não “b”, antes e após implementação da vacina anti-Hib.

4.2 ESPECÍFICOS

1. Descrever a meningite por *Haemophilus influenzae* em Salvador em onze anos de vigilância no Hospital Couto Maia;
2. Estimar o impacto da vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* sorotipo “b”, oito anos após sua implementação na cidade de Salvador;
3. Caracterizar através da biologia molecular os isolados de *Haemophilus influenzae* sorotipo não “b”, identificados durante vigilância.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 01

Haemophilus influenzae meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil.

Guilherme S. Ribeiro, Josilene B. T. Lima, Joice N. Reis, Edilane L. Gouveia, Soraia M. Cordeiro, Tatiana S. Lobo, Ricardo M. Pinheiro, Cássio T. Ribeiro, Alan B. Neves, Kátia Salgado, Hagamenon R. Silva, Mitermayer G. Reis, Albert I. Ko.

Objetivos do artigo:

1. Descrever a meningite por *Haemophilus influenzae* em Salvador em onze anos de vigilância no Hospital Couto Maia;
2. Estimar o impacto da vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* sorotipo “b”, oito anos após sua implementação na cidade de Salvador;

5.2 ARTIGO 02

Non-type b *Haemophilus influenzae* meningitis in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era.

Josilene B. T. Lima, Guilherme S. Ribeiro, Soraia M. Cordeiro, Edilane L. Gouveia, Kátia Salgado, Mitermayer G. Reis, Alberto I. Ko, Joice N. Reis.

Objetivo do artigo:

1. Caracterizar através da biologia molecular os isolados de *Haemophilus influenzae* sorotipo não “b”, identificados durante vigilância.

**NON-TYPE B *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* MENINGITIS IN THE *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE TYPE B VACCINE ERA**

Running Title: Molecular Characterization of invasive non-type b *Haemophilus*
influenzae

Josilene B. T. Lima^{1,5}; Guilherme S. Ribeiro¹; Soraia M. Cordeiro¹; Edilane L.
Gouveia¹; Kátia Salgado³; Mitermayer G. Reis¹; Albert I. Ko^{1,4} and Joice N. Reis^{1,2*}.

¹Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of
Health, Salvador, Brazil;

²School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

³Hospital Couto Maia, Secretary of Health for the State of Bahia, Salvador, Brazil;

⁴Division of International Medicine and Infectious Diseases, Department of Medicine,
Weill Medical College of Cornell University, New York, USA

⁵PPGIm, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

Reprints or correspondence: Joice Neves Reis, Ph.D; Centro de Pesquisas Gonçalo
Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde; Rua Waldemar Falcão, 121;
Salvador, Bahia 40296-710; Brasil; Tel. (55 71) 3176-2301; Fax: (55 71) 3176-2281;
e-mail: joice@ufba.br

ABSTRACT

Routine immunization of infants with *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccines has decreased substantially the incidence of invasive Hib diseases in the pediatrics population, but emergence of non-type b *H. influenzae* capsulate and non-capsulate strains may emerge as important cause of invasive diseases. A prospective active hospital-based surveillance study of *H. influenzae* meningitis was performed from March 1996 to September 2006. 40 non-type b *H. influenzae* meningitis cases were characterized, being eight cases identified before and 32 cases identified after Hib vaccine was introduced in the Brazilian routine immunization program. Clinical information on cases was collected by medical chart review and isolates were typed by PFGE. During the period of the study, we found a considerable number of *Haemophilus influenzae* type a isolates causing invasive diseases whose molecular characterization by PFGE established that they are clonal, and were clustered into only two different patterns, cluster A (8 isolates) and cluster B (19 isolates). The isolates belonging to the cluster A presents the *IS1016-bexA* positive partial deletion, are associated with high mortality ($p=0.06$), and sequencing of the deletion site identified that this partial deletion is very close of that of Hib isolates. These results suggest that continue surveillance in this population is required to prevent new burden of invasive *H. influenzae* diseases, and also to establish the need for the beginning of a new vaccination approach.

KEY WORDS

Haemophilus influenzae, non-type b *H. influenzae*, meningitis, Hib conjugate vaccine, Brazil.

INTRODUCTION

Introduction of polysaccharide conjugate vaccines against *Haemophilus influenzae* type b (Hib) was a major public health advance for the pediatric population. The burden of Hib invasive diseases declined more than 90% in countries that introduced Hib conjugate vaccines in their immunization program (ADEGBOLA *et al.*, 2005; FARHOUDI *et al.*, 2005). This large impact is due to the high efficacy of the vaccine, as well as the herd-immunity phenomenon, which decreased Hib carriage among vaccinated children therefore reducing transmission and invasive disease among unimmunized children (HVIID e MELBYE, 2004).

However, reports of invasive infections due to non-type b *H. influenzae* have increased in the post vaccine era (CAMPOS *et al.*, 2003; CERQUETTI *et al.*, 2003). Although complete comprehension for this emergence remains not clear, some hypothesis have been raised: 1- improvement in the surveillance systems for identification of strains isolated from invasive diseases in the vaccine era, and problems with slide agglutination mistyping made the use of molecular typing techniques necessary, what may had improved the identification of non-type b strains (LACLAIRE *et al.*, 2003); 2- occurrence of serotype replacement, in which reduction in *H. influenzae* type b circulation and colonization opens ecological niches to emergence for non-type b *H. influenzae* (RIBEIRO *et al.*, 2003); 3- occurrence of outbreaks of non-type b *H. influenzae*, and circulation of these strains with increased virulence factors (HAMMITT *et al.*, 2005) (KAPOGIANNIS *et al.*, 2005).

In Salvador, Brazil active surveillance for *H. influenzae* meningitis was established in March 1996 and provided reports of Hib vaccine effectiveness in Brazil and the long-term impact of Hib campaign (RIBEIRO *et al.*, 2003). We had the opportunity to apply

molecular techniques to characterize the non-type b *H. influenzae* strains isolated from patients with meningitis during surveillance, according with the time of isolation, i.e., before and after the widespread of Hib vaccine in Brazil.

METHODS

Clinical study

Patients were identified at the state infectious disease hospital where according to the state health secretary procedures, all suspected cases of meningitis for the region are referred to diagnostic procedures, including routine lombar puncture and cerebrospinal fluid examination. From March, 1996 to September, 2006 continuous active hospital-based surveillance for *Haemophilus influenzae* meningitis was conducted at the state infectious diseases hospital in Salvador, Brazil. A case was included if *H. influenzae* had been isolated from cerebrospinal fluid (CSF) or blood culture. Patients were enrolled in the study according to informed consent procedures approved by the Institutional Review Boards of the Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health and the New-York-Presbyterian Hospital.

Bacterial strains, serotyping and PCR-based capsular typing

H. influenzae was identified based on Gram stain morphology and growth requirement for hemin and nicotinamide adenine dinucleotide. The slide agglutination method was used to determine serotype with a complete panel of type a to f specific antisera (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA). A semi-nested polymerase chain reaction (PCR) method that amplifies serotype specific capsule genes, was used to confirm the serotype status results (FALLA *et al.*, 1994).

Molecular characterization

All clinical isolates were examined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after digestion of bacterial DNA with *Sma I* (New England Biolabs) as described previously (CURRAN *et al.*, 1994; SAITO *et al.*, 1999). The restriction fragments were separated on a 1% agarose gel (Bio-Rad Laboratories, California, US) in 0,5x tris-borate-EDTA buffer (45mM Tris, 45mM boric acid, 1.0 mM EDTA, pH 8.0) with a CHEF-DR II apparatus (Bio-Rad Laboratories, California, US). The initial pulse time of 1 s was increased linearly to 26 s over 21h at 14°C at 6.0 V/cm. Gels were then stained with ethidium bromide and the images were captured under UV light with the Bio-Rad Gel DOC 2000 System (Bio-Rad Laboratories, California, US). The fingerprintings generated were analyzed with GelCompar II software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A 1.5% band position tolerance was selected for using during comparisons. Cluster analysis was performed by the unweighted-pair-group (UPGMA) method and interpretation of relatedness of isolates was performed according to the Tenover criteria (TENOVER *et al.*, 1995).

Identification of the *IS1016-bexA* partial deletion and sequencing

All 40 *Haemophilus influenzae* non-type b isolates and a random sampling of 16 type b were evaluated by PCR for identification of partial deletion of *bexA* copies, using the *IS1016* and *bexA* primers as previously described (KROLL *et al.*, 1994). We sequenced the amplified fragments obtained by the PCR of two *H. influenzae* type a isolates, two type b isolates and one type b reference strain from the American Typing Culture Collection (ATCC 33533). The sequences were compared to two published sequences on the NCBI genebank of the serotype b *H. influenzae* strains - AF549213 (SATOLA *et al.*, 2003), and S62752 (KROLL *et al.*, 1993).

Multilocus sequence typing (MLST).

Chromosomal DNA were extracted using a Qiagen genomic Kit (Qiagen Inc., California, US), and approximately 450-bp internal fragments of 7 housekeeping genes (*adk*, *atpG*, *frdB*, *fuck*, *mdh*, *pgi*, and *recA*) were amplified by PCR using primers and following methods previously described (MEATS *et al.*, 2003). Sequences were submitted to the MLST website (www.mlst.net) for allele and sequence type (ST) assignment.

Statistical analysis

Epi-Info Version 3.3.2 software system (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, US) was used to create a database of epidemiological, microbiological and genotyping information. Fisher's exact test was used to compare proportions and two-tailed *p* value of 0.05 was used to define statistical significance.

RESULTS

Clinical information and bacterial strains

Hospital based active surveillance identified 40 cases of meningitis due to *H. influenzae* non-type b at the state infectious diseases hospital in Salvador, from March 9, 1996 to September 30, 2006. During the period before introduction of Hib vaccine at the national immunization program in Brazil, between March 1996 and August 1999, the surveillance identified eight cases of meningitis due to non-type b *H. influenzae*: 5 type a, 1 type f, and 2 non-capsulated. After vaccine implementation, 32 cases due to non-type b *H. influenzae* were identified, being 22 type a, 3 type e, 2 type f and 5 non-capsulated.

The 40 non-type b *H. influenzae* meningitis were more frequent in children younger than 5 years old (28 cases), being 15/28 (53.6%) patients \leq 1 year old. *H. influenzae* type a responded for 5 and 19 cases of children before and after introduction of Hib vaccine respectively, while Hie and non-capsulated responded for 2 cases after vaccine each. Four patients with meningitis due to *H. influenzae* type a died, three of them were younger than 3 years of age.

Information on vaccine status prior to hospitalization was available for 14 (58.3%) of the 24 patients with meningitis due to non-type b *H. influenzae*, who were targeted to Hib immunization. Of them, 10 (71.4%) patients had received two or more Hib vaccine doses. (Table 1).

One patient, aging 5 months, who have made use of two doses of the Hib conjugate vaccine, had a recurrent episode of meningitis due to *H. influenzae* type a. The first diagnosis was made on September 2005. After 15 days of treatment, the patient had improved and was discharged. The patient stayed apparently well until December 2005, when he came back to the hospital and received a new diagnosis of *H. influenzae* type a meningitis. Despite appropriate treatment, the patient died 2 days after hospitalization. As the isolates from the two episodes had identical PFGE patterns, we only counted as a case the first episode of meningitis.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Thirteen distinct PFGE patterns were identified among the 40 isolates (Table 1; Fig. 1). The *Haemophilus influenzae* type a strains were clustered into two different patterns, cluster A (8 isolates) and cluster B (19 isolates), both were responsible to cause meningitis in the period pre and post vaccine introduction. The *H. influenzae* type e strains, were clustered in two patterns, G (1 isolate) and H (2 isolates); the

isolates type f, were clustered in two patterns, C (2 isolates) and I (1 isolate), and the non-capsulated strains had all unrelated patterns (D, E, F, J, K, L and M) (Figure 1).

***IS1016-bexA* partial deletion and sequencing**

The 339bp *IS1016-bexA* partial deletion product was present in 8 of 27 *H. influenzae* type a isolates, all belonging to the cluster A, as defined by PFGE. From those 8 patients with isolates possessed the *bexA* partial deletion, 3 of them died. On the other hand, from the 19 patients with *bexA* negative isolates (belonging to the cluster B), only one died ($p=0.06$), so we can note that patients with meningitis due to *H. influenzae* type a that were *bexA* positive had a greater chance of die than those with meningitis due to type a *bexA* negative (37.5% versus 5.3%, respectively; odd's ratio [OR], 10.8; 95% confidence interval [CI], 0.7 - 345). The two *H. influenzae* type a strains had identical *IS1016-bexA* region sequences. However, the nucleotide sequence contained 1-bp of difference for the whole *IS1016-bexA* partial deletion site from the *H. influenzae* type b sequence (Figure 2). We also searched the *IS1016-bexA* partial deletion site in other capsulated and non-capsulated types (3 type e, 3 type f and 7 non-capsulated), but they were all negatives.

MLST

Multilocus sequence typing of two *H. influenzae* type a isolates was performed and sequences were compared with the MLST database (<http://www.mlst.net>). One of the isolates, positive for the *IS1016-bexA* partial deletion (cluster A from PFGE) was found to have the same sequence typing of the ST4 strain, a *H. influenzae* type a isolate, which had been isolated during an outbreak in Gambia in 1994 (KROLL *et al.*, 1994) (Figure 3); and was the first strain identified as having this virulence factor.

