

Cinthy Terumi Ogassavara

Avaliação da PCR-TR na detecção de *Haemophilus influenzae* em amostras de secreção de nasofaringe de crianças saudáveis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:

Profa. Dra. Rosemeire Cobo Zanella Ramos

São Paulo

2014

Cinthy Terumi Ogassavara

Avaliação da PCR-TR na detecção de *Haemophilus influenzae* em amostras de secreção de nasofaringe de crianças saudáveis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:

Profa. Dra. Rosemeire Cobo Zanella Ramos

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ogassavara, Cinthya Terumi

Avaliação da PCR-TR na detecção de *Haemophilus influenzae* em amostras de secreção de nasofaringe de crianças saudáveis. / Cinthya Terumi
Ogassavara – São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de
São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Rosemeire Cobo Zanella Ramos

1. *Haemophilus influenzae* 2. Portador sadio 3. Reação em
cadeia da polimerase 4. Reação em cadeia da polimerase em tempo
real 5. Ampliação de genes

SES/CCD/CD-284/13

Dedicatória

À minha mãe,
pela compreensão e pelo apoio incondicional nas minhas decisões

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Dra. Rosemeire Cobo Zanella Ramos, pela orientação neste trabalho, por toda ajuda e ensinamentos.

À Dra. Maria Cristina de Cunto Brandileone, diretora do NMPI, por ter permitido a utilização dos recursos do laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Eliete Caló Romero, por acreditar em mim. Seu apoio foi fundamental para o início da minha pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Ao Centro de Imunologia do IAL, por disponibilizar os laboratórios e equipamentos para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular de Meningites Bacterianas - IAL: Dr. Cláudio Tavares Sacchi, Dra. Lucila Okuyama Fukasawa, Maria Gisele Gonçalves, Maristela Marques Salgado, Fábio Takenori Higa, Terezinha Pereira de Araújo, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em ajudar.

À Dra. Ana Lúcia Sampaio Sgambatti Andrade, pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

À Dra. Ana Paula Silva de Lemos e à Samanta Cristine Grassi Almeida, pelos ensinamentos teóricos e laboratoriais das técnicas moleculares.

À Maria Cecília Outeiro Gorla e Angela Pires Brandão, pela ajuda em realizar os sorteios das amostras na planilha do Excel.

À equipe do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas: Marta Galhardo, Maria Vaneide de Paiva, Conceição Martins da Costa, Maria Helena Costa Cavalcante, Maria Luiza Leopoldo Silva e Guerra, Sérgio Bokermann e Lincoln Spinazola do Prado, pelo apoio, amizade e pela ajuda na parte laboratorial do trabalho.

A todos os funcionários, contratados, pós-graduandos, bolsistas do Centro de Bacteriologia, muito obrigada pela amizade, incentivo e pela ajuda direta ou indireta na confecção deste trabalho.

Índice

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Agente etiológico.....	2
1.2. Patogenicidade.....	3
1.3. Vacina.....	5
1.4. Epidemiologia.....	8
1.5. Estudo de portador.....	11
1.6. Diagnóstico laboratorial.....	12
1.6.1. Métodos fenotípicos.....	13
1.6.1.1. Cultura bacteriana.....	13
1.6.1.2. Bacterioscopia.....	14
1.6.2. Métodos imunológicos.....	14
1.6.2.1. Contraimuno eletroforese (CIE).....	14
1.6.2.2. Aglutinação pelo látex.....	15
1.6.3. Métodos moleculares.....	15
1.6.3.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	15
1.6.3.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR).....	16
1.7. Genes alvos.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Amostragem.....	24
3.2. Extração de DNA.....	25
3.2.1. Extração de DNA a partir do STGG.....	25
3.2.2. Extração de DNA do isolado bacteriano.....	28

3.3. PCR-TR.....	28
3.3.1. <i>rnaseP</i>	30
3.3.2. Controles da reação de PCR-TR.....	31
3.3.3. Limite mínimo de detecção (LMD) do gene alvo <i>hpd</i>	32
3.4. PCR convencional (<i>fucK</i>).....	34
3.5. Análise dos dados.....	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1. PCR-TR.....	38
4.1.1. Controles da PCR-TR.....	38
4.1.1.1. Detecção do gene <i>rnaseP</i> para o controle da extração de DNA das amostras de secreção de nasofaringe (STGG).....	38
4.1.1.2. Determinação do limite mínimo de detecção (LMD).....	38
4.1.1.3. Acurácia da curva ROC.....	40
4.1.2. Detecção do gene <i>hpd</i> a partir de amostras de secreção de nasofaringe (STGG).....	41
4.1.3. Análise da acurácia da PCR-TR para detecção do gene <i>hpd</i> (STGG) X Cultura.....	42
4.1.4. Detecção do gene <i>hpd</i> pela PCR-TR em isolados bacterianos.....	45
4.2. PCR convencional.....	45
4.2.1. Detecção do gene <i>fucK</i> pela PCR convencional a partir das amostras de secreção de nasofaringe (STGG).....	45
4.2.2. Análise dos resultados da PCR convencional (STGG) X Cultura.....	46
4.2.3. Detecção do gene <i>fucK</i> pela PCR convencional a partir de isolados bacterianos.....	48
4.2.4. Detecção dos gene <i>hpd</i> (PCR-TR) e <i>fucK</i> (PCR convencional) a partir dos isolados bacterianos.....	49
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8. ANEXOS.....	74
1. Algoritmo do estudo.....	75
2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	79

3. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.....	83
4. Aprovação de projeto de pesquisa pelo Conselho Técnico Científico.....	84
5. Justificativa da diferença entre o título do projeto desenvolvido e o título do projeto aprovado pela COEP.....	85

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>bexA</i>	Gene que codifica uma proteína envolvida no transporte da cápsula polissacarídica
BHQ1	<i>Black Hole Quencher 1</i>
°C	Graus Celsius
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIE	Contraímunoeletroforese
CO ₂	Dióxido de carbono
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRM197	Uma proteína de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTC	Conselho Técnico Científico
<i>ctrA</i>	Gene de <i>Neisseria meningitidis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
DTP+Hib	Vacina tetravalente contra difteria, tétano, coqueluche e <i>H. influenzae</i> tipo b
DTP+Hib+HB	Vacina pentavalente contra difteria, tétano, coqueluche, <i>H. influenzae</i> tipo b e hepatite B
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	Em conjunto com
F	Iniciador (<i>primer</i>) <i>forward</i>
FAM	6-carboxyfluorescein
Fator V	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - NAD
Fator X	Hemina
fg	Fentogramas
<i>fucK</i>	Gene responsável pela fuculose kinase
HbOC	PRP conjugado com uma proteína de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
HBs-Ag	Antígeno de superfície de hepatite B

Hhae	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
Hi	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
Hic	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo c
<i>hpd</i>	Gene que codifica a proteína D de <i>Haemophilus influenzae</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	Intervalo de confiança
<i>iga</i>	Gene responsável pela IgA protease
Kb	Quilobases
kDa	Quilodáltons
LCR	Líquido cefalorraquidiano
<i>igtC</i>	Gene que codifica o lipopolisacarídeo (LPS)
<i>licA</i>	Gene que codifica uma fosforilcolina kinase de fase variável
LMD	Limite mínimo de detecção
<i>lytA</i>	Gene de <i>Streptococcus pneumoniae</i>
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MGP	<i>Magnetic Glass Particles</i>
min	Minutos
mL	Mililitros
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NC	Não capsulado
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
NMPI	Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocóccicas
NT	Não tipável
<i>ompP2</i>	Gene que codifica a proteína da membrana externa P2

<i>ompP6</i>	Gene que codifica a proteína da membrana externa P6
Pb	<i>Probe</i> (sonda)
pb	Pares de base
PBS	Solução de salina-fostada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-TR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
pg	Picogramas
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PRP	Polirribosil ribitol fosfato - antígeno capsular
PRP-D	PRP conjugado com toxóide diftérico
PRP-OMP	PRP conjugado com uma proteína da membrana externa de <i>Neisseria meningitidis</i>
PRP-T	PRP conjugado com toxóide tetânico
R	Iniciador (<i>primer</i>) <i>reverse</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
<i>maseP</i>	Gene que codifica uma ribonuclease humana
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
seg	Segundos
STGG	<i>Skim milk-tryptone-glucose-glycerine</i>
spp.	Espécies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TaqMan	Tipo de sonda linear
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tampão Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0
U	Unidades
UV	Luz ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
µL	Microlitros
µM	Micromolar

Lista de Figuras

Figura 1 - Países que implantaram a vacina contra Hib no Programa de Imunização Infantil e a sua cobertura vacinal em crianças no ano 2010.....	6
Figura 2 - Gráfico com as fases características da PCR-TR.....	17
Figura 3 - Representação do ciclo de uma reação que atinge o limiar da fase exponencial e sua fluorescência é detectada pelo aparelho.....	18
Figura 4 - Passos da extração de DNA pelo MagNA Pure LC DNA Isolation.....	27
Figura 5 - Limite mínimo de detecção (LMD) da reação para o gene hpd.....	39
Figura 6 - Eficiência da PCR-TR para detecção do gene hpd.....	39
Figura 7 - Curva ROC para valores de Ct preditivos positivos para a detecção do gene hpd em amostras de secreção de nasofaringe em STGG....	40
Figura 8 - Porcentagem de positividade da PCR-TR (hpd) em 410 amostras de secreção de nasofaringe para detecção de Hi.....	41
Figura 9 - Comparação da pesquisa de Hi pela PCR-TR para o gene hpd e cultura a partir das 410 amostras de nasofaringe mantidas em STGG.....	42
Figura 10 - Positividade de Hi pela PCR convencional utilizando marcadores moleculares para o gene fucK em 410 amostras de secreção de nasofaringe mantidas em STGG.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Esquema vacinal recomendado pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention) contra Hib.....	5
Tabela 2 - Volume dos reagentes utilizados para a extração de DNA de 32 amostras no aparelho MagNA Pure LC 2.0 Instruments da Roche.....	26
Tabela 3 - Sequências dos marcadores moleculares utilizados na PCR-TR para a detecção do gene hpd.....	29
Tabela 4 - Sequências dos iniciadores e da sonda utilizada na PCR-TR para a detecção do gene rnaeP.....	30
Tabela 5 - Diluição do DNA da cepa de <i>H. influenzae</i> ATCC 9007 para a determinação do LMD para o gene hpd.....	33
Tabela 6 - Sequências dos iniciadores do gene <i>fucK</i> utilizados para PCR convencional.....	34
Tabela 7 - Interpretação dos valores do índice Kappa.....	36
Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos para a detecção de <i>H. influenzae</i> pela PCR-TR e cultura a partir das amostras de nasofaringe (STGG).....	43
Tabela 9 - Resultado da PCR-TR das 15 amostras de secreção de nasofaringe (STGG) e do DNA de 15 isolados bacterianos previamente identificados como <i>H. influenzae</i>	44
Tabela 10 - Comparação dos resultados obtidos pela cultura e PCR-TR para detectar Hi nos isolados bacterianos.....	45
Tabela 11 - Comparação dos resultados da PCR convencional e cultura para detectar Hi na secreção de nasofaringe.....	47
Tabela 12 - Resultados obtidos pela PCR-TR e PCR em amostras de secreção de nasofaringe em STGG e isolados bacterianos que apresentaram discrepância nos resultados de PCR-TR e cultura.....	48

Tabela 13 - Resultado de identificação dos 79 isolados bacterianos de Hi pela PCR-TR (hpd) e PCR (fucK), conforme critérios estabelecidos por Theodore et al. (2012)..... 49

Ogassavara CT. **Avaliação da PCR-TR na detecção de *Haemophilus influenzae* em amostras de secreção de nasofaringe de crianças saudáveis.** Dissertação (Mestrado) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2013.

Resumo

Haemophilus influenzae (Hi) é um microrganismo que faz parte da microbiota transitória da nasofaringe humana e, eventualmente, pode causar doenças em indivíduos suscetíveis. A vacina Hib conjugada além de proporcionar uma proteção direta contra a doença nos vacinados, também reduz a colonização da nasofaringe pelas cepas vacinais. Os estudos de portador de Hi na população permitem a caracterização das cepas circulantes, portanto a identificação correta do microrganismo é de fundamental importância para estimar com acurácia o efeito da vacina. A técnica padrão-ouro para detectar Hi em material clínico é a cultura, um método específico, de sensibilidade variável e que demanda maior tempo para a completa identificação do microrganismo. O uso de técnicas moleculares tem auxiliado na diferenciação de Hi de outras espécies do gênero *Haemophilus*, devido à alta sensibilidade e especificidade para detectar o agente etiológico. Diferentes ensaios de PCR-TR e PCR foram desenvolvidos para o diagnóstico de Hi utilizando diferentes genes alvo específicos como o gene *hpd* e o gene *fucK*. Estes genes são altamente conservados e permite a detecção de Hi capsulado e não capsulado. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia da PCR-TR utilizando o marcador molecular *hpd#3* para detectar o Hi na secreção de nasofaringe de crianças saudáveis comparando-a com a cultura. Um total de 410 amostras de secreção de nasofaringe estocadas a -70°C em meio STGG foi selecionado aleatoriamente para esta avaliação. Pela PCR-TR, 161 (39,2%) amostras foram positivas para o gene *hpd* e 249 (60,8%) negativas. Pela cultura, 166 (40,5%) amostras foram positivas para Hi e 244 (59,5%) culturas negativas. Sendo assim, a PCR-TR apresentou uma sensibilidade de 90,9% (95% IC: 85,3-94,7) e especificidade de 95,9% (95% IC: 92,4-97,9) quando comparada à cultura

para detectar Hi. A análise dos resultados não detectou diferença significativa (qui-quadrado de McNemar = 0,64 $p > 0,5$) entre a PCR-TR e a cultura, e o índice Kappa revelou uma excelente concordância (0,873) entre as técnicas. Como complementação de resultado, as mesmas amostras foram avaliadas pela PCR convencional para a presença do gene *fucK* e somente 99 (24%) amostras foram positivas e 311 (76%) negativas para a presença deste gene. Sendo assim, a PCR convencional apresentou uma sensibilidade de 57,8% (95% IC: 49,9-65,4) e uma especificidade de 98,8% (95% IC: 96,2-99,7), comparada à cultura. Uma menor positividade foi obtida pela PCR quando comparada à cultura (qui-quadrado de McNemar = 0,64 $p < 0,05$) e o índice Kappa revelou uma moderada concordância (0,605) entre as técnicas. De acordo com a excelente concordância de resultados entre a PCR-TR (*hpd#3*) e a cultura, concluímos que esta técnica é uma ferramenta importante para detectar Hi em amostras de nasofaringe e pode ser utilizada em estudos de portador com base populacional para avaliação do efeito da vacina de Hi.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae*, portador, cultura bacteriana, PCR, *hpd*, *fucK*.

Ogassavara CT. **Evaluation of real-time PCR assay for *Haemophilus influenzae* detection in nasopharyngeal samples from healthy children.** Dissertação (Mestrado) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2013.

Abstract

Haemophilus influenzae (Hi) colonizes the human nasopharynx and eventually can cause diseases in susceptible individuals. The Hib conjugate vaccine provides direct protection against the diseases and also reduces nasopharyngeal colonization by vaccine strain. Hi carriage studies allow the knowledge of circulating strains and the accurate identification of the microorganism is important to estimate the effect of the vaccine. Culture is the gold standard method to detect Hi in clinical samples, this is a specific method, with variable sensitivity and demand more time for the complete identification of the microorganism. The use of molecular techniques has helped in differentiating Hi from other species of the *Haemophilus* spp. due to the high sensitivity and specificity to detect the etiologic agent. Different RT-PCR and PCR assays were developed for the diagnosis of Hi using several biomarker genes such as *hpd* and *fucK* gene. These genes are highly conserved and are present in encapsulated and non-encapsulated Hi strains, allowing the detection of both variants. The aim of this study was to evaluate the accuracy of RT-PCR to detect Hi in nasopharyngeal samples of healthy children vaccinated against Hib comparing it with the culture. A total of 410 nasopharyngeal swabs stored at -70°C in STGG medium were randomly selected to evaluate RT-PCR assay targeting protein D (*hpd*#3). Considering the 410 nasopharyngeal swabs, 161 (39.2%) samples were positive for Hi and 249 (60.8%) had negative RT-PCR. By culture, 166 (40.5%) samples were positive for Hi and 244 (59.5%) were negative. Thus, the *hpd*#3 RT-PCR showed a sensitivity of 90.9% (95% CI: 85.3 - 94.7) and a specificity of 95.9% (95% CI: 92.4 - 97.9) when compared to culture to detect Hi in nasopharyngeal swabs. The results showed no significant difference (McNemar's chi-square = 0.64 $p > 0.5$) between RT-PCR and

culture and the Kappa coefficient showed an excellent agreement (0.873) between the two techniques. As complementary results, the same samples was evaluated for the presence of the *fucK* gene by conventional PCR and only 99 (24%) samples were positive and 311 (76%) were negative for the presence of this gene. Thus, the *fucK* PCR showed a sensitivity of 57.8% (95% CI: 49.9 - 65.4) and a specificity of 98.8% (95% CI: 96.2 - 99.7) when compared to culture. A lower positivity was obtained by PCR compared to culture (McNemar's chi-square = 0.64 $p < 0.05$) and the Kappa coefficient showed a moderate correlation (0.605) between the two techniques. According to the excellent agreement between the results of *hpd*#3 RT-PCR and and culture, we have concluded that this technique is an important tool for detecting Hi in nasopharyngeal samples and can be used in studies of population-based carriage to assess the effect of the Hi vaccine.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, carriage, bacterial culture, PCR, *hpd*, *fucK*.

Introdução

1. Introdução

1.1. Agente etiológico

As bactérias do gênero *Haemophilus* pertencem à família Pasteurellaceae que inclui também os gêneros *Actinobacillus*, *Aggregatibacter* e *Pasteurella*. O gênero *Haemophilus* (grego: *haima*, sangue; *philos*, amigo) foi proposto por Winslow e colaboradores em 1920. As principais espécies de *Haemophilus* que estão associadas à infecções ou colonização nos seres humanos são: *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. ducreyi*, *H. aegyptius*, *H. parahaemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. paraphrophilus* e *H. pittmaniae* (Ledebøer e Doern, 2011).

Haemophilus influenzae (Hi) é uma bactéria Gram-negativa, imóvel, não forma esporos e sua morfologia pode ser de um cocobacilo ou bastonete curto, sendo por isso considerado um bacilo pleomórfico; caracteriza-se por ser anaeróbia facultativa, oxidase e catalase positivas. Hi é uma bactéria fastidiosa que, para o crescimento *in vitro*, necessita de fatores de crescimento que estão presentes no sangue: Fator X (hemina) e o Fator V (nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD). Esta bactéria cresce melhor em ambiente rico em umidade, atmosfera com 5-10% de CO₂ e temperatura ótima de 35-37°C. As colônias de Hi em ágar chocolate são pequenas, translúcidas e apresentam coloração acinzentada após incubação por 24 horas a 37°C (Ledebøer e Doern, 2011).