The other one was *bexA* negative (cluster B from PFGE), and has the ST23, the same sequence typing of a *H. influenzae* type a strain isolated in Malaysia in 1973 (MUSSEY *et al.*, 1990) (MEATS *et al.*, 2003).

DISCUSSION

Invasive diseases due to *Haemophilus influenzae* type b has declined dramatically since the licensure of Hib conjugate vaccine (ADEGBOLA *et al.*, 2005), therefore the emergence of non-type b invasive disease has been documented (CERQUETTI *et al.*, 2003), although those reports lacked epidemiological information (JIN *et al.*, 2007). In Brazil, Hib conjugate vaccine was introduced as part of the routine infant immunization program in August 1999. We have described 40 cases of meningitis due to non-type b *Haemophilus influenzae* during the period of the study, being 8 cases before vaccine implementation and 32 after vaccine period. *H. influenzae* type a, was the most frequent non-type b isolate causing invasive disease in Salvador, Brazil.

Since we found an important number of non-type b *H. influenzae* strains causing invasive disease after vaccine implementation, we decided to investigate the genetic diversity of our isolates, and used PFGE (SAITO *et al.*, 1999). Cluster analysis results demonstrated that the type a *H. influenzae* strains are clonal; in contrast with non-capsulated strains that are highly diverse (7 strains classified in seven different PFGE patterns). Other studies had previously documented that non-capsulated *H. influenzae* strains are much more heterogeneous than capsulated isolates, and show lack of clonality (PORRAS *et al.*, 1986).

Moreover, the PFGE technique identified that the same *H. influenzae* type a clones (A and B) are circulating before and after vaccination (RIBEIRO *et al.*, 2003). Besides, one of these clones which is the cluster A presents the *IS1016-bexA* positive partial deletion and is associated with high mortality ($p=0.06$). Although not statistically significant, it is important to consider that there are only 8 cases with this partial deletion. *IS1016-bexA* partial deletion was first identified in *H. influenzae* type b isolates as a putative virulence factor (KROLL *et al.*, 1993); this deletion promotes gene amplification, resulting in an increase in capsule production and contributes to the virulence of *bexA* positive strains. During an outbreak in Gambia in 1994, Kroll *et al.* (KROLL *et al.*, 1994) identified the same mechanism in serotype a isolates, and other authors had also described this deletion in type a isolates (KAPOGIANNIS *et al.*, 2005). Furthermore, considering that *bexA* deletion was previously identified in serotype a isolates and associated with virulence (KAPOGIANNIS *et al.*, 2005), to our knowledge there is not a study showing the association with higher mortality. When we analyzed sequencing from the *IS1016-bexA* partial deletion site, we found that the *bexA* partial deletion site from two *H. influenzae* type a isolates identified during surveillance is the same that one strain serotype b, isolated at the same hospital, except for one nucleotide, suggesting that the acquisition of the *IS1016-bexA* partial deletion by those type a isolates from the study could have arisen from recombination events between type a and type b strains (KROLL *et al.*, 1994). MLST identified that the *H. influenzae* serotype a isolate, that is positive for *bexA* partial deletion, is of the same sequence typing of the isolate from Gambia, where *bexA* deletion in type a isolates were first identified.

One possible explanation for the emergency of non-type b isolates is the improved surveillance, but this is unlikely because the system was implanted since 1996 for meningitis due to *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*, on a standard basis. To manage the problems with the accuracy of serotyping results (LACLAIRE *et al.*, 2003), we performed a semi-nested PCR to the detection of specific capsular types of *H. influenzae* on all non-type b isolates. Thinking of occurrence of outbreaks, (ADDERSON *et al.*, 2001), we could not find an epidemiological link between type a isolates, and PFGE showed that there was no introduction of a different type a clone after vaccination. Another consideration for the occurrence of invasive diseases due to non-type b isolates is the presence of new virulent factors, like Shen *et al.* (SHEN *et al.*, 2005) recently identified novel genes in clinical isolates of invasive nontypeable (or non-capsulated) *H. influenzae*, and those genes were not present at the Rd KW20 genome, a laboratory strain with reduced virulence (FLEISCHMANN *et al.*, 1995). But in this present study, we did not investigate for new virulent factors other than *IS1016-bexA* partial deletion.

We worry about the importance of a significant number of *Haemophilus influenzae* type a isolates causing invasive diseases such as meningitis, in the era of widespread use of conjugated Hib vaccine. Mainly about the fact that through PFGE analysis, we identified a group of strains that is associated with a well documented virulence factor, the *IS1016-bexA* partial deletion, and that the same group of strains (cluster A) is related with high mortality. Because of the importance of these factors, we believe that keep surveillance of *Haemophilus influenzae* invasive diseases is necessary to monitor the effectiveness of Hib vaccine and establish the need for the

beginning of a new vaccination approach, like implementation of type a conjugate vaccine in childhood immunization.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank overall the study patients and their families; the clinical, laboratory and administrative staff of Hospital Couto Maia, especially Ana Maria Maia and Neide Oliveira Silva; Ricardo Martinez and Tatiana Lobo for their participation in data collection and processing; Neci Ivo Ramos, Nilda Lúcia Nunes Ivo, Maria Auxiliadora Macedo de Lima Machado and Helena Macedo in providing information on Hib immunization program and meningitis case notifications; Brian Spratt for MLST performance.

REFERENCES

1. **CDC.** 2002. Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children--United States, 1998-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **51**:234-7.
2. **Adderson, E. E., C. L. Byington, L. Spencer, A. Kimball, M. Hindiye, K. Carroll, S. Mottice, E. K. Korgenski, J. C. Christenson, and A. T. Pavia.** 2001. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics* **108**:E18.
3. **Adegbola, R. A., O. Secka, G. Lahai, N. Lloyd-Evans, A. Njie, S. Usen, C. Oluwalana, S. Obaro, M. Weber, T. Corrah, K. Mulholland, K. McAdam, B. Greenwood, and P. J. Milligan.** 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**:144-50.
4. **Campos, J., F. Roman, M. Perez-Vazquez, J. Oteo, B. Aracil, and E. Cercenado.** 2003. Infections due to *Haemophilus influenzae* serotype E: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Infect Dis* **37**:841-5.
5. **Cerquetti, M., M. L. Ciofi degli Atti, R. Cardines, S. Salmaso, G. Renna, and P. Mastrantonio.** 2003. Invasive type e *Haemophilus influenzae* disease in Italy. *Emerg Infect Dis* **9**:258-61.
6. **Curran, R., K. R. Hardie, and K. J. Towner.** 1994. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of insertion mutations in the transferrin-binding system of *Haemophilus influenzae* type b. *J Med Microbiol* **41**:120-6.

7. **Dagan, R., D. Fraser, M. Roitman, P. Slater, E. Anis, S. Ashkenazi, I. Kassis, D. Miron, and A. Leventhal.** 1999. Effectiveness of a nationwide infant immunization program against *Haemophilus influenzae* b. The Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. *Vaccine* **17**:134-41.
8. **Falla, T. J., D. W. Crook, L. N. Brophy, D. Maskell, J. S. Kroll, and E. R. Moxon.** 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* **32**:2382-6.
9. **Farhoudi, D., M. Lofdahl, and J. Giesecke.** 2005. Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in Sweden 1997-2003: epidemiological trends and patterns in the post-vaccine era. *Scand J Infect Dis* **37**:717-22.
10. **Fickweiler, K., M. Borte, M. Fasshauer, F. B. Spencker, W. Handrick, and A. C. Rodloff.** 2004. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type f in an 8-year-old girl with congenital humoral immunodeficiency. *Infection* **32**:112-5.
11. **Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, and et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.
12. **Hammit, L. L., S. Block, T. W. Hennessy, C. Debye, H. Peters, A. Parkinson, R. Singleton, and J. C. Butler.** 2005. Outbreak of invasive *Haemophilus influenzae* serotype a disease. *Pediatr Infect Dis J* **24**:453-6.
13. **Hviid, A., and M. Melbye.** 2004. Impact of routine vaccination with a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Vaccine* **22**:378-82.
14. **Jin, Z., S. Romero-Steiner, G. M. Carlone, J. B. Robbins, and R. Schneerson.** 2007. *Haemophilus influenzae* type a infection and its prevention. *Infect Immun* **75**:2650-4.

15. **Kapogiannis, B. G., S. Satola, H. L. Keyserling, and M. M. Farley.** 2005. Invasive infections with *Haemophilus influenzae* serotype a containing an IS1016-bexA partial deletion: possible association with virulence. Clin Infect Dis **41**:e97-103.
16. **Kroll, J. S., E. R. Moxon, and B. M. Loynds.** 1993. An ancestral mutation enhancing the fitness and increasing the virulence of *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis **168**:172-6.
17. **Kroll, J. S., E. R. Moxon, and B. M. Loynds.** 1994. Natural genetic transfer of a putative virulence-enhancing mutation to *Haemophilus influenzae* type a. J Infect Dis **169**:676-9.
18. **LaClaire, L. L., M. L. Tondella, D. S. Beall, C. A. Noble, P. L. Raghunathan, N. E. Rosenstein, and T. Popovic.** 2003. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. J Clin Microbiol **41**:393-6.
19. **Meats, E., E. J. Feil, S. Stringer, A. J. Cody, R. Goldstein, J. S. Kroll, T. Popovic, and B. G. Spratt.** 2003. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol **41**:1623-36.
20. **Millar, E. V., K. L. O'Brien, J. P. Watt, J. Lingappa, R. Pallipamu, N. Rosenstein, D. Hu, R. Reid, and M. Santosham.** 2005. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type A disease among Navajo and White Mountain Apache children, 1988-2003. Clin Infect Dis **40**:823-30.
21. **Musser, J. M., J. S. Kroll, D. M. Granoff, E. R. Moxon, B. R. Brodeur, J. Campos, H. Dabernat, W. Frederiksen, J. Hamel, G. Hammond, and et al.**

1990. Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* **12**:75-111.
22. **Ogilvie, C., A. Omikunle, Y. Wang, I. J. St Geme, 3rd, C. A. Rodriguez, and E. E. Adderson.** 2001. Capsulation loci of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* **184**:144-9.
23. **Omikunle, A., S. Takahashi, C. L. Ogilvie, Y. Wang, C. A. Rodriguez, J. W. St Geme, 3rd, and E. E. Adderson.** 2002. Limited genetic diversity of recent invasive isolates of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* **40**:1264-70.
24. **Peltola, H., P. Aavitsland, K. G. Hansen, K. E. Jonsdottir, H. Nokleby, and V. Romanus.** 1999. Perspective: a five-country analysis of the impact of four different *Haemophilus influenzae* type b conjugates and vaccination strategies in Scandinavia. *J Infect Dis* **179**:223-9.
25. **Porras, O., D. A. Caugant, B. Gray, T. Lagergard, B. R. Levin, and C. Svanborg-Eden.** 1986. Difference in structure between type b and nontypable *Haemophilus influenzae* populations. *Infect Immun* **53**:79-89.
26. **Ribeiro, G. S., J. B. Lima, J. N. Reis, E. L. Gouveia, S. M. Cordeiro, T. S. Lobo, R. M. Pinheiro, C. T. Ribeiro, A. B. Neves, K. Salgado, H. R. Silva, M. G. Reis, and A. I. Ko.** 2007. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine* **25**:4420-8.
27. **Ribeiro, G. S., J. N. Reis, S. M. Cordeiro, J. B. Lima, E. L. Gouveia, M. Petersen, K. Salgado, H. R. Silva, R. C. Zanella, S. C. Almeida, M. C. Brandileone, M. G. Reis, and A. I. Ko.** 2003. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement

- with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. *J Infect Dis* **187**:109-16.
28. **Saito, M., A. Umeda, and S. Yoshida.** 1999. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **37**:2142-7.
29. **Satola, S. W., P. L. Schirmer, and M. M. Farley.** 2003. Complete sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. *Infect Immun* **71**:3639-44.
30. **Shen, K., P. Antalis, J. Gladitz, S. Sayeed, A. Ahmed, S. Yu, J. Hayes, S. Johnson, B. Dice, R. Dopico, R. Keefe, B. Janto, W. Chong, J. Goodwin, R. M. Wadowsky, G. Erdos, J. C. Post, G. D. Ehrlich, and F. Z. Hu.** 2005. Identification, distribution, and expression of novel genes in 10 clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **73**:3479-91.
31. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, 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**:2233-9.
32. **Tsang, R. S., S. Mubareka, M. L. Sill, J. Wylie, S. Skinner, and D. K. Law.** 2006. Invasive *Haemophilus influenzae* in Manitoba, Canada, in the postvaccination era. *J Clin Microbiol* **44**:1530-5.
33. **Urwin, G., J. A. Krohn, K. Deaver-Robinson, J. D. Wenger, and M. M. Farley.** 1996. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. The *Haemophilus influenzae* Study Group. *Clin Infect Dis* **22**:1069-76.