Fenotipicamente, esta espécie pode ser classificada em oito biotipos (I a VIII), de acordo com três reações bioquímicas, a saber: produção de indol, presença de urease e atividade da ornitina descarboxilase. A determinação do biotipo é importante epidemiologicamente, pois eles estão associados a diferentes tipos de infecções, fontes de isolamento e propriedades antigênicas (Ledebøer e Doern, 2011).

Hi pode ou não expressar antígenos capsulares, sendo que as cepas capsuladas podem ser classificadas em seis sorotipos denominados: "a", "b", "c", "d", "e" e "f". A variante não capsulada (NC) ou não tipável (NT) é assim denominada quando a bactéria não possui genes para a expressão da cápsula. Os tipos capsulares antigenicamente e imunologicamente distintos foram primeiramente descritos em 1931 por Margaret Pittman (Pittman, 1931).

1.2. Patogenicidade

As duas variantes de Hi, capsulada e não capsulada, são parte da microbiota transitória das mucosas do trato respiratório humano. Indivíduos que portam estas bactérias na nasofaringe são denominados de portadores assintomáticos. Uma fração destes indivíduos (3 a 7%) pode albergar variantes capsuladas de Hi, sendo o estado de portador importante na transmissão desta bactéria para os indivíduos mais suscetíveis à infecção como crianças menores de cinco anos, idosos e indivíduos imunodeprimidos causando diversas doenças (Kelly et al., 2004; Poyrazoglu et al., 2005).

A transmissão ocorre de pessoa a pessoa e é disseminada por gotículas oriundas das vias respiratórias. Em alguns indivíduos, o microrganismo pode causar doença, mas o processo de invasão da bactéria para a corrente sanguínea não está completamente definido. A ocorrência prévia de uma infecção no trato respiratório por outros microrganismos, como vírus, pode contribuir para esta invasão (CDC, 2012). A permanência de crianças em berçários ou creches, número de irmãos na família, ausência de aleitamento materno e fumo passivo têm sido apontados como condições importantes para a aquisição da doença, porém a idade é o mais importante fator de risco associado à infecção por Hi (Bouskela et al., 2000).

O aleitamento materno é um importante fator de proteção nos primeiros meses de vida do recém-nascido devido à transmissão de anticorpos da mãe através do leite humano (Bouskela et al., 2000). Após este período, a criança começa a desenvolver o seu próprio sistema imune e a imunidade contra o Hi aumenta com a idade. Doenças invasivas causadas por Hi são menos frequentes em crianças maiores de 5 anos de idade (CDC, 2012).

A cápsula polissacarídica consiste de repetidos polímeros de ribosil, ribitol e fosfato (polirribosil ribitol fosfato – PRP), sendo considerado o principal fator de virulência de Hi, pois possui propriedades antifagocíticas sendo incapaz de induzir a via alternativa do complemento. A presença da cápsula pode favorecer a invasão da bactéria na corrente sanguínea e a sua disseminação pode atingir as meninges (Ada e Isaacs, 2003).

Entre as duas variantes de Hi, a variante capsulada é a principal responsável por causar doenças invasivas como meningite, bacteremia, septicemia, entre outras. Antes da introdução da vacina conjugada contra *H. influenzae* b (Hib) na década de 80, o Hib era responsável por cerca de 50 a 65% dos casos mundiais de meningites bacterianas. De 15 a 30% dos sobreviventes ficavam com sequelas neurológicas e os casos fatais variavam de 2 a 5% (CDC, 2012).

A variante não capsulada (NC) está associada principalmente às doenças como pneumonia, bronquite, otite média aguda e sinusite (Leibovitz et al., 2004; Murray et al., 2009). Entretanto, um aumento do isolamento desta variante da corrente sanguínea tem sido observado (Dworkin et al., 2007; Ladhani et al., 2010) e apesar de considerada menos virulenta, Hi NC também tem sido isolado de casos de meningite (Zanella et al., 2011; CDC, 2012).

1.3. Vacina

As vacinas compostas somente pelo polissacarídeo PRP, componente da cápsula de Hi, começaram a ser desenvolvidas no início da década de 1970 (Crisel et al., 1975). Devido a sua composição, essas vacinas conferiam pouca proteção para as crianças com idade inferior a 18 meses, faixa etária mais atingida pelas infecções invasivas causadas por Hi (Peltola et al., 1984; CDC, 2012) e também não induz o efeito indireto sobre o estado de portador (Takala et al., 1991).

Para melhorar a resposta imune da vacina polissacarídica, o antígeno capsular (PRP) de Hi foi conjugado a vários tipos de proteínas carreadoras como a proteína CRM197 de *Corynebacterium diphtheriae* (HbOC), a proteína da membrana externa de *Neisseria meningitidis* (PRP-OMP), o toxóide diftérico (PRP-D) e o toxóide tetânico (PRP-T).

A vacina PRP-D foi a primeira vacina conjugada a ser licenciada em 1987, mas tanto ela quanto a vacina HbOC não estão mais disponíveis nos Estados Unidos. Atualmente, as vacinas licenciadas para uso em crianças menores de seis semanas de idade são PRP-T e PRP-OMP (CDC, 2012), cujos esquemas vacinais são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema vacinal recomendado pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) contra Hib.

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

¹Proteína PRP de Hi conjugada ao toxóide tetânico.

²Proteína PRP de Hi conjugada à proteína de membrana externa de *N. meningitidis*.

Adaptado de CDC, 2012.

A Organização Mundial da Saúde considera a vacina contra Hib conjugada segura e eficaz, recomendando a sua introdução nos programas de imunização dos países (WHO, 2006). Porém alguns países ainda continuam sem esta vacinação, principalmente na Ásia e África (Figura 1).

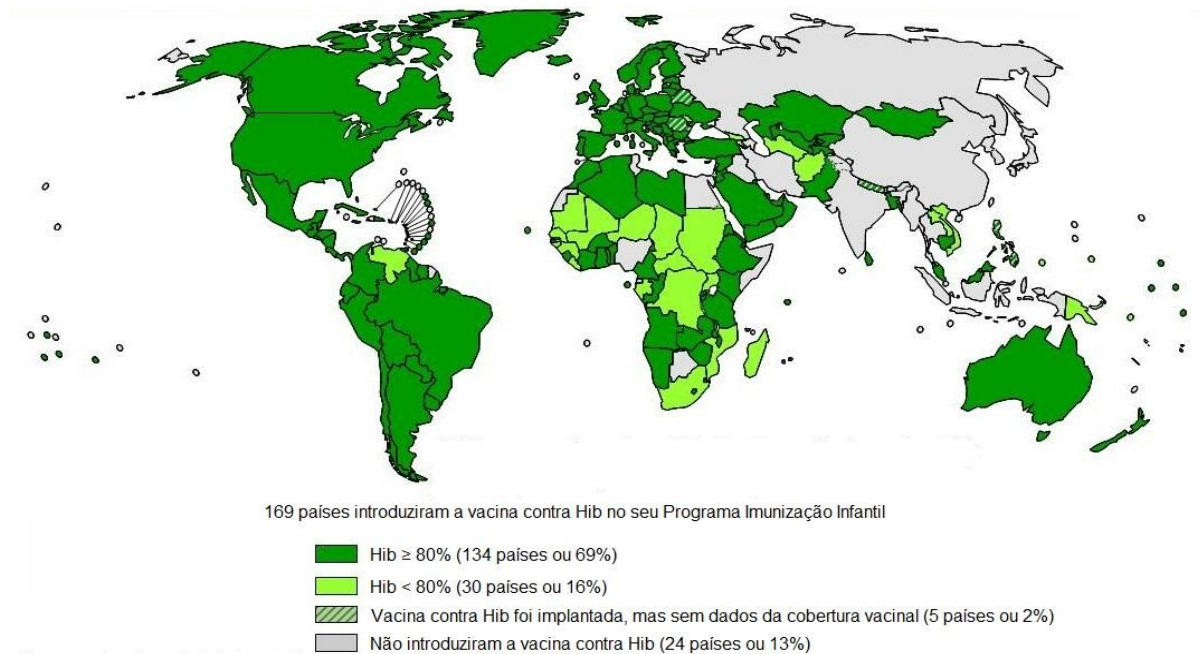


Figura 1. Países que implantaram a vacina contra Hib no Programa de Imunização Infantil e a sua cobertura vacinal em crianças no ano 2010.

Adaptado do site *World Health Organization* (WHO) (disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/Hib/en/index.html, acessado em 21 de maio de 2013).

No Brasil, a vacina Hib foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS) em 1999 optando-se por utilizar a vacina conjugada com a proteína CRM197 diftérica (HbOC) direcionada para a população mais suscetível, ou seja, crianças menores de 2 anos de idade com ampliação gradativa da faixa etária até 4 anos em 2002 (Ministério da Saúde, 2003; Carvalhanas et al., 2005).

Em 2002, a vacina tetravalente contra difteria, tétano, coqueluche e *Haemophilus influenzae* tipo b (DTP+Hib) foi introduzida no calendário vacinal do país, substituindo a anterior com esquema de dose única. Nesta vacina, o PRP é conjugado com o toxóide tetânico (PRP-T), sendo indicada para crianças menores de 1 ano de idade com o esquema de três doses (aos dois, quatro e seis meses de idade), sem a dose de reforço como recomendado pelo CDC (Secretaria de Estado da Saúde, 2002; Ministério da Saúde, 2003).

A partir de 2012, o Ministério da Saúde passou a utilizar no PNI a vacina pentavalente DTP+Hib+HB que é composta por toxóides de difteria e tétano, suspensão celular inativada de *Bordetella pertussis*, antígeno de superfície de hepatite B (HBs-Ag) e oligossacarídeos (PRP) de *Haemophilus influenzae* do tipo b conjugado com o toxóide tetânico (Ministério da Saúde, 2012).

No prazo de 4 a 5 anos, o Ministério da Saúde deverá transformar a vacina pentavalente em heptavalente com a introdução das vacinas inativadas de poliomielite e meningite C conjugada (Ministério da Saúde, 2012).

Paralelamente à implantação destas vacinas combinadas contra Hib, no ano de 2010, a vacina pneumocócica conjugada 10-valente foi introduzida no PNI. Esta vacina conjugada é composta por 10 sorotipos de *Streptococcus pneumoniae*, sendo 8 deles conjugados com a proteína D de *H. influenzae* (Prymula e Schuerman, 2009). Esta proteína é uma lipoproteína da membrana externa de 42 kDa altamente conservada tanto nos Hi capsulados quanto nos não capsulados (Song et al., 1995). O efeito protetor da proteína D foi demonstrado por Prymula et al. (2006), em um estudo duplo-cego randomizado que avaliou a eficácia da vacina pneumocócica 11-valente conjugada com a proteína D na prevenção da otite média aguda causada por *S. pneumoniae* e *H. influenzae* não capsulado. O resultado do estudo demonstrou uma redução dos casos de otite média aguda por Hi, assim como pelos sorotipos vacinais de *S. pneumoniae*.

Prymula et al. (2009) observaram uma diminuição da taxa de portadores de Hi e *S. pneumoniae* (sorotipos vacinais) após a administração da dose de reforço da vacina pneumocócica conjugada com a proteína D (Prymula et al., 2011).

No Brasil, estudos sobre o impacto da vacina pneumocócica 10-valente sobre o estado de portador e doenças invasivas para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* estão em andamento (Afonso et al., 2013; Cassiolato et al., 2013; Guerra et al., 2013; Azevedo et al., 2013).

1.4. Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006) as doenças invasivas como meningite e pneumonia causadas pelo Hib em crianças, ainda são consideradas um problema de saúde pública em diversas partes do mundo onde a vacinação não foi implantada em grande escala. Pelo menos 3 milhões de casos de infecções graves causadas por Hib e aproximadamente 386.000 mortes acontecem a cada ano. A maioria dos casos de morbidade e mortalidade ocorre nos países em desenvolvimento.

Antes da introdução da vacina, o Hib era considerado o principal sorotipo de Hi, responsável pelos casos de meningite bacteriana e outras doenças invasivas em crianças menores de cinco anos (Kelly et al., 2004; CDC, 2012).

Nos países que implantaram a vacina conjugada contra Hib em seus programas de imunização infantil foi observada uma grande redução na incidência de doenças invasivas causadas por este sorotipo em todas as faixas etárias, tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (Peltola et al., 2000; Adegbola et al., 2005; CDC, 2012).

Além da proteção direta da vacina, proporcionando uma grande diminuição de casos entre crianças imunizadas, também ocorreu uma redução de doenças invasivas em indivíduos não imunizados com idade igual ou superior a 15 anos (Sarangi et al., 2000). A proteção que ocorre nestes indivíduos não vacinados pode ser atribuído ao chamado efeito indireto, que ocorre devido à diminuição das taxas de portadores de Hib na nasofaringe e, por consequência, ocorre redução da circulação desta bactéria na população que poderia transmitir o microrganismo e causar doenças (Takala et al., 1991; Millar et al., 2000; Peltola et al., 2000). Com a diminuição da colonização pelo Hib na nasofaringe pode ocorrer um aumento da colonização pelos tipos não vacinais de Hi ou por outras espécies bacterianas (Takala et al., 1991; Millar et al., 2000; Laval et al., 2003).

A implantação da vacina conjugada de Hib ocasionou uma mudança importante no quadro epidemiológico de infecções causadas por Hi em diversos países, levando ao quase desaparecimento da doença invasiva por Hib que atualmente é dominada por cepas não capsuladas (NC) e por cepas de outros sorotipos que não o tipo b, principalmente os tipos a e f (Ribeiro et al., 2003; Bajanca et al., 2004; Tsang et al., 2006; Dworkin et al., 2007; McConnell et al., 2007; Bruce et al., 2008; Ladhani et al., 2008; Brown et al., 2009; Adam et al., 2010; Kastrin et al., 2010; Giufrè et al., 2011; Zanella et al., 2011; von Gottberg et al., 2012).

No Reino Unido, após a introdução da vacina conjugada contra Hib em 1992, houve uma redução superior a 90% dos casos de doenças invasivas causadas por este sorotipo (Heath et al., 2000). No entanto, após 1999 observou-se um aumento na incidência de doenças causadas por Hib principalmente em recém-nascidos (Ladhani et al., 2007; Ladhani et al., 2008). Este aumento pôde ser explicado pelo declínio maior do que o esperado da concentração de anticorpos após a imunização e pelo uso de uma vacina considerada menos imunogênica, a vacina acelular de *Bordetella pertussis* entre os anos de 2000 a 2001 (McVernon et al., 2003). Em 2002, a vacina de Hib contendo a célula total de

B. pertussis foi reintroduzida no Reino Unido o que resultou novamente na queda das taxas de Hib, em índices semelhantes ao período da ressurgência ou re-emergência da doença (Ladhani et al., 2008).

Nos Estados Unidos, o Hib era o agente mais comumente responsável por doenças invasivas com uma incidência anual de 67 a 129 casos para cada 100.000 crianças menores de cinco anos de idade (López et al., 2000). Após a introdução da vacina na década de 1980 houve uma diminuição de mais de 99% no número de casos (CDC, 2012).

A vacina contra Hib reduziu a incidência de doenças causadas por este sorotipo em crianças vacinadas no Canadá (Scheifele et al., 2008). Durante o período de 1996 a 2001, 60% das doenças invasivas causadas por Hi em crianças, ocorreram principalmente pela variante NC (não capsulada) (McConnell et al., 2007). Em outros estudos, observou-se que os casos de doenças invasivas ocorreram principalmente por Hi NC e pelo sorotipo a e sorotipo f (Tsang et al., 2006; Bruce et al., 2008; Brown et al., 2009).

Em Gâmbia, após cinco anos da introdução da vacina Hib, houve um declínio da incidência anual de meningite causada por Hib em crianças menores que 5 anos de idade, passando de 60 casos/100.000 habitantes para zero. Durante o mesmo período, a prevalência de Hib na nasofaringe de crianças entre 1 a 2 anos diminuiu de 12% para 0,25% (WHO, 2006).

No Uruguai, a introdução da vacina Hib ocorreu em 1994 e também foi observado um declínio da incidência de meningite por Hib de 15,6 para 0,03 casos/100.000 habitantes em 2 anos após a introdução desta vacina (Ruocco et al., 1999).

Antes da introdução da vacina no Brasil, no período entre 1990 e 1999, a incidência anual média de meningite bacteriana causada pelo Hib em menores de

1 ano de idade foi de 22,3 casos/100.000 habitantes e em crianças menores de 4 anos foi de 8,8 casos/100.000 habitantes. A letalidade nestes grupos era de 19,9% e 17,1%, respectivamente (Almeida et al., 2005).

A manutenção da alta cobertura vacinal (95%) no Brasil permitiu a diminuição das doenças causadas pelo sorotipo b de Hi após a implantação da vacina contra Hib (Miranzi et al., 2007). A incidência anual média de meningites bacterianas causadas por Hib, no período de 2000 a 2012, em menores de 1 ano de idade foi de 3,1 casos/100.000 habitantes e em crianças menores de 4 anos foi de 0,7 casos/100.000 habitantes (CVE, 2013).

1.5. Estudo de portador

Em regiões onde a vacina Hib não foi introduzida, os estudos de prevalência permitem desenhar uma linha de base local no período pré-vacinal, possibilitando avaliar o impacto desta no período pós-vacinal. Em regiões onde a vacina Hib foi introduzida, como é o caso do Brasil, os estudos de portador permitem a caracterização das cepas circulantes na população. Portanto, a identificação correta de Hi é de fundamental importância para estimar com acurácia o efeito da vacina ao longo dos anos.

Estudos apontam uma grande variabilidade na taxa de portador de Hi entre 15,6% e 82% em crianças jovens saudáveis, considerados portadores assintomáticos (Dabernat et al., 2003; Jain et al., 2005; Smith-Vaughan et al., 2006; Silva et al., 2006; Oguzkaya-Artan et al., 2007; Prymula et al., 2011; Carvalho et al., 2011; Hare et al., 2012; Oduola et al., 2013; van den Bergh et al., 2013).

Dentre as oito espécies de *Haemophilus* que podem ser encontradas na nasofaringe humana, *H. influenzae* e *H. haemolyticus* (Hhae) são as mais

prevalentes (Murphy et al., 2007). Ambas são dependentes do fator X (hemina) e fator V (NAD) para o crescimento, o que as diferenciam das outras espécies do gênero, mas não entre si. A presença da atividade hemolítica do Hhae, quando semeados em ágar sangue de cavalo, é uma característica importante para diferenciá-lo, porém esta atividade pode não ser observada em algumas cepas e a espécie pode ser erroneamente identificada pelos métodos fenotípicos como Hi (Murphy et al., 2007; McCrea et al., 2008; Nørskov-Lauritsen et al., 2009a; Theodore et al., 2012). Portanto, diferenciar estas duas espécies é um grande desafio, uma vez que elas são fenotípica e filogeneticamente relacionadas.

O uso de técnicas moleculares tem auxiliado nos estudos de portador, principalmente por apresentarem alta sensibilidade e especificidade para a detecção do agente etiológico. A utilização destas técnicas tem contribuído para uma identificação mais acurada do Hi em amostras de nasofaringe.