34. **van Alphen, L., D. A. Caugant, B. Duim, M. O'Rourke, and L. D. Bowler.**
1997. Differences in genetic diversity of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* from various diseases. *Microbiology* **143 (Pt 4)**:1423-31.

TABLE 1: Characteristics of 40 patients with non-type b *Haemophilus influenzae* meningitis and of their isolates identified during surveillance in Salvador, Brazil.

Patient	Month/year of hospitalization	Age	No. of vaccine dose	Outcome (days of hospitalization)	Isolate serotype	PFGE pattern	Presence of BexA deletion
H08	04/1996	21yr	NA	ND	f	C1	No
H40	07/1996	4yr	NA	Discharged (21)	a	B1	No
H92	11/1996	3yr	NA	Discharged (12)	a	B1	No
H196	09/1997	19yr	NA	Discharged (12)	NC	D1	No
H235	12/1997	9mo	NA	Death (2)	a	A2	Yes
H342	09/1998	2yr	NA	Discharged (17)	a	B1	No
H407	03/1999	53yr	NA	Discharged (18)	NC	E1	No
H417	04/1999	4mo	NA	Death (3)	a	A1	Yes
H472	09/1999	3yr	NA	Discharged (16)	a	B2	No
H473	09/1999	5mo	ND	Discharged (40)	a	B2	No
H481	10/1999	15yr	NA	Discharged (13)	a	A1	Yes
H493	12/1999	18mo	2	Discharged (12)	a	A1	Yes
H499	04/2000	5mo	2	Discharged (31)	a	B1	No
H507	06/2000	12mo	3	Discharged (16)	a	B2	No
H512	07/2000	9yr	NA	Death (1)	a	B2	No
H515	07/2000	8mo	3	Discharged (12)	a	B1	No
H532	01/2001	2yr	ND	Death (3)	a	A1	Yes
H543	05/2001	3mo	0	Discharged (16)	a	B1	No
H555	08/2001	2yr	3	Discharged (29)	a	B3	No
H563	03/2002	12yr	NA	Discharged (63)	NC	M1	No
H568	04/2002	8mo	3	Discharged (13)	a	B4	No
H571	05/2002	8mo	3	Discharged (15)	NC	F1	No
H581	08/2002	14yr	NA	Discharged (14)	e	G1	No
H585	08/2002	2yr	ND	Discharged (24)	a	B3	No

H587	09/2002	5mo	1	Discharged (17)	e	H1	No
H604	11/2003	2yr	3	Discharged (1)	a	B6	No
H607	01/2004	21mo	ND	Discharged (21)	a	A1	Yes
H612	06/2004	6mo	ND	Discharged (12)	e	H2	No
H614	10/2004	2yr	ND	Discharged (14)	a	A3	Yes
H617	03/2004	5yr	ND	Discharged (21)	f	I1	No
H618	04/2005	35yr	NA	Discharged (8)	NC	J1	No
H620	06/2005	3yr	1	Discharged (8)	NC	K1	No
H621	09/2005	5mo	2	Discharged (15)	a	B5	No
H623	12/2005	6yr	3	Discharged (20)	a	B5	No
H626	04/2006	1yr	1	Discharged (32)	a	B3	No
H627	05/2006	25yr	NA	Discharged (11)	f	C2	No
H628	06/2006	6mo	ND	Discharged (12)	a	A1	Yes
H629	09/2006	50yr	NA	Discharged (11)	NC	L1	No
H630	07/2006	6mo	ND	Discharged (12)	a	B3	No
H631	09/2006	2yr	ND	Discharged (12)	a	B3	No

Notes: Hib, *Haemophilus influenzae* type b; NC, *Haemophilus influenzae* non-capsulated; ND, not-determined; NA, not-applicable.

Hib vaccination was implemented in Brazil on August 1999.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Dendrogram illustrating the genetic relationships of 40 strains of *H. influenzae*, as determined by pulsed-field gel electrophoresis. From left to right are the strains code numbers, serotypes, period of isolation, presence of *bexA* deletion, and the PFGE pattern.

Note: NC, *Haemophilus influenzae* non-capsulated.

FIGURE 2: Nucleotide sequence of *IS1016-bexA* deletion site of *H. influenzae* type b and *H. influenzae* type a isolated from meningitis cases in Salvador, Brazil.

Note: The nucleotide base sites are numbered above in vertical format. Nucleotide base sites were not shown when they were equal to all strains. A dot means the same nucleotide as the one for majority, a trace means deletion of the nucleotide base. ATCC 33533 is a type b reference strain. Hib 503, Hib 492, Hia 235 and Hia 493 were isolated during surveillance in Salvador, Brazil. AF549213 and S62752 are *H. influenzae* type b strains from Gen Bank.

FIGURE 3: Multilocus sequence typing of two different PFGE patterns of *H. influenzae* type a strains from surveillance.

Note: MLST confirmed that the 2 Hia strains classified as two different patterns in PFGE are of different sequence typing. The Hia strain from the cluster A possesses the *IS1016-bexA* partial deletion site.

Figure 1

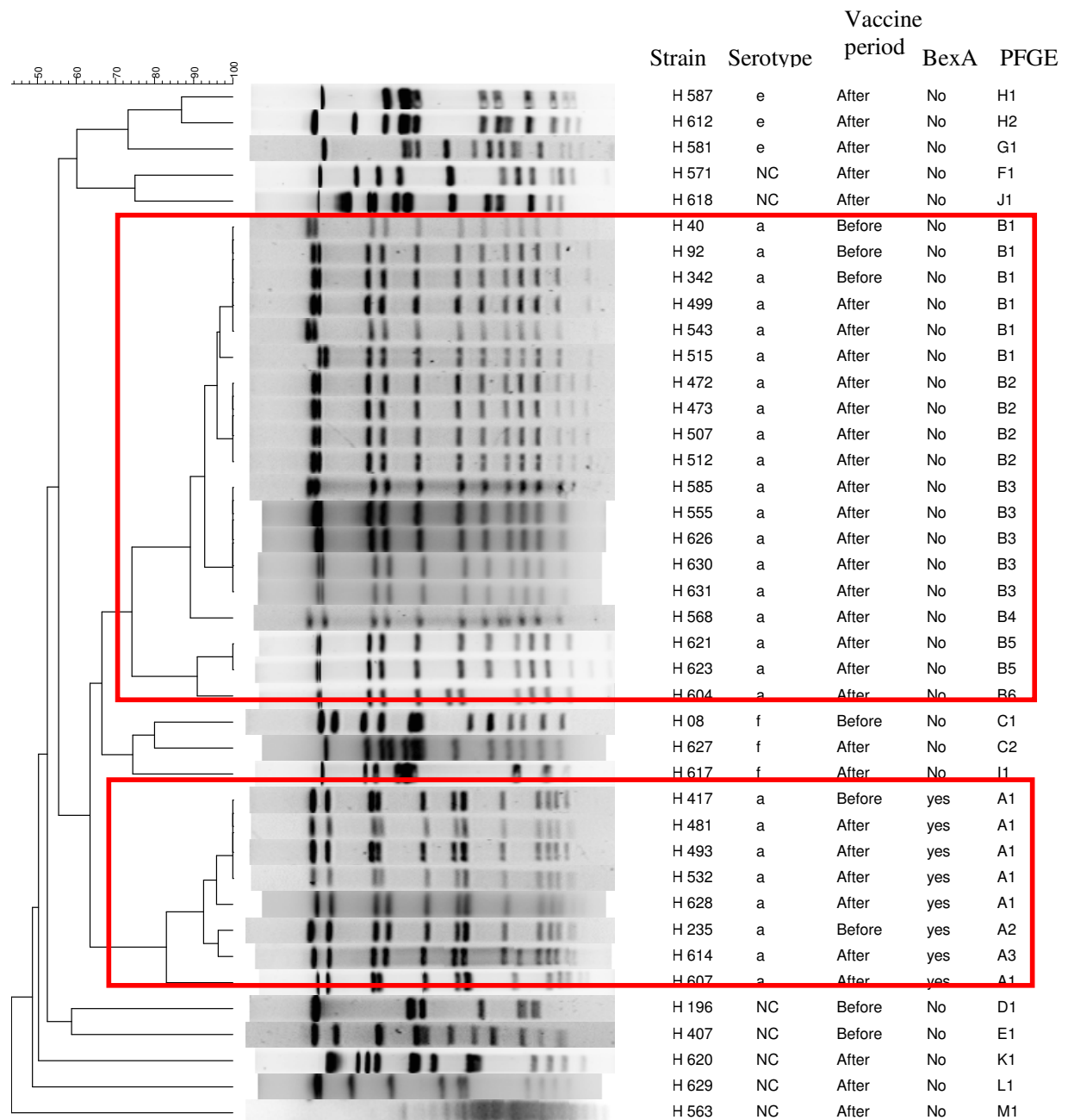
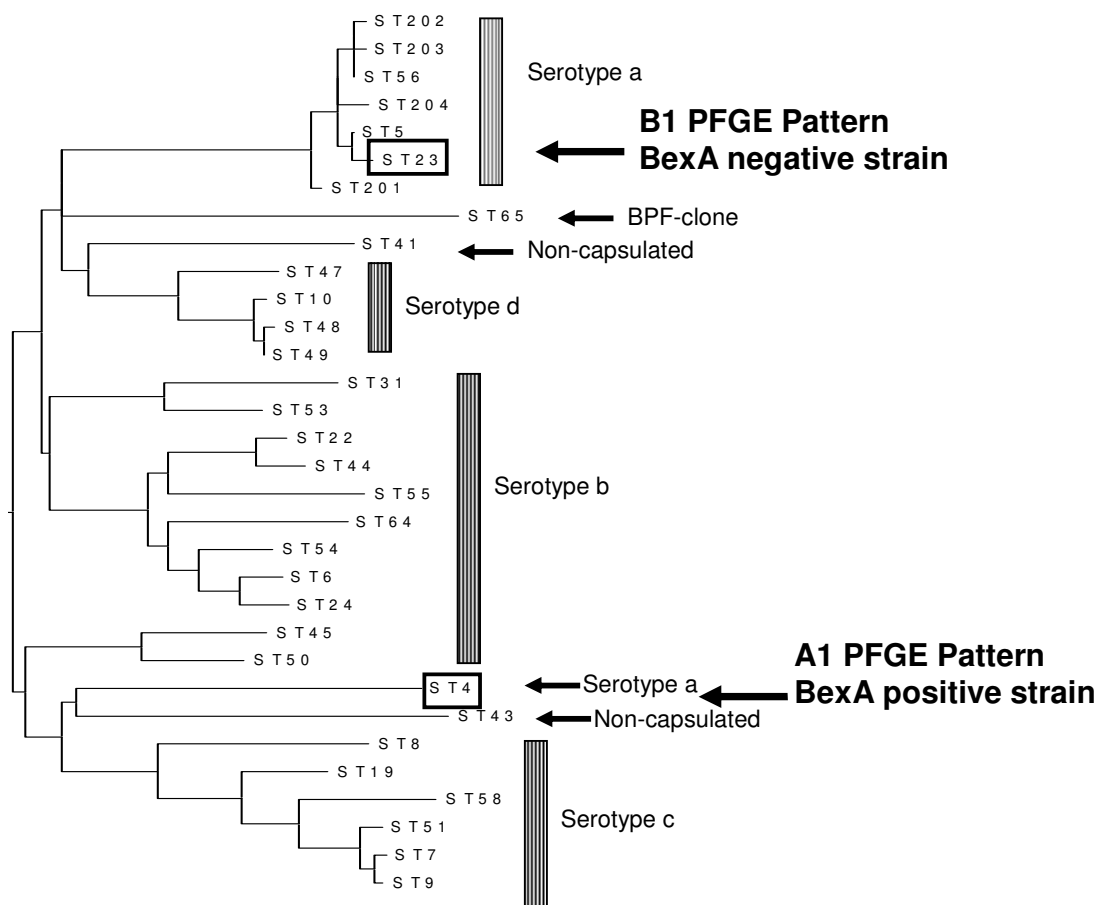


Figure 3



5.3 ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA VIGILÂNCIA

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DA MENINGITE POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EM SALVADOR, EM ONZE ANOS DE VIGILÂNCIA ATIVA POPULACIONAL.

O sistema de Vigilância Hospitalar para as meningites bacterianas foi implementado no Hospital Couto Maia, hospital estadual de referência para doenças infecciosas na Bahia, em 1996 e continua até o momento. Nos dois primeiros objetivos do estudo, propusemos descrever a meningite por *Haemophilus influenzae* em Salvador, e estimar o impacto da vacina conjugada contra o *H. influenzae* sorotipo “b”. O artigo 01 descreve oito anos de vigilância, avaliando a meningite 3 anos antes e 5 anos após a vacina anti-Hib, completando as análises no ano de 2004.