Recentemente, estudos têm sido publicados utilizando técnicas moleculares e diferentes marcadores genéticos para a detecção do Hi neste tipo de amostra. Estes estudos revelaram que 12 a 27% dos isolados de nasofaringe de crianças saudáveis, inicialmente identificadas por métodos fenotípicos como Hi, são na verdade Hhae (Murphy et al., 2007; Hare et al., 2012).

1.6. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial de Hi pode ser realizado pelos métodos fenotípicos, imunológicos e moleculares.

1.6.1. Métodos fenotípicos

1.6.1.1. Cultura bacteriana

A cultura bacteriana é considerada uma técnica *gold standard* (padrão-ouro) para a detecção de bactérias patogênicas em material clínico. O isolamento da bactéria de diferentes sítios permite a caracterização total do agente etiológico e é de fundamental importância para o diagnóstico e vigilância epidemiológica da doença.

Apesar disso, esta técnica clássica demanda um tempo maior para a total identificação da bactéria e pode apresentar baixa positividade caso as condições de coleta, transporte, armazenamento e cultivo não sejam adequadas ou devido à administração de antibióticos antes da coleta do material clínico (Tunkel et al., 2004). A sensibilidade da técnica pode variar entre 70% a 90% (Wu et al., 2013).

Para o diagnóstico de meningite bacteriana por Hi, recomenda-se que o material clínico seja semeado em ágar chocolate contendo 10% sangue de cavalo ou coelho. Para estudos de portador de Hi, recomenda-se que a secreção de nasofaringe seja semeada em ágar chocolate contendo 10% sangue de cavalo ou coelho acrescido do antibiótico bacitracina. Como a microbiota da nasofaringe é composta de diferentes espécies bacterianas, o uso deste antibiótico é necessário para favorecer o crescimento de Hi. (Ledeboer e Doern, 2011).

Em ambos os casos, para o diagnóstico de meningite bacteriana e em estudos de portador, os meios de cultura já semeados devem ser incubados à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de 5 a 10% de CO_2 por 18-24 horas. Estas condições favorecem o crescimento de Hi. Em caso de cultura positiva, os isolados bacterianos podem ser identificados fenotipicamente através de testes bioquímicos convencionais e teste da dependência dos fatores V e X ou prova do satelitismo (Ledeboer e Doern, 2011).

Os testes bioquímicos são realizados para a identificação das espécies do gênero *Haemophilus* e as principais provas realizadas são: fermentação de carboidratos, detecção de hemólise em ágar sangue de cavalo, prova da catalase e oxidase e diferenciação de biotipos (Ledebøer e Doern, 2011).

1.6.1.2. Bacterioscopia

A bacterioscopia do líquido cefalorraquidiano (LCR) é uma técnica amplamente utilizada para o diagnóstico da meningite bacteriana. As principais vantagens desta técnica são a rapidez na liberação do resultado e o baixo custo; entretanto a principal dificuldade desta metodologia é a ausência de uma referência padrão (Wu et al., 2013).

1.6.2. Métodos imunológicos

1.6.2.1. Contraimunoeletroforese (CIE)

A contraimunoeletroforese (CIE) é uma técnica utilizada para o diagnóstico indireto de meningites bacterianas e é baseada na detecção de antígenos polissacarídicos da cápsula da bactéria presente na amostra clínica através do uso de antissoros produzidos em cavalos ou carneiros. A técnica emprega antissoros policlonais e pode ocorrer reatividade cruzada com diferentes espécies bacterianas que apresentam composição capsular semelhante ao Hib e com alguns sorotipos de *S. pneumoniae* (Fukasawa et al., 2010). No estudo de Fukasawa et al. (2010), 57% (26/46) das amostras apresentaram resultado falso positivo pela CIE.

1.6.2.2. Aglutinação pelo látex

Esta reação consiste na reação antígeno-anticorpo. Microesferas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos permitem detectar o antígeno bacteriano no líquido, soro e outros fluidos biológicos. Pode ocorrer resultado falso-positivo em indivíduos portadores do fator reumatóide ou em reações cruzadas com outros agentes. A sensibilidade do teste de látex é da ordem de 90% para Hib e a especificidade da reação é de 97%. No entanto só existe teste de látex para detecção de Hib (Ministério da Saúde, 2009).

1.6.3. Métodos moleculares

A utilização de técnicas modernas que utilizam os recursos de biologia molecular para diagnóstico bacteriológico é fundamental. Diversas técnicas moleculares são utilizadas e aqui serão citadas as duas utilizadas neste estudo, a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Real-Time Polymerase Chain Reaction* - PCR-TR). Estas técnicas moleculares possuem rapidez na liberação do resultado e maior sensibilidade e especificidade quando comparada com a cultura, pois detectam o DNA bacteriano sem a necessidade de se obter um crescimento bacteriano prévio.

1.6.3.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR consiste em amplificar *in vitro* sequências específicas de DNA, as sequências alvo de um gene. O princípio da técnica é baseado na replicação natural do DNA e pode ser dividido em três etapas:

- a) Desnaturação: quebra das pontes de hidrogênio que unem as fitas de DNA;
- b) Hibridização: ligação dos iniciadores (*primers*) na região alvo da fita de DNA;
- c) Extensão: síntese da fita de DNA por uma enzima termoestável, Taq Polimerase.

Após o término da PCR, a detecção dos produtos amplificados é realizada por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida corado com brometo de etídeo ou com outra substância que intercale entre as fitas de DNA, emita fluorescência e possa ser visualizada sob a luz ultravioleta (UV).

1.6.3.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR)

A PCR-TR identifica a sequência alvo com maior sensibilidade e especificidade, e em menor tempo de reação. Nesta técnica, a amplificação e a detecção são realizadas simultaneamente em um sistema fechado, diminuindo a possibilidade de contaminação.

O procedimento segue o princípio geral de uma PCR com três fases características: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária ou platô (Kubista et al., 2006). Estas fases podem ser observadas na Figura 2. A melhor fase para se estudar a reação é a fase exponencial, onde se prevê que esta tenha uma eficiência de aproximadamente 100%.

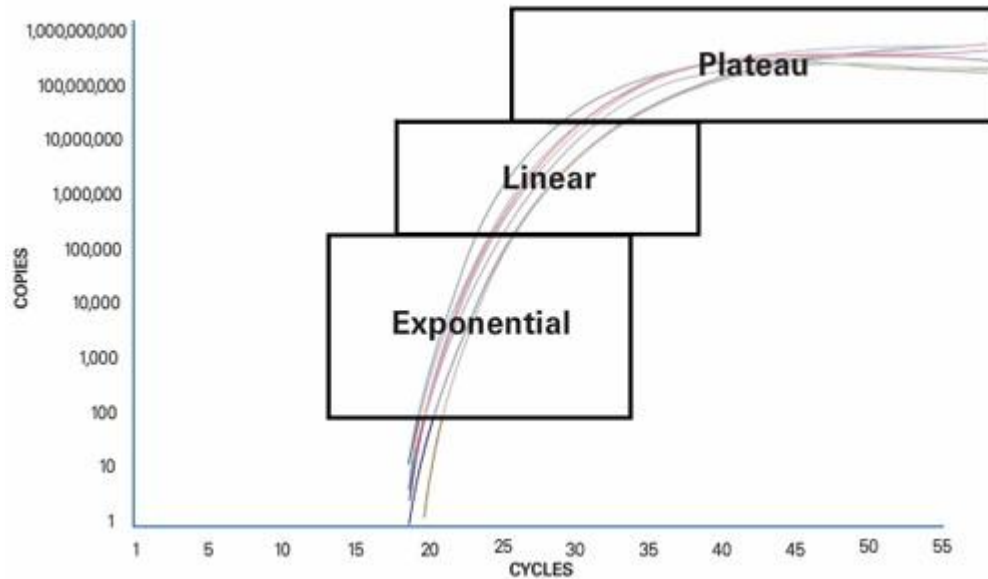


Figura 2. Gráfico com as fases características da PCR-TR.

Fonte: Applied Biosystems (disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html>, acessado em 21 de maio de 2013).

Esta técnica permite o monitoramento da amplificação do DNA alvo em tempo real e a realização da quantificação destes ácidos nucleicos. A técnica utiliza, além dos iniciadores específicos para a região a ser amplificada, um terceiro oligonucleotídeo na reação conhecido como sonda (*probe*).

A PCR-TR requer uma plataforma de instrumentação contendo um termociclador com sistema óptico para a excitação de fluorescência e detecção da sua emissão, e um computador com um software para a aquisição dos dados que serão analisados em forma de curvas de amplificação e de fluorescência.

Existe um ciclo onde a reação vai atingir o limiar da fase exponencial, onde o nível de fluorescência vai exceder um limiar definido pelo software do aparelho de PCR-TR. Este ponto corresponde ao *cycle threshold* (Ct), ou seja, o

número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável (Kubista et al., 2006) (Figura 3). Há uma relação inversa entre o número de ciclos e o número de cópias de DNA, quanto menor o número de ciclos necessários para se detectar fluorescência, maior é o número de moléculas iniciais de DNA na reação.

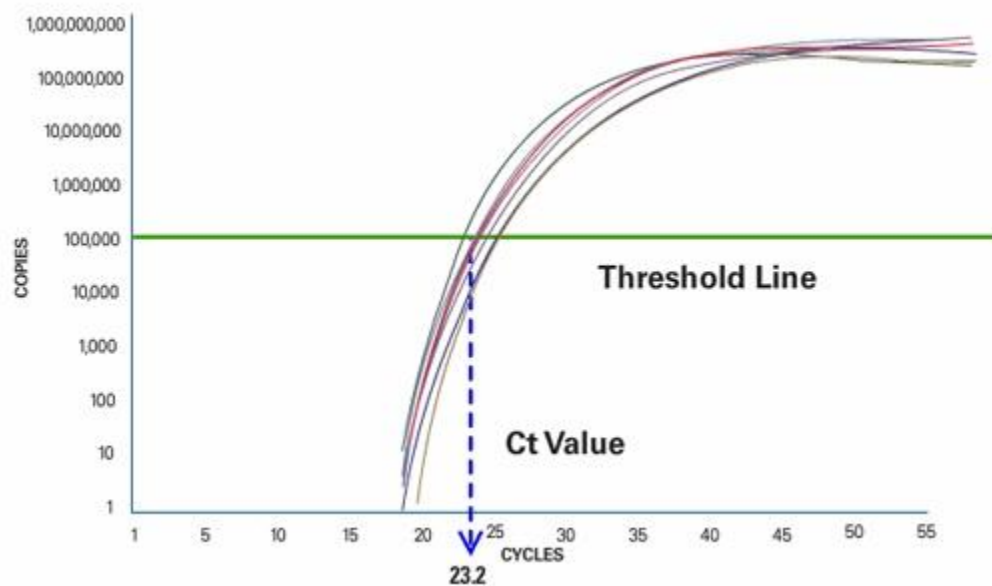


Figura 3. Representação do ciclo de uma reação que atinge o limiar da fase exponencial e sua fluorescência é detectada pelo aparelho.

Fonte: Applied Biosystems (disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html>, acessado em 21 de maio de 2013).

1.7. Genes alvos

Diferentes ensaios como a PCR convencional e PCR-TR foram desenvolvidos para o diagnóstico de Hi, principalmente em casos de doenças invasivas. Estes ensaios utilizaram diferentes genes alvo específicos para Hi (Nørskov-Lauritsen et al., 2009a; Nørskov-Lauritsen, 2009b; Binks et al., 2012),

como os genes: *bexA*, responsável pela codificação de uma proteína envolvida no transporte da cápsula polissacarídica através da membrana externa de Hi (van Ketel et al., 1990; Corless et al., 2001; Marty et al., 2004); *IgtC*, que codifica o lipopolissacarídeo (LPS) (McCrea et al., 2008); *iga*, IgA protease (Nørskov-Lauritsen et al., 2009a); *licA* codifica uma fosforilcolina kinase de fase variável (Weiser et al., 1997); sequenciamento do 16S rRNA (Murphy et al., 2007); genes que codificam duas proteínas da membrana externa, *ompP6* (Abdeldaim et al., 2009) e *ompP2* (Hobson et al., 1995; Maaroufi et al., 2007); gene *fucK*, uma fucose kinase (Nørskov-Lauritsen, 2009b, Theodore et al., 2012); *hpd* que codifica a proteína D que é uma lipoproteína da membrana externa de Hi (Wang et al., 2011).

O gene *hpd* é altamente conservado em Hi e está presente na variante capsulada e não capsulada (Song et al., 1995). Este gene é responsável por codificar a proteína D, uma lipoproteína da membrana externa de Hi de 42 kDa (Jason et al., 1992).

Wang et al. (2011) desenvolveram dois ensaios para identificar Hi por PCR-TR utilizando dois diferentes pares de iniciadores específicos para a amplificação de duas regiões do gene *hpd*, *hpd#1* e *hpd#3*. O ensaio utilizando o marcador *hpd#3* obteve o melhor resultado com a detecção de 99% dos isolados bacterianos e apresentou uma sensibilidade de 95% (95% IC: 74-100%) e especificidade de 91% (95% IC: 83-96%).

Complementando a sua pesquisa, Wang et al. (2012) publicaram a validação de um ensaio *multiplex* de PCR-TR para a detecção simultânea dos principais agentes causadores de meningite bacteriana, *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* utilizando os genes alvos: *ctrA*, *hpd* e *lytA*, respectivamente. A sensibilidade e especificidade deste ensaio *multiplex* foram obtidas utilizando amostras provenientes de lavado respiratório e swab de orofaringe de pacientes com infecção respiratória. Os ensaios *multiplex* e

singleplex para a detecção do gene *hpd* apresentaram sensibilidade de 84,4% (95% IC: 79,3-88,7%) e a especificidade variou entre 89,3% (95% IC: 84,7-92,9%) e 89,7% (95% IC: 85,2-93,2%), respectivamente.

O gene *fucK* também é altamente conservado em Hi, está presente na variante capsulada e não capsulada e é responsável por codificar uma enzima denominada fuculose kinase. Por ser um gene constitutivo de Hi, ele é um dos 7 genes alvo da técnica molecular de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e é considerado um marcador molecular importante para discriminar Hi de outras espécies do gênero *Haemophilus* (Nørskov-Lauritsen, 2009b).

Theodore et al. (2012) avaliaram a detecção destes 2 genes (*hpd* e *fucK*) pela PCR para diferenciar Hi de Hhae. O estudo avaliou 48 isolados bacterianos de Hi e 44 de Hhae por duas técnicas e por dois marcadores moleculares. A PCR-TR foi utilizada para detectar o gene *hpd* e a PCR convencional para detectar o gene *fucK*. Os resultados indicaram que a positividade para ambos os genes era um forte indicativo de que a bactéria pertencia à espécie *H. influenzae*. A análise conjunta dos genes para identificação de Hi apresentou uma sensibilidade de 92,5% e especificidade de 97,7%.

Baseado nos dados recentemente publicados estas duas técnicas PCR-TR e PCR convencional e os dois marcadores moleculares para os genes *hpd* e *fucK* foram selecionados para o desenvolvimento do presente estudo.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a acurácia da PCR-TR em detectar *Haemophilus influenzae* na secreção de nasofaringe de crianças saudáveis vacinadas contra Hib comparando-a com a cultura.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a PCR-TR, utilizando as sequências de hpd#3 como marcador molecular para o gene *hpd*, em amostras de secreção de nasofaringe e em cultura bacteriana para detecção de *H. influenzae*.
2. Avaliar a PCR convencional, utilizando sequências de iniciadores como marcador molecular para o gene *fucK*, em amostras de secreção de nasofaringe e em cultura bacteriana para detecção de *H. influenzae*.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem

Em 2010, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) realizou um estudo de base populacional com o objetivo de determinar a taxa de portador para Hib em crianças saudáveis da cidade de São Paulo, após 10 anos da introdução da vacina conjugada Hib no programa de imunização. Para isso, foram coletadas 2.558 amostras de secreção da nasofaringe de crianças pertencentes a duas faixas etárias, 1-2 anos e 4-5 anos de idade, junho e agosto de 2010. As coletas foram realizadas em 16 salas de vacinas do município de São Paulo. As amostras foram coletadas em meio de transporte STGG (*skim milk-tryptone-glucose-glycerine*) e mantidas em freezer -70°C (O'Brien et al., 2001).

O estudo foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz em 06/01/2009 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa COEP da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo em 17 de Abril de 2009 sob o número Of.COEP/132/009.

Das 2.558 amostras coletadas, 410 foram selecionadas aleatoriamente utilizando o Sistema de Sorteio em Excel versão 2010.11 para a avaliação da PCR-TR em detectar *H. influenzae*. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados da cultura bacteriológica, previamente realizada pelo Núcleo de Meningites e Pneumonias e Infecções Pneumocócicas (NMPI) do IAL.

Dentre as 410 amostras estudadas, 166 apresentaram resultado positivo para Hi pela cultura e destes, 79 (48%) isolados foram selecionados aleatoriamente pelo Sistema de Sorteio em Excel versão 2010.11 para confirmação da identificação de Hi utilizando os marcadores moleculares para os genes *hpd* e *fucK*.

O Anexo 1 apresenta o algoritmo utilizado neste estudo.

3.2. Extração de DNA

3.2.1. Extração de DNA a partir do STGG

A extração de DNA foi realizada a partir do STGG empregando-se o kit comercial MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) da Roche, conforme orientações do fabricante. A extração foi realizada de forma semi-automatizada utilizando o MagNA Pure LC 2.0 Instruments da Roche.

Na etapa de pré-extração, as amostras congeladas contendo o *swab* com a secreção da nasofaringe foram descongeladas e homogeneizadas (Agitador Vortex - Labnet). Um volume de 200 μ L foi retirado e dispensado em um microtubo de 1,5 mL estéril e 20 μ L da Proteinase K (Roche) foram acrescentados cuidadosamente. A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos à 65°C em banho seco (Fischer Scientific) para a digestão de proteínas.

Após esta etapa, a extração de DNA foi realizada no aparelho MagNA Pure LC 2.0 Instruments da Roche. Para a extração de DNA de 32 amostras de nasofaringe, foram utilizados os reagentes que acompanham o kit de extração nos volumes exatos, conforme apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Volume dos reagentes utilizados para a extração de DNA de 32 amostras no aparelho MagNA Pure LC 2.0 Instruments da Roche.

Reagentes	Volume	Função
<i>Wash Buffer I</i>	31,2 mL	Remover inibidores da PCR
<i>Wash Buffer II</i>	32,6 mL	Remover sais, proteínas, etc
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	10,8 mL	Lise celular e ligação do DNA
<i>Proteinase K</i>	4,2 mL	Digestão de proteínas
<i>Magnetic Glass Particles (MGPs)</i>	5,8 mL	Ligação do DNA nas partículas
<i>Elution Buffer</i>	9,8 mL	Eluir o DNA puro

Adaptado do manual MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) da Roche (disponível no site da roche https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/03264785001_en_07.pdf, acessado em 20 de maio de 2013).