Para complementar o estudo até o ano de 2007, foi realizada a atualização dos dados da vigilância, descrevendo as características clínicas e epidemiológicas da meningite pelo *H. influenzae* no período compreendido entre agosto de 1996 a julho de 2007 (3 anos antes e 8 anos após o início das campanhas de vacinação contra o Hib). Em 11 anos de estudo, foram identificados 546 casos de meningite por *Haemophilus influenzae*, dos quais, 507 (93%) isolados tiveram o sorotipo determinado. A distribuição de sorotipos segue na tabela abaixo:

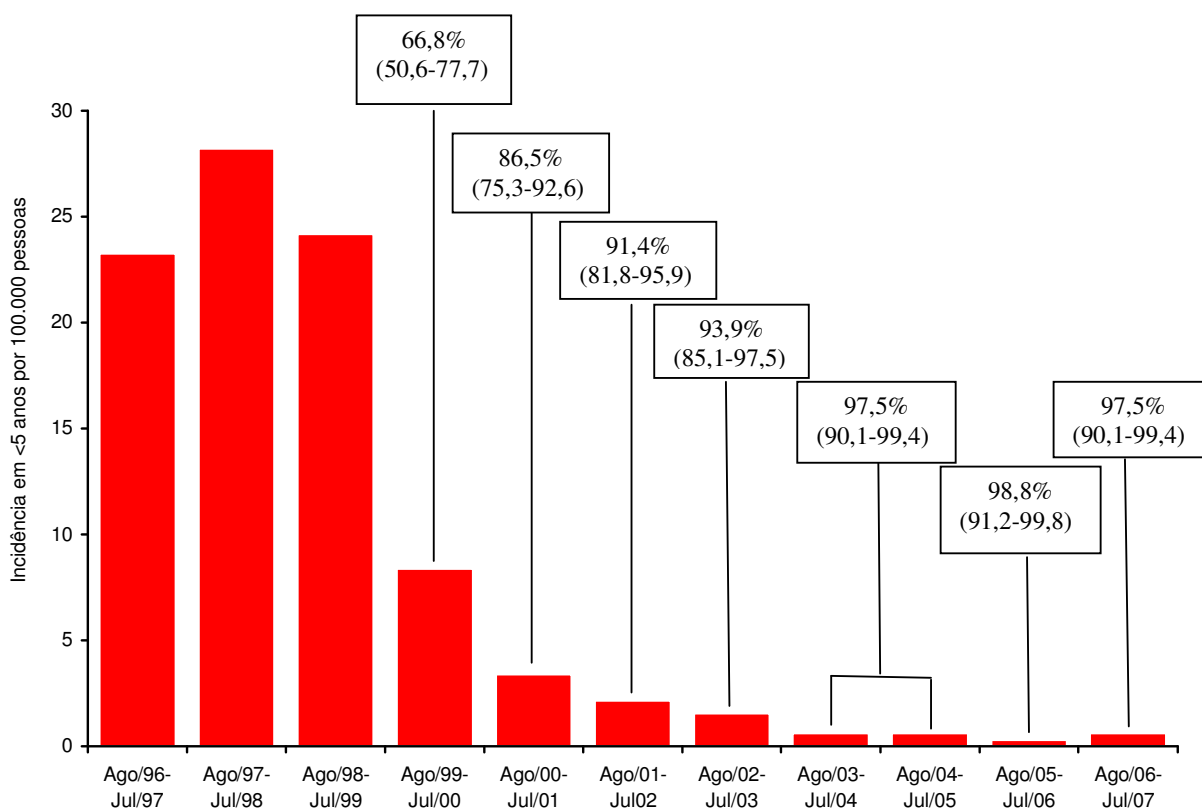
Tabela 2: Distribuição dos sorotipos de 507 casos de meningite por *Haemophilus influenzae* identificados no Hospital Couto Maia no período de agosto de 1996 a julho de 2007.

Sorotipo	Número de isolados	%
Tipo b	468	92,3
Tipo a	26	5,1
Tipo e	3	0,6
Tipo f	3	0,6
Não capsulado	7	1,4

A distribuição mensal dos casos de meningite identificados durante a vigilância, e estratificados por sorotipos, permite a visualização da queda no número de casos da meningite pelo sorotipo “b” após implementação da vacina, e a concentração de isolados do sorotipo “a” no primeiro ano após imunização. Nos anos seguintes, é possível observar que o número de casos pelo sorotipo “b” continua diminuindo, e os casos pelo sorotipo “a”, bem como por outros sorotipos continua ocorrendo; chegando até a ultrapassar o número de isolados do sorotipo “b”, no ano de 2006. Porém, a ocorrência de isolados de *Haemophilus influenzae* seja pelo sorotipo “b”, ou por sorotipo não “b”, ainda é bem menor do que se podia observar antes da implementação da vacina anti-Hib (figura 3).

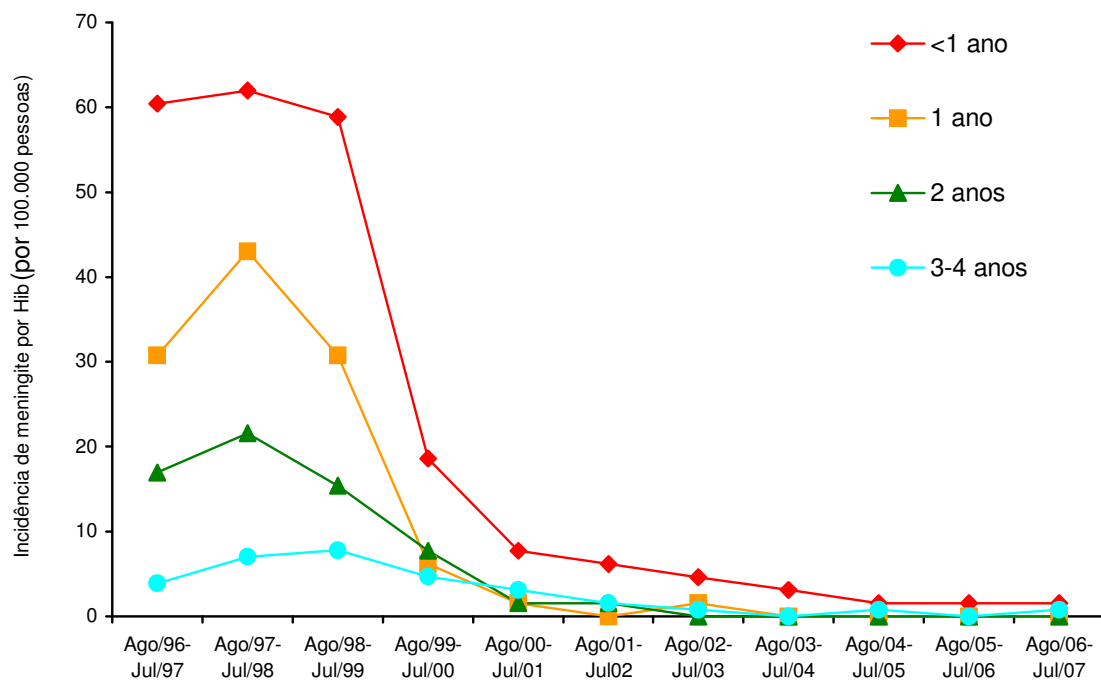
A incidência da meningite teve uma redução de 66,8% no primeiro ano após introdução da vacina anti-Hib em crianças com idade inferior a 5 anos. E a cada ano de imunização, a incidência foi reduzindo até chegar a 98,8% entre os anos de 2005 e 2006, segundo figura abaixo:

Figura 4: Redução na incidência de meningite por Hib em crianças menores de 5 anos após introdução da vacina, na região metropolitana de Salvador (porcentagem de redução nos quadros) (n=345 casos).



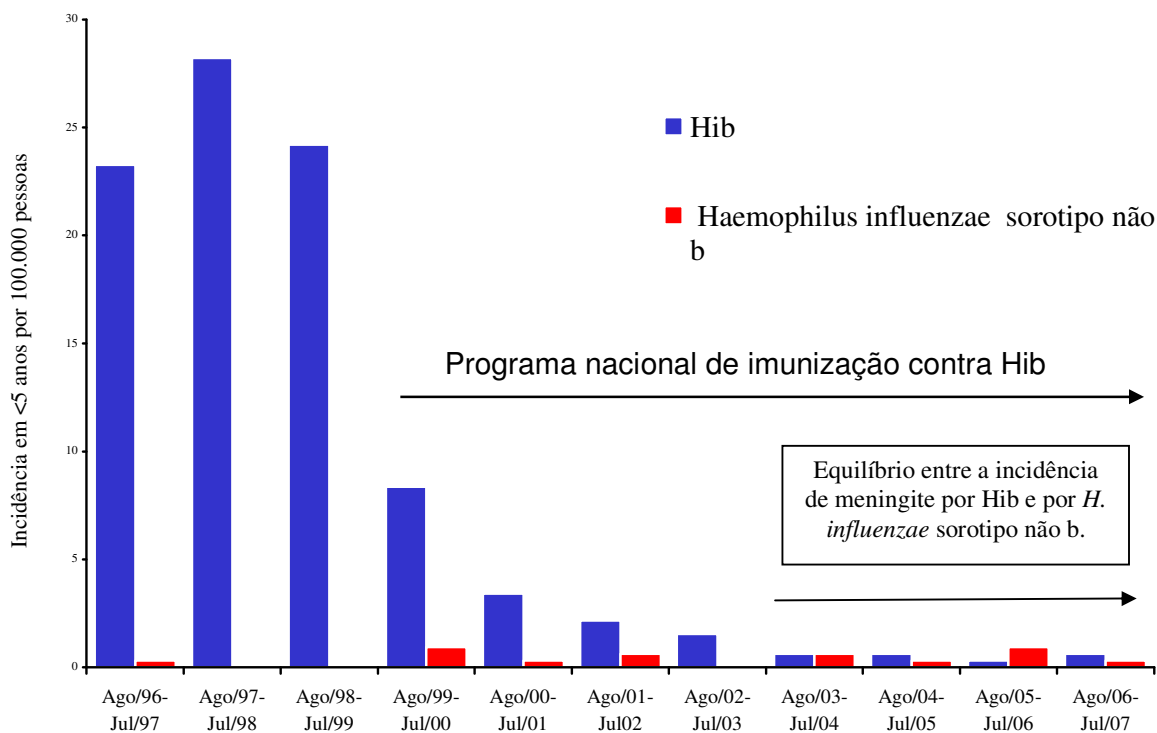
Quando estratificamos por faixa etária, podemos observar que a queda maior na incidência ocorreu em crianças menores de 1 ano de idade, onde se concentrava o maior número de casos. A vacina anti-Hib é administrada em crianças aos 2, 4 e 6 meses de vida, mas podemos observar que a queda na incidência também foi importante na faixa etária compreendida entre 1 ano e 4 anos de idade.

Figura 5: Incidência anual de meningite por Hib na região metropolitana de Salvador, estratificado por faixa etária.



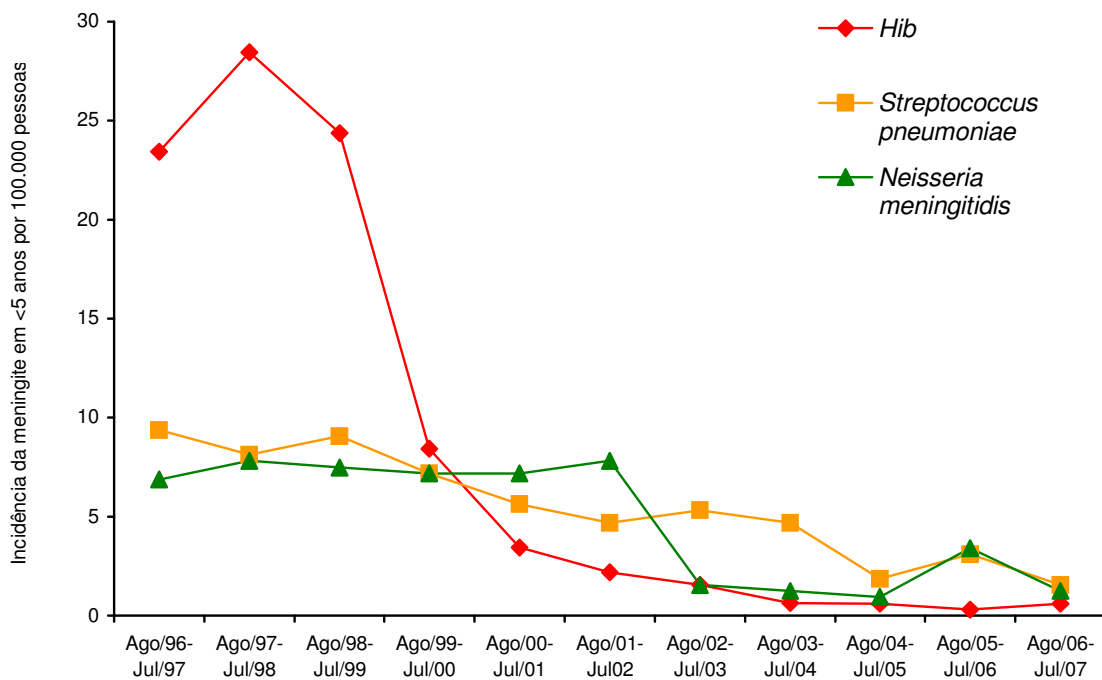
Avaliando a incidência da meningite por *H. influenzae* em menores de 5 anos, estratificada por sorotipo do isolado (sorotipo “b”, e sorotipo não “b”), é possível observar um equilíbrio entre a incidência da meningite pelo sorotipo “b”, e por outros sorotipos a partir de agosto de 2003, mas a incidência da meningite por esses outros sorotipos, que não são alvo da vacina, ainda é pequena se comparada com a incidência da meningite pelo *H. influenzae* que ocorria no período anterior à vacina.

Figura 6: Incidência anual de meningite por *Haemophilus influenzae* em menores de 5 anos na região metropolitana de Salvador, estratificado pelo sorotipo do isolado.



Observou-se também a redução da incidência da meningite causada pelo *Streptococcus pneumoniae* e pela *Neisseria meningitidis* ao longo da vigilância populacional, mas os índices de incidência continuam mais elevados em comparação ao *H. influenzae* sorotipo b.

Figura 07: Incidência anual de meningite bacteriana em crianças menores de 5 anos entre Agosto de 1996 a Julho de 2007, por agente etiológico.



6 DISCUSSÃO

A implementação de vacinas conjugadas contra o *Haemophilus influenzae* sorotipo “b” (Hib) na população pediátrica foi um dos maiores avanços de saúde Pública em países que seguiram a recomendação da Organização Mundial de Saúde, e introduziram a vacina anti-Hib nos programas de imunização infantil (OMS, 1998).

Diversos estudos realizados no Brasil e no mundo descreveram a mudança no cenário epidemiológico de infecções invasivas pelo *H. influenzae*, com reduções nas taxas de incidência pouco tempo após início da vacinação, chegando em alguns locais a praticamente eliminar as infecções (SANTOSHAM *et al.*, 1991) (CDC, 2002) (ADEGBOLA *et al.*, 2005) (FARHOUDI *et al.*, 2005).

O presente estudo avaliando o impacto da meningite pelo *H. influenzae* 5 anos após introdução da vacina identificou a redução na incidência de 2,39 (média do período pré vacina - entre agosto de 1997 e agosto de 1999) para 0,06 casos/100.000 hab. no ano de 2004 para a população geral; e uma redução de 60,92 (média pré-vacina) para 3,12 casos/100.000 hab. na população com idade inferior a 1 ano. Concluiu-se que houve uma redução nas taxas de incidência de 97,6% na população geral; redução de 94,9% na população alvo da vacina (menores de 1 ano); e ainda de 100% nas crianças entre 1 e 9 anos de idade, avaliando apenas o último ano de vigilância. Essa proteção de 100% em crianças que não são alvo da vacinação deve-se provavelmente, ao fenômeno já bem descrito e conhecido como imunidade de rebanho (ADEGBOLA *et al.*, 2005) (MOULTON *et al.*, 2000); e o rápido declínio na incidência da meningite pode também ter sido facilitado

pelo uso de uma dose única em crianças entre 12 e 23 meses nos primeiros 2 anos da campanha.

A estimativa é de que o uso de vacinas conjugadas anti-Hib preveniu 360 casos de meningite e 58 óbitos na Região Metropolitana de 3,5 milhões de habitantes durante cinco anos de introdução da vacina. Considerando oito anos após imunização, a prevenção foi de 611 casos de meningite e 92 óbitos. E ainda, foi capaz de prevenir seqüelas neurológicas que são encontradas em 25% dos casos entre as crianças que não chegam a óbito, por prevenir a infecção.

Poderia-se pensar que outros fatores que não apenas a vacina anti-Hib pudessem ser responsáveis pela redução nas taxas de incidência da meningite pelo *Haemophilus influenzae*. Uma primeira hipótese poderia ser uma falha na vigilância, o que seria improvável porque o estudo populacional foi baseado em dados de uma vigilância ativa, que se estende desde o ano de 1996, e durante todo o período estudado foram utilizados protocolos estabelecidos para casos de meningite pelo Hospital Estadual, não tendo mudanças que pudessem explicar a redução na incidência além da implementação da vacina anti-Hib. Para efeito de controle no sistema de vigilância, foram avaliadas também as incidências de meningite pelo *Streptococcus pneumoniae* e pela *Neisseria meningitidis*, também inclusos na vigilância ativa. Houve redução nas taxas de incidência para a infecção pelos dois patógenos, mas que não seguiu o mesmo declínio dramático que ocorreu com o *Haemophilus influenzae*; além disso, a redução da meningite pelo *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* ocorreu a nível nacional, e foi documentada em outros estados (KMETZSCH, 2003). Uma segunda hipótese poderia ser levantada: a de que o uso prévio de antibióticos poderia dificultar o isolamento do patógeno, levando a uma subestimação do número de casos após implementação da vacina; porém não foi

detectada uma mudança nos casos de meningites bacterianas com cultura negativa durante o período de vigilância.

A vigilância detectou que a imunização contra o *H. influenzae* sorotipo “b” vem sendo capaz de manter a redução da meningite pelo patógeno, o que foi confirmado com a redução da incidência após 5 anos e após 8 anos, segundo dados da atualização da vigilância. No Reino Unido, e Países Baixos, no entanto, foi observado um aumento na incidência de doenças invasivas, 7 e 9 anos respectivamente, após introdução da vacina anti-Hib (RAMSAY *et al.*, 2003) (RIJKERS *et al.*, 2003). Algumas possíveis explicações seriam: declínio na memória imunológica (TROTTER *et al.*, 2003); administração da vacina anti-Hib com o componente da coqueluche acelular (DTaP), que tem sido associada com imunogenicidade do polissacarídeo PRP reduzida (McVERNON e cols., 2003), além de ser administrada nas crianças mais precocemente com 2, 3 e 4 meses de idade (OMS, 2006); e redução no reforço natural devido a baixos níveis de colonização após introdução da vacina (MCVERNON *et al.*, 2004).

No Brasil, as três doses da vacina anti-Hib são administradas com o componente da coqueluche celular (DTwP), com as crianças aos 2, 4 e 6 meses de idade. Foi detectado um único caso de meningite pelo *H. influenzae* sorotipo “b” em uma criança que completou as três doses da vacina; e embora não tenhamos a dose de reforço, que é administrada nos países desenvolvidos entre 12-18 meses de idade (OMS, 2006), não foi observado durante a vigilância nenhum aumento na incidência da meningite, ao contrário, ela vem caindo a cada ano. No entanto, recomenda-se seguir com a vigilância tanto na população alvo da vacina, bem como também em outras faixas etárias, para assegurar a efetividade da vacina em

períodos longos, e avaliar a possível necessidade da recomendação de uma dose de reforço.

Em um estudo prévio em Salvador, foi identificado aumento estatisticamente significativo na incidência da meningite pelo sorotipo “a” no primeiro ano após introdução da vacina (RIBEIRO *et al.*, 2003), associado com *serotype replacement*. Mas durante os anos seguintes, esse aumento não foi sustentado, apesar de ocorrer atualmente um equilíbrio entre a incidência da meningite pelo *H. influenzae* sorotipo “b”, e por outros sorotipos.

Em outros países também foram relatados casos de infecções invasivas por outros sorotipos, antes raramente associados a doenças graves (KROLL *et al.*, 1994) (ADDERSON *et al.*, 2001) (KAPOGIANNIS *et al.*, 2005) (MILLAR *et al.*, 2005) (HAMMITT *et al.*, 2005) (TSANG *et al.*, 2006). Nesse estudo, em 11 anos de vigilância, descrevemos 40 casos de meningite devido a isolados de *H. influenzae* sorotipo não “b”, sendo 8 (20%) casos identificados antes da vacina, e 32 (80%) casos identificados 7 anos após vacina (sorotipos “a”, “e”, “f” e não capsulados). Para caracterização molecular, os isolados foram tipados pela técnica de eletroforese de campo pulsátil, padrão ouro para a tipagem do *Haemophilus influenzae*, e revelou que os isolados do sorotipo “a” são clonais, sendo agrupados os 27 isolados em apenas dois padrões diferentes (8 isolados do padrão A, e 19 do padrão B). Em contraste, os isolados não capsulados ou não tipáveis foram bastante heterogêneos, com 7 cepas classificadas em sete padrões diferentes, o que já havia sido documentado em outros estudos (VAN ALPHEN *et al.*, 1997) (TSANG *et al.*, 2006).

Foi possível observar que os dois padrões clonais do sorotipo “a” (padrão A e B) estavam circulando na comunidade tanto antes, quanto após introdução da

vacina, não caracterizando a introdução de novo clone mais virulento após vacinação. Em contrapartida, um desses clones do sorotipo "a", o que definimos como padrão A (com 8 isolados), apresentava a deleção parcial *IS1016-bexA*. Essa deleção parcial foi inicialmente descrita no sorotipo "b" como um fator de virulência (KROLL *et al.*, 1993) por promover a amplificação do gene capsular, conseqüentemente aumentando a produção da cápsula polissacarídica, o mecanismo de virulência clássico do *H. influenzae* sorotipo "b". Durante um surto no Gâmbia por isolados do sorotipo "a", foi detectado primeiramente, a deleção parcial *IS1016-bexA* neste sorotipo (KROLL *et al.*, 1994). Posteriormente em outros estudos, essa deleção também foi encontrada em isolados do sorotipo "a" associados com doenças graves (ADDERSON *et al.*, 2001) (KAPOGIANNIS *et al.*, 2005). A deleção *IS1016-bexA* foi associada com mortalidade elevada, embora não estatisticamente significativa, provavelmente devido ao pequeno número de casos que apresentavam a deleção, sendo apenas 8 casos. Desses 8 pacientes, 3 vieram a óbito. Por outro lado, dos 19 pacientes que não possuíam a deleção, apenas 1 veio a óbito. Nenhum outro paciente com meningite pelos outros sorotipos (sorotipo "e" e "f"), ou por isolados não capsulados foi a óbito.

O passo seguinte foi analisar a seqüência do sítio de deleção parcial *IS1016-bexA*. Comparando dois isolados do sorotipo "a" identificados durante vigilância, com um dos isolados do sorotipo "b", também identificado durante vigilância, foi identificado que a seqüência da deleção parcial é exatamente a mesma para o sorotipo "b" e sorotipo "a", com exceção de apenas um nucleotídeo na posição 152. Esse evento sugere que a aquisição da deleção parcial *IS1016-bexA* dos isolados do sorotipo "a" do nosso estudo pode ter ocorrido através de eventos de recombinação entre cepas do sorotipo "b" com o sorotipo "a". Para reforçar essa

conclusão, quando (KROLL *et al.*, 1994), identificaram em 1994 a presença da deleção parcial em isolados do sorotipo “a”, foi proposto que o evento pode ter sido resultado de uma transferência genética de cepas do sorotipo “b”, devido à natureza de transformação do locus *cap* do *Haemophilus influenzae*.

A presença da deleção *IS1016-bexA* foi também pesquisada nos outros sorotipos (3 isolados do sorotipo “e”, 3 do sorotipo “f”), e nas cepas não capsuladas ou não tipáveis (7 cepas), sendo todas negativas. Outro estudo, contudo, demonstrou a deleção parcial em 1 isolado do sorotipo “e”, e em 4 isolados do sorotipo “f” (OGILVIE *et al.*, 2001).

Para estabelecer a origem dos dois clones do sorotipo “a”, foi realizado MLST em duas cepas, uma pertencente ao padrão A, e a outra ao padrão B, classificados pelo PGFE. Foi identificado que o isolado do padrão A, que possui a deleção *IS1016-bexA*, é do mesmo *sequence typing* (ST) do isolado identificado no Gâmbia, onde esse mecanismo de virulência foi inicialmente detectado. O isolado do padrão B, negativo para a deleção, tem o mesmo *sequence typing* (ST) de um isolado identificado na Malásia em 1973 (MUSSER *et al.*, 1990).

Poderia-se pensar que a emergência dos isolados do sorotipo não “b” poderia ser resultado de problemas nos resultados da sorotipagem, ou até da ocorrência de um possível surto devido à introdução de nova cepa virulenta na comunidade. Para afastar essas hipóteses, a sorotipagem dos isolados do sorotipo não “b” foi confirmada pela técnica de semi-nested PCR (FALLA *et al.*, 1994), e após introdução da vacina, todos os isolados identificados na vigilância foram confirmados por PCR. Através da tipagem molecular pela técnica de PFGE, foi confirmado que os mesmos clones do sorotipo “a” identificados antes da implementação da vacina,

continuaram causando meningite após implementação da vacina, sendo que não houve a introdução de um terceiro clone possivelmente para causar um surto.

Outra explicação possível, seria a presença de novos fatores de virulência adquiridos pelos isolados do sorotipo não “b”, o que foi identificado por Shen e cols., (SHEN *et al.*, 2005) em isolados clínicos de *Haemophilus influenzae* não capsulados; mas além da presença da deleção parcial *IS1016-bexA*, não foram estudados outros fatores de virulência para as cepas identificadas durante o estudo.