A extração de DNA realizada neste aparelho é baseada na tecnologia de *beads* (partículas) magnéticos. As amostras são lisadas pela incubação com um tampão especial, contendo uma substância que denatura nucleases e proteinase K. As partículas magnéticas (*Magnetic Glass Particles* - MGPs) são adicionadas e o DNA se liga na superfície destas partículas. Outras substâncias são removidas através de diversas lavagens e o DNA purificado é eluído com um tampão com baixo teor de sal. A Figura 4 mostra os passos da extração de DNA pelo kit da Roche.

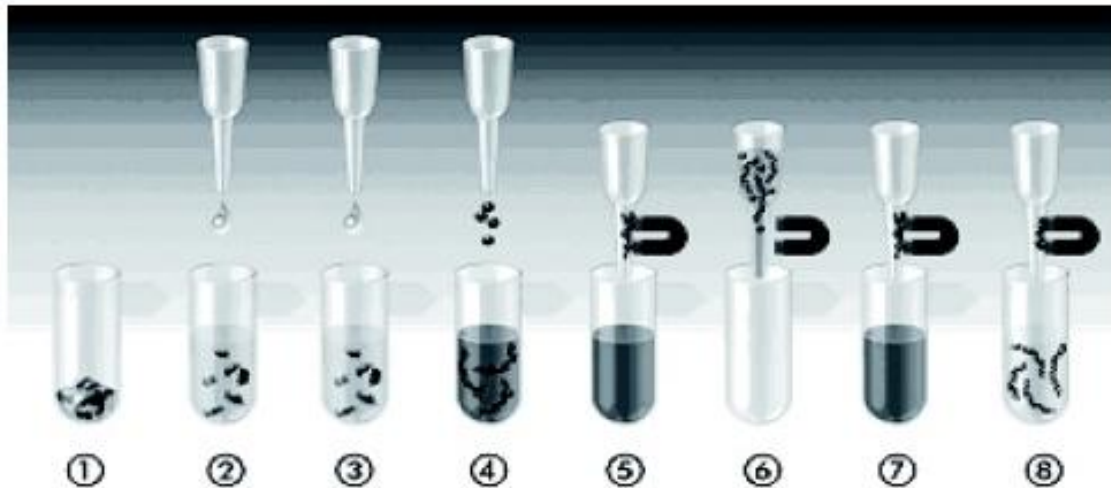


Figura 4. Passos da extração de DNA pelo MagNA Pure LC DNA Isolation. 1) A amostra é colocada no poço do cartucho; 2) O reagente *Lysis/Binding Buffer* é adicionado na amostra resultando na completa lise celular, liberação do ácido nucléico e denaturação de nucleases; 3) A proteinase K é adicionada na amostra e as proteínas são digeridas; 4) O DNA se liga na superfície de sílica dos MGPs adicionados; 5) MGPs com o DNA ligado na sua superfície são magneticamente separados das substâncias residuais da lise celular; 6) MGPs com o DNA ligado na sua superfície são lavados repetidamente com *Wash Buffer* (tampão de lavagem) para remover outras substâncias como proteínas, membrana celular, inibidores de PCR; 7) MGPs com o DNA ligado na superfície são magneticamente separados do tampão de lavagem; 8) O DNA purificado é eluído dos MGPs e dispensado no poço do cartucho específico para eluído de DNA.

Fonte: manual MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) da Roche (disponível no site da roche: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/03264785001_en_07.pdf, acessado em 20 de maio de 2013).

Como controle negativo do processo de extração foi utilizado água ultrapura estéril (Qiagen Rnase-free water), a qual foi submetida a todas as etapas da extração juntamente com as amostras. O DNA extraído foi transferido para outro microtubo, devidamente identificado e armazenado a -20°C até o seu uso.

3.2.2. Extração de DNA do isolado bacteriano

As extrações de DNA da cultura bacteriana foram realizadas a partir de uma suspensão bacteriana preparada com 3 a 4 colônias de uma cultura recente em 120 µL de água destilada estéril, em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. As suspensões foram aquecidas até 100°C por 10 minutos em banho-maria à seco (Fisher Scientific), centrifugadas a 1.300 rpm por 3 a 5 minutos e 80 µL dos sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos, devidamente identificados e armazenados a -20°C até o momento do uso.

3.3. PCR-TR

A detecção do gene *hpd* no DNA das amostras de secreção de nasofaringe e dos isolados bacterianos foi realizada pela PCR-TR, segundo protocolo estabelecido por Wang et al. (2011) utilizando os iniciadores *hpd*#3-F e *hpd*#3-R (Sigma-Aldrich) e a sonda *hpd*-Pb (Sigma-Aldrich) como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências dos marcadores moleculares utilizados na PCR-TR para a detecção do gene *hpd*.

Gene Alvo	Iniciadores e Sondas	Sequência de nucleotídeos 5' – 3'	Concentração Final (nM)	Referência
<i>hpd</i>	hpdF822	GGT TAA ATA TGC CGA TGG TGT TG	100	Wang et al., 2011
	hpdR952	TGC ATC TTT ACG CAC GGT GTA	300	
	hpdPb896i ¹	FAM-TTG TGT ACA CTC CGT "T" GGT AAA AGA ACT TGC AC-SPC6	100	

¹Quencher BHQ1 deslocado para uma posição mais interna da probe, designada como "T"

As reações foram compostas de TaqMan[®] Master Mix 1X concentrado (Universal PCR Master Mix – Applied Biosystems), 100 nM do iniciador hpd-F (Sigma-Aldrich), 300 nM do iniciador hpd-R (Sigma-Aldrich), 100 nM da sonda hpd-Pb (Sigma-Aldrich), 2 µL de DNA e água ultrapura estéril (Qiagen RNase-free water) para um volume final de 25 µL.

Os ensaios para a detecção de *hpd* foram realizados no aparelho 7500 ABI Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), empregando as seguintes condições: 1 ciclo de 2 min a 50°C para a eliminação de contaminantes, 1 ciclo de 10 min a 95°C para a ativação da enzima, 50 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C para a amplificação. A coleta dos dados foi obtida na fase de extensão a 60°C. A análise dos resultados das reações foi realizada pelo próprio software da plataforma do equipamento 7500 da Applied Biosystems pela detecção e quantificação da fluorescência emitida a cada ciclo na reação que aumenta em proporção direta com a quantidade do produto amplificado (valor de Ct).

As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram valores de Ct menores ou iguais a 35, negativas quando não apresentaram valores de Ct ou quando os valores foram maiores que 40 e inconclusivas quando os valores de Ct estavam entre 36 e 40. Todas as amostras consideradas inconclusivas foram repetidas em triplicata e foram diluídas a 1/5 e 1/10 em água ultrapura estéril (Qiagen RNase-free water). Permanecendo o resultado inconclusivo, foi feita uma nova extração de DNA e as amostras foram retestadas, sendo consideradas

negativas caso os Cts permanecessem entre 36 e 40 como previamente estabelecido por Wang et al. (2011).

3.3.1. *rnaseP*

O gene *rnaseP* codifica a ribonuclease humana e a sua detecção é utilizada como controle da ausência de inibidores da PCR-TR visando monitorar a eficiência da extração de DNA do material clínico (Osada et al., 2005).

A detecção do gene *rnaseP* nas secreções de nasofaringe foi realizada utilizando os iniciadores *rnaseP*-F e *rnaseP*-R (Sigma-Aldrich) e a sonda *rnaseP*-Pb (Sigma-Aldrich). A sequência de nucleotídeos e a concentração ótima de cada oligonucleotídeo utilizado no estudo estão apresentadas na Tabela 4. A sonda *rnaseP*-Pb foi marcada na extremidade 5' com 6-carboxyfluorescein (FAM) e na posição 3' com Black Hole Quencher (BHQ1).

Tabela 4. Sequências dos iniciadores e da sonda utilizada na PCR-TR para a detecção do gene *rnaseP*.

Gene Alvo	Iniciadores e Sondas	Sequência de nucleotídeos 5' – 3'	Concentração Final (nM)	Referência
<i>rnaseP</i>	<i>rnaseP</i> -F	CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG	400	CDC, 2011a
	<i>rnaseP</i> -R	TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG	400	
	<i>rnaseP</i> -Pb	FAM-CCC CAG TCT CTG TCA GCA CTC CCT TC-BHQ1	100	

Em cada reação para amplificação do gene *rnaseP* foi utilizada uma solução composta por TaqMan[®] Master Mix 1X concentrado (Universal PCR Master Mix – Applied Biosystems), 400 nM do iniciador *rnaseP*-F (Sigma-Aldrich), 400 nM do iniciador *rnaseP*-R (Sigma-Aldrich), 100 nM da sonda *rnaseP*-Pb (Sigma-Aldrich), 2,5 µL do eluído de DNA e água ultrapura estéril (Qiagen RNase-

free water) para um volume final de 25 μ L.

O ensaio foi realizado no aparelho 7500 ABI Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), seguindo o seguinte protocolo: 1 ciclo de 2 min a 50°C para a eliminação de contaminantes, 1 ciclo de 10 min a 95°C para a ativação da enzima, 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C para a amplificação do gene *maseP*.

A coleta dos dados foi obtida na fase de extensão a 60°C. A análise dos resultados das reações foi realizada pelo próprio software da plataforma do equipamento 7500 da Applied Biosystems pela detecção e quantificação da fluorescência emitida a cada ciclo na reação que aumenta em proporção direta com a quantidade do produto amplificado (valor de Ct).

As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram valores de Ct menores ou iguais a 35, negativas quando não apresentaram valores de Ct ou quando os valores foram maiores que 40 e inconclusivas quando os valores de Ct estavam entre 36 e 40 conforme o CDC (2011b).