A emergência de isolados do sorotipo não “b” que vem ocorrendo após introdução da vacina conjugada anti-Hib, e vem sendo detectada não apenas no Brasil, mas em diversos outros países no mundo, torna necessário o seguimento da vigilância populacional. Está claro que a vacina contra o sorotipo “b” não protege de infecções contra os outros sorotipos e cepas não capsuladas ou não tipáveis, já que a vacina é específica para o antígeno capsular do sorotipo “b”, que é diferente para os outros sorotipos e ausente nas cepas não capsuladas. Em estudo recente realizado em Manitoba, no Canadá, além do aumento proporcional no número de casos de doenças invasivas por sorotipos não “b”, foi identificado que a incidência das infecções pelo *H. influenzae* está se aproximando das taxas que eram presentes no período anterior à vacina (TSANG *et al.*, 2007).

Em Salvador, o número de casos ainda é muito pequeno para se pensar em intervenção da vacina, com a possibilidade da implementação de outro antígeno capsular. Mas é necessário continuar monitorando a efetividade da vacina, que é importante salientar, foi um dos maiores avanços atingidos pelas políticas de Saúde Pública; para assegurar que o surgimento de infecções pelos isolados de sorotipo não “b”, não venham a comprometer o quadro epidemiológico de praticamente eliminação da meningite pelo *Haemophilus influenzae*.

7 CONCLUSÕES

1. A vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* sorotipo “b” vem demonstrando efetividade importante durante os anos de vigilância ativa na cidade de Salvador, reduzindo a cada ano o número de casos de meningite pelo *H. influenzae*;
2. Foram identificados 40 casos de meningite por isolados de sorotipo não “b”, sendo 80% no período posterior à vacina anti-Hib;
3. A maioria dos casos de meningite pelo sorotipo “a” ocorreram em crianças menores de 5 anos (89%); enquanto que dos casos de meningite pelas cepas não capsuladas, 2/3 (71%) atingiram faixas etárias maiores;
4. Os isolados do sorotipo “a” foram clonais, apresentado apenas 2 clones distintos; enquanto que os isolados não capsulados não tinham clonalidade;
5. Os isolados sorotipo “a” agrupados no padrão A apresentavam a deleção parcial *IS1016-bexA*, estando associados com mortalidade elevada;
6. A seqüência da região de deleção parcial *IS1016-bexA*, fortalece a possibilidade da aquisição deste fator de virulência pelo sorotipo “a”, de isolados do sorotipo “b” da vigilância;
7. A análise pelo MLST, identificou que o isolado sorotipo “a” do padrão A tem o mesmo *sequence typing* do isolado identificado no Gâmbia, descrito como o primeiro isolado do sorotipo “a” no qual a deleção *IS1016-bexA* foi detectada;
8. Estudos de epidemiologia molecular do *Haemophilus influenzae* são importantes por fornecer dados da efetividade da vacina conjugada anti-Hib, além de monitorar o surgimento de isolados de outros sorotipos, eventos relevantes para decisões em políticas de Saúde Pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDERSON, E. E.; BYINGTON, C. L.; SPENCER, L.; KIMBALL, A.; HINDIYEH, M.; CARROLL, K.; MOTTICE, S.; KORGENSKI, E. K.; CHRISTENSON, J. C.; PAVIA, A. T. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? **Pediatrics**, v.108, n.1, Jul, p.E18. 2001.

ADEGBOLA, R. A.; 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, P. J. 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**, v.366, n.9480, Jul 9-15, p.144-50. 2005.

ANDERSON, P. Antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197. **Infect Immun**, v.39, n.1, Jan, p.233-8. 1983.

CAMPOS, J.; ROMAN, F.; PEREZ-VAZQUEZ, M.; OTEO, J.; ARACIL, B.; CERCENADO, E. Infections due to *Haemophilus influenzae* serotype E: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin Infect Dis**, v.37, n.6, Sep 15, p.841-5. 2003.

CDC. Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children--United States, 1998-2000. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.51, n.11, Mar 22, p.234-7. 2002.

CERQUETTI, M.; CIOFI DEGLI ATTI, M. L.; CARDINES, R.; SALMASO, S.; RENNA, G.; MASTRANTONIO, P. Invasive type e *Haemophilus influenzae* disease in Italy. **Emerg Infect Dis**, v.9, n.2, Feb, p.258-61. 2003.

CHU, C.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B.; RASTOGI, S. C. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. **Infect Immun**, v.40, n.1, Apr, p.245-56. 1983.

CORN, P. G.; ANDERS, J.; TAKALA, A. K.; KAYHTY, H.; HOISETH, S. K. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. **J Infect Dis**, v.167, n.2, Feb, p.356-64. 1993.

CRISEL, R. M.; BAKER, R. S.; DORMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. **J Biol Chem**, v.250, n.13, Jul 10, p.4926-30. 1975.

CURRAN, R.; HARDIE, K. R.; TOWNER, K. J. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of insertion mutations in the transferrin-binding system of *Haemophilus influenzae* type b. **J Med Microbiol**, v.41, n.2, Aug, p.120-6. 1994.

DE ALMEIDA, A. E.; DE FILIPPIS, I.; ABREU, A. O.; FERREIRA, D. G.; GEMAL, A. L.; MARZOCHI, K. B. 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**, v.38, n.5, May, p.777-81. 2005.

DICKINSON, F. O.; PEREZ, A. E.; GALINDO, M. A.; QUINTANA, I. [Impact of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Cuba]. **Rev Panam Salud Publica**, v.10, n.3, Sep, p.169-73. 2001.

DIMOPOULOU, I. D.; KRAAK, W. A.; ANDERSON, E. C.; NICHOLS, W. W.; SLACK, M. P.; CROOK, D. W. Molecular epidemiology of unrelated clusters of multiresistant strains of *Haemophilus influenzae*. **J Infect Dis**, v.165, n.6, Jun, p.1069-75. 1992.

DOMINGUEZ, S. R.; DAUM, R. S. Toward global *Haemophilus influenzae* type b immunization. **Clin Infect Dis**, v.37, n.12, Dec 15, p.1600-2. 2003.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol**, v.7, n.12, Dec, p.482-7. 1999.

ESKOLA, J.; KAYHTY, H.; TAKALA, A. K.; PELTOLA, H.; RONNBERG, P. R.; KELA, E.; PEKKANEN, E.; MCVERRY, P. H.; MAKELA, P. H. A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **N Engl J Med**, v.323, n.20, Nov 15, p.1381-7. 1990.

FALLA, T. J.; CROOK, D. W.; BROPHY, L. N.; MASKELL, D.; KROLL, J. S.; MOXON, E. R. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. **J Clin Microbiol**, v.32, n.10, Oct, p.2382-6. 1994.

FARHOUDI, D.; LOFDAHL, M.; GIESECKE, J. Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in Sweden 1997-2003: epidemiological trends and patterns in the post-vaccine era. **Scand J Infect Dis**, v.37, n.10, p.717-22. 2005.

FEIKIN, D. R.; NELSON, C. B.; WATT, J. P.; MOHSNI, E.; WENGER, J. D.; LEVINE, O. S. Rapid assessment tool for *Haemophilus influenzae* type b disease in developing countries. **Emerg Infect Dis**, v.10, n.7, Jul, p.1270-6. 2004.

FICKWEILER, K.; BORTE, M.; FASSHAUER, M.; SPENCKER, F. B.; HANDRICK, W.; RODLOFF, A. C. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type f in an 8-year-old girl with congenital humoral immunodeficiency. **Infection**, v.32, n.2, Apr, p.112-5. 2004.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v.269, n.5223, Jul 28, p.496-512. 1995.

FREITAS, H. S.; MERCHAN-HAMANN, E. [Impact of anti-Hib conjugate vaccine on the incidence of *Haemophilus influenzae* meningitis in Brazil's Federal District: results of a three-year follow-up]. **Rev Panam Salud Publica**, v.19, n.1, Jan, p.33-7. 2006.

GESSNER, B. D.; SUTANTO, A.; LINEHAN, M.; DJELANTIK, I. G.; FLETCHER, T.; GERUDUG, I. K.; INGERANI; MERCER, D.; MONIAGA, V.; MOULTON, L. H.;

MOULTON, L. H.; MULHOLLAND, K.; NELSON, C.; SOEMOHARDJO, S.; STEINHOFF, M.; WIDJAYA, A.; STOECKEL, P.; MAYNARD, J.; ARJOSO, S. Incidences of vaccine-preventable *Haemophilus influenzae* type b pneumonia and meningitis in Indonesian children: hamlet-randomised vaccine-probe trial. **Lancet**, v.365, n.9453, Jan 1-7, p.43-52. 2005.

HAMMITT, L. L.; BLOCK, S.; HENNESSY, T. W.; DEBYLE, C.; PETERS, H.; PARKINSON, A.; SINGLETON, R.; BUTLER, J. C. Outbreak of invasive *Haemophilus influenzae* serotype a disease. **Pediatr Infect Dis J**, v.24, n.5, May, p.453-6. 2005.

HARPER, J. J.; TILSE, M. H. Biotypes of *Haemophilus influenzae* that are associated with noninvasive infections. **J Clin Microbiol**, v.29, n.11, Nov, p.2539-42. 1991.

HOISETH, S. K.; MOXON, E. R.; SILVER, R. P. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are part of an 18-kilobase tandem duplication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.4, Feb, p.1106-10. 1986.

HVIID, A.; MELBYE, M. Impact of routine vaccination with a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. **Vaccine**, v.22, n.3-4, Jan 2, p.378-82. 2004.

JIN, Z.; ROMERO-STEINER, S.; CARLONE, G. M.; ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R. *Haemophilus influenzae* type a infection and its prevention. **Infect Immun**, v.75, n.6, Jun, p.2650-4. 2007.

KAPOGIANNIS, B. G.; SATOLA, S.; KEYSERLING, H. L.; FARLEY, M. M. Invasive infections with *Haemophilus influenzae* serotype a containing an IS1016-bexA partial deletion: possible association with virulence. **Clin Infect Dis**, v.41, n.11, Dec 1, p.e97-103. 2005.

KILIAN, M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. **J Gen Microbiol**, v.93, n.1, Mar, p.9-62. 1976.

KILIAN, M. *Haemophilus*. In: A. Press (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Tenover, R. C., Tenover, H., v.01, 2003. *Haemophilus*, p.623-635

KMETZSCH, C. I.; SCHERMANN, M. T.; SANTANA, J. C.; ESTIMA, C. L.; FARACO, F. J.; SILVA, C. M.; CONCEIÇÃO, R. Occurrence of *Haemophilus influenzae* B meningitis after the implementation of a mass vaccination program. **Jornal de Pediatria**, v.79, n.6, p.530-536. 2003.

KROLL, J. S. The genetics of encapsulation in *Haemophilus influenzae*. **J Infect Dis**, v.165 Suppl 1, Jun, p.S93-6. 1992.

KROLL, J. S.; HOPKINS, I.; MOXON, E. R. Capsule loss in *Haemophilus influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. **Cell**, v.53, n.3, May 6, p.347-56. 1988.

KROLL, J. S.; MOXON, E. R. Capsulation and gene copy number at the cap locus of *Haemophilus influenzae* type b. **J Bacteriol**, v.170, n.2, Feb, p.859-64. 1988.

KROLL, J. S.; MOXON, E. R.; LOYNDS, B. M. An ancestral mutation enhancing the fitness and increasing the virulence of *Haemophilus influenzae* type b. **J Infect Dis**, v.168, n.1, Jul, p.172-6. 1993.

KROLL, J. S.; MOXON, E. R.; LOYNDS, B. M. Natural genetic transfer of a putative virulence-enhancing mutation to *Haemophilus influenzae* type a. **J Infect Dis**, v.169, n.3, Mar, p.676-9. 1994.

KROLL, J. S.; ZAMZE, S.; LOYNDS, B.; MOXON, E. R. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. **J Bacteriol**, v.171, n.6, Jun, p.3343-7. 1989.

LACLAIRE, L. L.; TONDELLA, M. L.; BEALL, D. S.; NOBLE, C. A.; RAGHUNATHAN, P. L.; ROSENSTEIN, N. E.; POPOVIC, T. Identification of *Haemophilus influenzae*

serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. **J Clin Microbiol**, v.41, n.1, Jan, p.393-6. 2003.

LAGOS, R.; HORWITZ, I.; TORO, J.; SAN MARTIN, O.; ABREGO, P.; BUSTAMANTE, C.; WASSERMAN, S. S.; LEVINE, O. S.; LEVINE, M. M. Large scale, postlicensure, selective vaccination of Chilean infants with PRP-T conjugate vaccine: practicality and effectiveness in preventing invasive *Haemophilus influenzae* type b infections. **Pediatr Infect Dis J**, v.15, n.3, Mar, p.216-22. 1996.

LANZAVECCHIA, A. Antigen presentation by B lymphocytes: a critical step in T-B collaboration. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.130, p.65-78. 1986.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.6, Mar 17, p.3140-5. 1998.

MAKELA, P. H.; TAKALA, A. K.; PELTOLA, H.; ESKOLA, J. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **J Infect Dis**, v.165 Suppl 1, Jun, p.S2-6. 1992.

MARIMON, J. M.; PEREZ-TRALLERO, E.; ERCIBENGOA, M.; GONZALEZ, A.; FENOLL, A. Molecular epidemiology and variants of the multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain14-5 international clone among Spanish clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.4, Apr, p.654-60. 2006.

MCVERNON, J.; ANDREWS, N.; SLACK, M. P.; RAMSAY, M. E. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b (Hib) combination vaccines with acellular pertussis. **Lancet**, v.361, n.9368, May 3, p.1521-3. 2003.

MCVERNON, J.; MITCHISON, N. A.; MOXON, E. R. T helper cells and efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccination. **Lancet Infect Dis**, v.4, n.1, Jan, p.40-3. 2004.

MEATS, E.; FEIL, E. J.; STRINGER, S.; CODY, A. J.; GOLDSTEIN, R.; KROLL, J. S.; POPOVIC, T.; SPRATT, B. G. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**, v.41, n.4, Apr, p.1623-36. 2003.

MILLAR, E. V.; O'BRIEN, K. L.; WATT, J. P.; LINGAPPA, J.; PALLIPAMU, R.; ROSENSTEIN, N.; HU, D.; REID, R.; SANTOSHAM, M. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type A disease among Navajo and White Mountain Apache children, 1988-2003. **Clin Infect Dis**, v.40, n.6, Mar 15, p.823-30. 2005.

MIRANZI SDE, S.; DE MORAES, S. A.; DE FREITAS, I. C. Impact of the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program on HIB meningitis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v.23, n.7, Jul, p.1689-95. 2007.

MITCHISON, A. Latent help to and from H-2 antigens. **Eur J Immunol**, v.22, n.1, Jan, p.123-7. 1992.

MOULTON, L. H.; CHUNG, S.; CROLL, J.; REID, R.; WEATHERHOLTZ, R. C.; SANTOSHAM, M. Estimation of the indirect effect of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in an American Indian population. **Int J Epidemiol**, v.29, n.4, Aug, p.753-6. 2000.

MOXON, E. R. Molecular basis of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. **J Infect Dis**, v.165 Suppl 1, Jun, p.S77-81. 1992.

MOXON, E. R.; MURPHY, T. F. *Haemophilus influenzae*. In: C. Livingstone (Ed.). **Principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., v.2, 2000. *Haemophilus influenzae*, p.2369-2378

MUSSER, J. M.; BARENKAMP, S. J.; GRANOFF, D. M.; SELANDER, R. K. Genetic relationships of serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. **Infect Immun**, v.52, n.1, Apr, p.183-91. 1986.

MUSSER, J. M.; KROLL, J. S.; GRANOFF, D. M.; MOXON, E. R.; BRODEUR, B. R.; CAMPOS, J.; DABERNAT, H.; FREDERIKSEN, W.; HAMEL, J.; HAMMOND, G.; *et al.* Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. **Rev Infect Dis**, v.12, n.1, Jan-Feb, p.75-111. 1990.

MUSSER, J. M.; KROLL, J. S.; MOXON, E. R.; SELANDER, R. K. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. **Infect Immun**, v.56, n.8, Aug, p.1837-45. 1988.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. Etiology of childhood community acquired pneumonia and its implications for vaccination. **Braz J Infect Dis**, v.5, n.2, Apr, p.87-97. 2001.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; DE ANDRADE, A. L. *Haemophilus influenzae* type b vaccination: long-term protection. **J Pediatr (Rio J)**, v.82, n.3 Suppl, Jul, p.S109-14. 2006.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; MORENO-CARVALHO, O. A. Etiology of bacterial meningitis among children aged 2-59 months in Salvador, Northeast Brazil, before and after routine use of *Haemophilus influenzae* type B vaccine. **Arq Neuropsiquiatr**, v.62, n.2A, Jun, p.250-2. 2004.

NOEL, G. J.; BRITTINGHAM, A.; GRANATO, A. A.; MOSSER, D. M. Effect of amplification of the Cap b locus on complement-mediated bacteriolysis and opsonization of type b *Haemophilus influenzae*. **Infect Immun**, v.64, n.11, Nov, p.4769-75. 1996.

OBERHOFER, T. R.; BACK, A. E. Biotypes of *Haemophilus* encountered in clinical laboratories. **J Clin Microbiol**, v.10, n.2, Aug, p.168-74. 1979.

OGILVIE, C.; OMIKUNLE, A.; WANG, Y.; ST GEME, I. J.; RODRIGUEZ, C. A.; ADDERSON, E. E. Capsulation loci of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. **J Infect Dis**, v.184, n.2, Jul 15, p.144-9. 2001.

OLVERA, A.; CERDA-CUELLAR, M.; ARAGON, V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. **Microbiology**, v.152, n.Pt 12, Dec, p.3683-90. 2006.

OMS. Global Programme for Vaccines and Immunization (GPV). The WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Wkly Epidemiol Rec**, v.73, n.10, Mar 6, p.64-8. 1998.

OMS. WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. (Replaces WHO position paper on Hib vaccines previously published in the Weekly Epidemiological Record. **Wkly Epidemiol Rec**, v.81, n.47, Nov 24, p.445-52. 2006.

PAI, R.; GERTZ, R. E.; WHITNEY, C. G.; BEALL, B. Clonal association between *Streptococcus pneumoniae* serotype 23A, circulating within the United States, and an internationally dispersed clone of serotype 23F. **J Clin Microbiol**, v.43, n.11, Nov, p.5440-4. 2005.

PELTOLA, H. *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Europe: lessons learned. **Pediatr Infect Dis J**, v.17, n.9 Suppl, Sep, p.S126-32. 1998.

PELTOLA, H.; VIRTANEN, M. Systemic *Haemophilus influenzae* infection in Finland. **Clin Pediatr (Phila)**, v.23, n.5, May, p.275-80. 1984.

PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae* **J. Exp. Med.**, v.53, p.471-492. 1931.

PORRAS, O.; CAUGANT, D. A.; GRAY, B.; LAGERGARD, T.; LEVIN, B. R.; SVANBORG-EDEN, C. Difference in structure between type b and nontypable *Haemophilus influenzae* populations. **Infect Immun**, v.53, n.1, Jul, p.79-89. 1986.

RAMSAY, M. E.; MCVERNON, J.; ANDREWS, N. J.; HEATH, P. T.; SLACK, M. P. Estimating *Haemophilus influenzae* type b vaccine effectiveness in England and Wales by use of the screening method. **J Infect Dis**, v.188, n.4, Aug 15, p.481-5. 2003.

RAO, V. K.; KRASAN, G. P.; HENDRIXSON, D. R.; DAWID, S.; ST GEME, J. W. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. **FEMS Microbiol Rev**, v.23, n.2, Apr, p.99-129. 1999.

REINERT, R. R.; VAN DER LINDEN, M.; SEEGMULLER, I.; AL-LAHHAM, A.; SIEDLER, A.; WEISSMANN, B.; TOSCHKE, A. M.; VON KRIES, R. Molecular epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Germany. **Clin Microbiol Infect**, v.13, n.4, Apr, p.363-8. 2007.

RIBEIRO, G. S.; LIMA, J. B.; REIS, J. N.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LOBO, T. S.; PINHEIRO, R. M.; RIBEIRO, C. T.; NEVES, A. B.; SALGADO, K.; SILVA, H. R.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**, v.25, n.22, May 30, p.4420-8. 2007.

RIBEIRO, G. S.; REIS, J. N.; CORDEIRO, S. M.; LIMA, J. B.; GOUVEIA, E. L.; PETERSEN, M.; SALGADO, K.; SILVA, H. R.; ZANELLA, R. C.; ALMEIDA, S. C.; BRANDILEONE, M. C.; REIS, M. G.; KO, A. I. 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**, v.187, n.1, Jan 1, p.109-16. 2003.

RIJKERS, G. T.; VERMEER-DE BONDT, P. E.; SPANJAARD, L.; BREUKELS, M. A.; SANDERS, E. A. Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. **Lancet**, v.361, n.9368, May 3, p.1563-4. 2003.

RUOCCO, G.; CURTO, S.; SAVIO, M.; LAURANI, H.; FROCHT, R. [Vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Uruguay: experience and impact]. **Rev Panam Salud Publica**, v.5, n.3, Mar, p.197-9. 1999.

SAHA, S. K.; BAQUI, A. H.; DARMSTADT, G. L.; RUHULAMIN, M.; HANIF, M.; EL ARIFEEN, S.; OISHI, K.; SANTOSHAM, M.; NAGATAKE, T.; BLACK, R. E. Invasive

Haemophilus influenzae type B diseases in Bangladesh, with increased resistance to antibiotics. **J Pediatr**, v.146, n.2, Feb, p.227-33. 2005.

SAITO, M.; UMEDA, A.; YOSHIDA, S. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol**, v.37, n.7, Jul, p.2142-7. 1999.

SANTOSHAM, M.; WOLFF, M.; REID, R.; HOHENBOKEN, M.; BATEMAN, M.; GOEPP, J.; CORTESE, M.; SACK, D.; HILL, J.; NEWCOMER, W.; *et al.* The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein complex. **N Engl J Med**, v.324, n.25, Jun 20, p.1767-72. 1991.

SATOLA, S. W.; SCHIRMER, P. L.; FARLEY, M. M. Complete sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. **Infect Immun**, v.71, n.6, Jun, p.3639-44. 2003.

SHEN, K.; ANTALIS, P.; GLADITZ, J.; SAYEED, S.; AHMED, A.; YU, S.; HAYES, J.; JOHNSON, S.; DICE, B.; DOPICO, R.; KEEFE, R.; JANTO, B.; CHONG, W.; GOODWIN, J.; WADOWSKY, R. M.; ERDOS, G.; POST, J. C.; EHRLICH, G. D.; HU, F. Z. Identification, distribution, and expression of novel genes in 10 clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Infect Immun**, v.73, n.6, Jun, p.3479-91. 2005.

SIMOES, L. L.; ANDRADE, A. L.; LAVAL, C. A.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; MARTELLI, C. M.; ALVES, S. L.; ALMEIDA, R. M.; ANDRADE, J. G. [Impact of *Haemophilus influenzae* b (Hib) vaccination on meningitis in Central Brazil]. **Rev Saude Publica**, v.38, n.5, Oct, p.664-70. 2004.

SINGLETON, R.; HAMMITT, L.; HENNESSY, T.; BULKOW, L.; DEBYLE, C.; PARKINSON, A.; COTTLE, T. E.; PETERS, H.; BUTLER, J. C. The Alaska *Haemophilus influenzae* type b experience: lessons in controlling a vaccine-preventable disease. **Pediatrics**, v.118, n.2, Aug, p.e421-9. 2006.

SMITH, A. J.; JEFFERIES, J.; CLARKE, S. C.; DOWSON, C.; EDWARDS, G. F.; MITCHELL, T. J. Distribution of epidemic antibiotic-resistant pneumococcal clones in Scottish pneumococcal isolates analysed by multilocus sequence typing. **Microbiology**, v.152, n.Pt 2, Feb, p.361-5. 2006.

SOUSA, N. G.; SA-LEAO, R.; CRISOSTOMO, M. I.; SIMAS, C.; NUNES, S.; FRAZAO, N.; CARRICO, J. A.; MATO, R.; SANTOS-SANCHES, I.; DE LENCASTRE, H. Properties of novel international drug-resistant pneumococcal clones identified in day-care centers of Lisbon, Portugal. **J Clin Microbiol**, v.43, n.9, Sep, p.4696-703. 2005.

ST GEME, J. W. The pathogenesis of nontypable *Haemophilus influenzae* otitis media. **Vaccine**, v.19 Suppl 1, Dec 8, p.S41-50. 2000.

ST GEME, J. W.; FALKOW, S.; BARENKAMP, S. J. High-molecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.7, Apr 1, p.2875-9. 1993.

SUTTON, A.; SCHNEERSON, R.; KENDALL-MORRIS, S.; ROBBINS, J. B. Differential complement resistance mediates virulence of *Haemophilus influenzae* type b. **Infect Immun**, v.35, n.1, Jan, p.95-104. 1982.

TAKEMURA, N. S.; ANDRADE, S. M. [*Haemophilus influenzae* type b meningitis in the state of Parana, Brazil]. **J Pediatr (Rio J)**, v.77, n.5, Sep-Oct, p.387-92. 2001.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n.9, Sep, p.2233-9. 1995.

TROTTER, C. L.; MCVERNON, J.; ANDREWS, N. J.; BURRAGE, M.; RAMSAY, M. E. Antibody to *Haemophilus influenzae* type b after routine and catch-up vaccination. **Lancet**, v.361, n.9368, May 3, p.1523-4. 2003.

TSANG, R. S.; MUBAREKA, S.; SILL, M. L.; WYLIE, J.; SKINNER, S.; LAW, D. K. Invasive *Haemophilus influenzae* in Manitoba, Canada, in the postvaccination era. **J Clin Microbiol**, v.44, n.4, Apr, p.1530-5. 2006.

TSANG, R. S.; SILL, M. L.; SKINNER, S. J.; LAW, D. K.; ZHOU, J.; WYLIE, J. Characterization of invasive *Haemophilus influenzae* disease in Manitoba, Canada, 2000-2006: invasive disease due to non-type b strains. **Clin Infect Dis**, v.44, n.12, Jun 15, p.1611-4. 2007.

TUNKEL, A. R.; SCHELD, W. M. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. **Clin Microbiol Rev**, v.6, n.2, Apr, p.118-36. 1993.

TUNKEL, A. R.; SCHELD, W. M. Acute meningitis. In: C. Livingstone (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., v.1, 2000. Acute meningitis, p.966

TURK, D. C. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. **J Med Microbiol**, v.18, n.1, Aug, p.1-16. 1984.

URWIN, G.; KROHN, J. A.; DEEVER-ROBINSON, K.; WENGER, J. D.; FARLEY, M. M. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the H. influenzae serotype b vaccine era. The *Haemophilus influenzae* Study Group. **Clin Infect Dis**, v.22, n.6, Jun, p.1069-76. 1996.

VAN ALPHEN, L.; CAUGANT, D. A.; DUIM, B.; O'ROURKE, M.; BOWLER, L. D. Differences in genetic diversity of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* from various diseases. **Microbiology**, v.143 (Pt 4), Apr, p.1423-31. 1997.

VAN BELKUM, A.; DUIM, B.; REGELINK, A.; MOLLER, L.; QUINT, W.; VAN ALPHEN, L. Genomic DNA fingerprinting of clinical *Haemophilus influenzae* isolates by polymerase chain reaction amplification: comparison with major outer-membrane protein and restriction fragment length polymorphism analysis. **J Med Microbiol**, v.41, n.1, Jul, p.63-8. 1994.

WAGGONER-FOUNTAIN, L. A.; HENDLEY, J. O.; CODY, E. J.; PERRIELLO, V. A.; DONOWITZ, L. G. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. **Clin Infect Dis**, v.21, n.5, Nov, p.1322-4. 1995.

WANG, C. C.; SIU, L. K.; CHEN, M. K.; YU, Y. L.; LIN, F. M.; HO, M.; CHU, M. L. Use of automated riboprinter and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological studies of invasive *Haemophilus influenzae* in Taiwan. **J Med Microbiol**, v.50, n.3, Mar, p.277-83. 2001.

ZAMENHOF, S.; LEIDY, G.; FITZGERALD, P. L.; ALEXANDER, H. E.; CHARGAFF, E. Polyribophosphate, the type-specific substance of *Hemophilus influenzae*, type b. **J Biol Chem**, v.203, n.2, Aug, p.695-704. 1953.

ANEXO A - Questionário epidemiológico

ESTUDO DE MENINGITE POR *Haemophilus influenzae*

I. Identificação do Paciente:

1. Número de identificação do estudo |_|_|_|_|
2. Número de identificação no HCM (registro ou PA) |_|_|_|_|_|_|_|
3. Se paciente foi de outro hospital, qual? _____
4. Data de admissão _/_/_
5. Nome _____

6. Entrevista: (1=entrevistado ; 2=revisão prontuário; 3=prontuário PA) |_|

7. Consentimento (1=s; 0=n; 9=não sabe; 8=nsa) |_|

II. Identificação Microbiológica

1. Coloração de Gram positiva para bastonetes gram negativos |_|
2. Cultura do líquor é positiva para *H. influenzae* |_|
3. Hemocultura positiva para *H. influenzae* (8=não fez) |_|
5. Látex é positivo para *H. influenzae* |_|
6. Dados do líquor:
- a. Prejudicada (1=s, 0=n) |_|
- b. Contagem de leucócitos |_|_|.|_|_|_|
- c. Predominância (>75%) de PMNs (1=s, 0=n) |_|
- d. Glicose (mg/dl) |_|
- e. Proteína |_|
7. Sorotipo da amostra no HCMaia (8=não fez) |_|

III. Dados Demográficos

1. Idade em anos (Se <1 ano, coloque 0) |_|_|
 Se <2 anos, idade do paciente em meses: |_|_|
 Se <1 mês, idade do paciente em dias: |_|_|
2. Sexo (1=M, 0=F, 9=ns): |_|
3. Procedência (1=Salvador, 0=Interior; 8=nsa; 9=ns): |_|
- Rua: _____
- Bairro: _____ Cidade: _____
4. Escolaridade: |_|
 (1=analfabeto; 2= prim. grau (1a - 4a series); 3= prim. grau (5a - 8a series); 4=2º. grau (incompleto); 5=2º. grau (completo); 6=universidade(incompleta); 7=universidade comp)

IV. Começo dos Sintomas : (1=s,0=n;8=nsa;9=ns)

- | 1. Quando começou a doença: | Dias antes do HCM |
|-----------------------------|-------------------|
| 2. Febre: _ | _ |
| 3. Dor de cabeça: _ | _ |
| 4. Confusão mental: _ | _ |
| 5. Sonolência: _ | _ |
| 6. Inconsciente: _ | _ |
| 7. Convulsões: _ | _ |
| 8. Rigidez de nuca: _ | _ |
| 9. Náusea/vômito: _ | _ |

V. História de hospitalizações anteriores:

1. Foi internado de 0 a 3 dias antes de iniciar sintomas de meningite?
-

Motivo: _____ Onde? _____

VI. Tratamento do paciente

1. Esquema inicial incluiu (1=s, 0=n):

- a. Penicilina ou ampicilina
- b. Cloranfenicol
- c. Rocefim (ceftriaxona)
- d. Ceftazidima

2. Para os casos que não começou com rocefim, foi incluída depois:
-
- Se sim, quando: _____ DIH

3. Foi tratado com esteróide IV (1=s, 0=n, 9=ns):
-
- Quantos dias _____
-
- Que dia começou _____ DIH

VII. Evolução Clínica: Alta final

1. Data da alta: _____/_____/_____

2. Tipo de alta (1=curado; 2=transferido; 3 = outro diagnóstico; 4= óbito):
-

3. Dias internados no HCM:
-
-

4. Dias internados na UTI do HCM:
-
-

5. Convulsões durante o internamento (1=s;0=n;9=ns;8=nsa):
-

6. Evoluiu com sinais neurológicos focais (1=s, 0=n, 9=ns):
-

- 6.1. Se sim, Qual _____

7. Déficit neurológico na alta:
-

(0= não tem; 1= perda auditiva; 2=deficit motor; 3 = alt. nervos cranianos; 4 = ataxia ; 5= alteração estado mental)

VIII. Informações sobre o uso de vacinas (para ser aplicado nos <2anos):

Sempre que o responsável não apresentar o cartão no momento da entrevista deve-se avaliar possibilidade de marcar uma data posterior para a verificação do mesmo.

- a. Data de nascimento: _____/_____/_____

- b. Paciente apresenta cartão (1=s, 0=n, 8=nsa, 9=ns):
-

- c. Presença de cicatriz no braço marcando uso de BCG:
-

Vacinas	Uso cartão	Data cartão	Local cartão
Anti-Hib (1ª dose)			
Anti-Hib (2ª dose)			
Anti-Hib (3ª dose)			
DPT (1ª dose)			
DPT (2ª dose)			
DPT (3ª dose)			
Anti-pólio (1ª dose)			
Anti-pólio (2ª dose)			
Anti-pólio (3ª dose)			
BCG			
Hepatite B (1ª dose)			
Hepatite B (2ª dose)			
Hepatite b (3ª dose)			

IX. Informações sobre posto de saúde (apenas para os pacientes procedentes de Salvador):

- a. Em qual posto você costuma levar seu filho para tomar vacinas?

Posto: _____ Bairro: _____

- b. A criança já recebeu atendimento lá? (1=s, 0=n, 8=nsa):
-

Se sim, quantas vezes?

- c. Em qual posto/centro/clínica você costuma levar seu filho para atendimento médico?

Posto: _____ Bairro: _____

Quantas vezes?

|_|_|

X. Problemas com a vacinação contra o Hib:

1. A criança deveria ter completado (3 doses) a imunização contra o Hib (> ou = a 7 meses): |_|

2. Se não completou, qual foi o motivo?

Não disponível no posto |_|

Não sabia que a vacina estava disponível |_|

Sem dinheiro para transporte |_|

Paciente estava doente na alta |_|

Posto de vacina fica longe |_|

Não tem tempo por causa do trabalho |_|

Tem medo de vacinar |_|

Esquecimento |_|

Outras vezes |_|

XI. Informações epidemiológicas:

1. Renda mensal:

|_|_| salários

2. Pais trabalham: (1=s, 0=n, 8=nsa, 9=ns)

Pai: |_| Quantas horas/dia: |_|_|

Mãe |_| Quantas horas/dia: |_|_|

3. Quem toma conta da criança durante o dia: _____

4. Quantas crianças com idade <2 anos moram na mesma casa |_|_| Quantas receberam anti-Hib |_|_|

5. Quantas crianças entre 2-5 anos moram na mesma casa |_|_| Quantas receberam anti-Hib |_|_|

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Consentimento para Investigação Clínica: Página 1

Título do Projeto: Estudo de Meningite Bacteriana no Hospital Couto Maia.

Paciente: _____ No. na Pesquisa: _____

Introdução:

As informações que se seguem descrevem o estudo e seu papel como participante. O entrevistador responderá todas as perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo do Estudo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo que estamos realizando no Hospital Couto Maia sobre meningite bacteriana. A meningite é uma inflamação que ocorre no cérebro, é uma doença grave que acomete principalmente crianças, mas pode ocorrer em qualquer idade.

O objetivo do nosso estudo é conhecer mais as bactérias que causam meningite, estudando como elas são transmitidas; quais são os fatores que fazem com que algumas pessoas apresentem um quadro mais grave que outras; porque algumas crianças parecem ter no sangue uma defesa (anticorpos) contra a bactéria e como elas adquiriram esta defesa. Obtendo estas informações teremos condições, no futuro, de implantar medidas para diminuir o número de pessoas com meningite.

Você está sendo convidado(a) a participar porque você tem meningite bacteriana confirmada por exames ou porque com certeza você não tem esta doença. Todo estudo científico deste tipo precisa comparar pessoas que tem a doença com pessoas que não tem; só assim, saberemos o que é realmente importante para a doença e o que é apenas coincidência.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar deste estudo após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas sobre o local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica e lerá seu prontuário médico para obter os resultados de seus exames no hospital.

Sigilo:

As perguntas feitas durante a entrevista ou as informações do seu prontuário médico ou dos seus exames serão confidenciais e apenas você e o investigador terão acesso a elas. Você não será identificado (a) em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista. Sua recusa em participar no estudo ou em parte do mesmo, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações como Hospital Couto Maia no

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Consentimento para Investigação Clínica: Página 2

Título do Projeto: Estudo de Meningite Bacteriana no Hospital Couto Maia.

Paciente: _____ No. na Pesquisa: _____

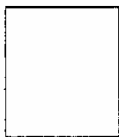
presente ou no futuro. Uma cópia deste formulário lhe será dada e você pode ficar com ela. Você não será responsável por nenhuma despesa relacionada a este estudo.

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo você pode contatar a Dra. Cibele Dourado pelo telefone: (071) 312-0084. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor entre em contato com Dr. Edilson Sacramento, Presidente da Comissão de Ética do Hospital Couto Maia, pelo telefone (071) 312-0084. Tanto Dra. Cibele quanto Dr. Edilson podem ainda ser contactados no Hospital Couto Maia cujo endereço é Rua São Francisco, s/n, Monte Serrat, no. 40, CEP 40.425-001, Salvador, Bahia.

Consentimento:

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto em participar deste estudo.

Assinatura do paciente_____
Data_____
Hora

Impressão datiloscópica do paciente

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto que o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou guardião legal participe deste estudo.

Assinatura do pai ou mãe ou guardião legal_____
Data_____
Hora

Impressão datiloscópica do pai ou mãe ou guardião legal

Assinatura da testemunha_____
Data_____
Hora_____
Assinatura do Investigador_____
Data_____
Hora

ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Rua Waldemar Falcão, 121, CEP: 40295-001
Tel.: (071) 356 8785 Fax: (071) 356 4292
E-mail: sherlock@server01.cpqgm.fiocruz.br
Salvador - Bahia - Brasil

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS DO CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

PARECER Nº 0038

Protocolo: 0038

Projeto de Pesquisa: "Epidemiologia Molecular das Meningites Bacterianas em Salvador/Bahia".

Pesquisador Responsável: Dr. Albert Ko

Instituição ou Departamento: CPqGM

Considerações: Foram atendidas e esclarecidas todas as pendências referentes aos aspectos éticos do Projeto "Epidemiologia Molecular das Meningites Bacterianas em Salvador/Bahia".

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga favorável o projeto supracitado.

Salvador, 30 de novembro de 1998


Dr. Italo A. Sherlock
Coordenador do CEP-CPqGM/FIOCRUZ

ANEXO D - Cidades que ficam no raio de 75Km de Salvador

Amélia Rodrigues	Muniz Ferreira
Aratuípe	Muritiba
Cachoeira	Nazaré
Camaçari	Pojuca
Candeias	Salvador
Catu	Salinas da Margarida
Conceição do Jacuípe	Santo Amaro
Cruz das Almas	São Felipe
Dias D'Ávila	São Félix
Governador Mangabeira	São Francisco do Conde
Itaparica	São Sebastião do Passe
Jaguaripe	Saubara
Lauro de Freitas	Simões Filho
Madre de Deus	Terra Nova
Maragojipe	Vera Cruz
Mata de São João	