3.3.2. Controles da reação de PCR-TR

Diferentes controles negativos e positivos foram utilizados em todas as etapas para detectar possíveis contaminações durante a PCR-TR e para verificar a eficácia dos reagentes utilizados.

Foram utilizados três controles negativos. O primeiro controle negativo foi colocado durante a extração de DNA, onde foi utilizada água ultrapura estéril (Qiagen RNase-free water) que passou por todas as etapas da extração juntamente com as amostras. Ele é importante para detectar uma possível contaminação durante o processo da extração de DNA. O segundo controle foi

preparado na área de preparação das soluções da reação, no qual foi utilizado a própria mistura de reagentes necessários para a realização da PCR-TR, um controle importante para verificar uma possível contaminação dos reagentes durante o seu preparo. O terceiro controle foi realizado na área de adição de DNA das amostras, utilizando a mistura de reagentes da PCR-TR com a ausência de DNA que ficou aberto durante todo o processo de inoculação do DNA das amostras na placa, sendo importante para verificar possíveis contaminações durante o processo de adição de DNA.

Para o controle positivo das reações foi utilizado o DNA extraído da cepa de referência ATCC (*American Type Culture Collection*), *Haemophilus influenzae* ATCC 9007 (Hic). A partir desta cepa foi preparada uma suspensão bacteriana com turbidez na escala 1 de McFarland, em PBS (solução de salina-fostada tamponada) 0,001M pH 7,2 com azida sódica 0,02% e inativada a 100°C por 10 minutos. A suspensão foi diluída a 1/10.000.

3.3.3. Limite mínimo de detecção (LMD) do gene alvo *hpd*

O LMD é definido como sendo a menor quantidade ou números de cópia de DNA que possibilita a detecção do gene alvo pelo ensaio. Para a determinação do LMD foi realizada uma extração e purificação do DNA da cepa Hic 9007 utilizando o QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

Foi realizada uma suspensão bacteriana com turbidez correspondente a escala 1 de McFarland e um volume de 200 µL foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. Cuidadosamente, 20 µL de proteinase K e 200 µL do *Buffer AL* foram adicionados e a mistura foi homogeneizada e incubada a 56°C por 10 minutos em banho-maria seco (Fisher Scientific) para a lise celular. Depois deste período, 200 µL de etanol (96-100%) foram adicionados à mistura e homogeneizados. Cuidadosamente, toda esta mistura foi transferida para uma mini coluna de 2 mL

(QIAamp Mini spin column) e centrifugada por 1 minuto a 8.000 rpm, etapa na qual o DNA se liga ao filtro da coluna. O filtrado foi descartado, 500 μL do *Buffer AW1* foi adicionado na coluna e centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm. Novamente, o filtrado foi descartado, 500 μL do *Buffer AW2* foi adicionado na coluna e centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm. O filtrado foi descartado novamente e 200 μL do *Buffer AE* foi adicionado à coluna, incubado a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Obtendo-se assim o DNA purificado (Manual QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, disponível em: <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/QIAamp-DNA-Mini-Kit#resources>, acessado em 20 de maio de 2013).

A concentração do DNA foi determinada utilizando o equipamento NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), a 260 nm de absorvância, obteve-se um valor médio de 36,5 ng/ μL .

O DNA purificado foi diluído em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a uma concentração de 10 ng/ μL . A partir desta concentração, foi realizada uma diluição seriada em tampão TE no fator 10 até a diluição de 10^{-8} ou 0,1 fg/ μL como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Diluição do DNA da cepa de *H. influenzae* ATCC 9007 para a determinação do LMD para o gene *hpd*.

Diluição	Valor	Unidade	Pipetar	Tampão TE	Diluição Final	Valor	Unidade	Adicionar na Reação	Quantidade Final		
									Valor	Unidade	
					Puro	10	ng/ μL	2 μL	20	ng	
10^{-1}	10	ng/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-1}	1	ng/ μL	2 μL	2	ng
10^{-2}	1	ng/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-2}	100	pg/ μL	2 μL	200	pg
10^{-3}	100	pg/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-3}	10	pg/ μL	2 μL	20	pg
10^{-4}	10	pg/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-4}	1	pg/ μL	2 μL	2	pg
10^{-5}	1	pg/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-5}	100	fg/ μL	2 μL	200	fg
10^{-6}	100	fg/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-6}	10	fg/ μL	2 μL	20	fg
10^{-7}	10	fg/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-7}	1	fg/ μL	2 μL	2	fg
10^{-8}	1	fg/ μL	10 μL	+	90 μL	10^{-8}	0,1	fg/ μL	2 μL	0,2	fg

3.4. PCR convencional (*fucK*)

A PCR convencional para a detecção do gene *fucK* foi realizada utilizando os iniciadores *fucK*-F e *fucK*-R (Meats et al., 2003) como mostra a Tabela 6.

Tabela 6. Sequências dos iniciadores do gene *fucK* utilizados para PCR convencional.

Gene alvo	Iniciadores	Sequência de nucleotídeos 5' – 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>fucK</i>	<i>fucK</i> -F	ACC ACT TTC GGC GTG GAT GG	345	Meats et al., 2003
	<i>fucK</i> -R	AAG ATT TCC CAG GTG CCA GA		

Para a detecção do gene *fucK* em amostras de secreção de nasofaringe e nos isolados bacterianos pela PCR convencional, cada reação foi composta de 1X de tampão de reação com MgCl₂ (1,5 mM) (Boehringer Mannheim), 200 µM de cada deoxinucleotideo trifosfato (dNTP) (Invitrogen), 0,4 µM de cada iniciador (*fucK*-F e *fucK*-R) (Eurofins), 0,5 U/µL de *Taq* polimerase (EasyPath), 5,0 µL do DNA extraído da secreção de nasofaringe em STGG ou 1,0 µL de DNA extraído do isolado bacteriano e água ultrapura estéril (Applied Biosystems Nuclease-free) para um volume final de 25 µL. As amostras, os controles positivos e negativos foram colocados no termociclador (Veriti Thermal Cycler - Applied Biosystems) e as condições utilizadas foram: 1 ciclo de 4 min a 95°C para a desnaturação inicial; 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C e 1 min a 72°C para a desnaturação, anelamento e extensão; 1 ciclo de 10 min a 72°C para a extensão final (Nørskov-Lauritsen et al., 2009a; Nørskov-Lauritsen, 2009b; CDC, 2011b).

Um volume de 10 µL de cada produto amplificado foi homogeneizado com 1 µL do corante SyBr Green (Invitrogen) e submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X concentrado durante 1 hora a 90-110 volts. O padrão de bandas foi comparado ao marcador de peso

molecular 1 Kb DNA ladder (Biolabs). O gel foi revelado no fotodocumentador com luz ultravioleta, fotografado e analisado posteriormente.

3.5. Análise dos dados

Os ensaios de *hpd* e *rnaseP* seguiram os protocolos estabelecidos por Wang et al. (2011) e pelo CDC (2011b), respectivamente. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram $Ct \leq 35$, curva exponencial e presença de multicomponente; negativas quando apresentaram $Ct > 40$; e inconclusivas quando apresentam Ct entre 36 e 40. As amostras que apresentaram resultado inconclusivo foram repetidas e caso o resultado da repetição permanecesse o mesmo, elas foram consideradas negativas.

Para complementar a análise dos dados foi construída a curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), considerada uma ferramenta que permite avaliar a melhor sensibilidade e especificidade em diferentes valores de corte. Foram utilizados os valores de Ct s preditivos das amostras de secreção de nasofaringe, obtidos no ensaio da PCR-TR (*hpd*), para identificação dos valores de Ct s com melhor sensibilidade e especificidade para o estudo. A área sob a curva ROC é uma medida do desempenho de um teste (índice de exatidão do teste). Um teste incapaz de discriminar indivíduos doentes e não doentes teria uma área sob a curva de 0,5 e uma área sob a curva acima de 0,70 indica que o teste possui um desempenho satisfatório (Hanley e McNeil, 1982; Margotto, 2010).

A comparação entre os resultados obtidos pela cultura e PCR-TR foi avaliada pelo teste do qui-quadrado de McNemar (McNemar, 1947) e índice Kappa (Cohen, 1960). O índice Kappa é uma medida de concordância entre dois ou mais observadores (Vieira e Garrett, 2005). Neste estudo, o índice indicará o grau de concordância entre as duas técnicas utilizadas para a detecção de Hi em amostras de secreção de nasofaringe. Para uma concordância perfeita é atribuído

o valor 1 e valores próximos ou menores que zero sugerem que não há concordância entre os testes (Vieira e Garrett, 2005). A Tabela 7 mostra como interpretar o índice Kappa.

Tabela 7. Interpretação dos valores do índice Kappa.

Índice Kappa	Concordância
< 0	Pobre
0,01 a 0,20	Ligeira
0,21 a 0,40	Considerável
0,41 a 0,60	Moderada
0,61 a 0,80	Substancial
0,81 a 1	Excelente

Adaptado de Vieira e Garrett, 2005.

Resultados

4. Resultados

4.1. PCR-TR

4.1.1. Controles da PCR-TR

4.1.1.1. Detecção do gene *rnaseP* para o controle da extração de DNA das amostras de secreção de nasofaringe (STGG)

As amostras foram consideradas positivas quando apresentam $Ct \leq 35$ (CDC 2011b) e todas as 410 amostras de secreção de nasofaringe analisadas apresentaram valores de Ct variando entre 20 a 33, sendo positivas para a presença do gene *rnaseP*.

4.1.1.2. Determinação do limite mínimo de detecção (LMD)

O limite mínimo de detecção do ensaio para o gene *hpd* de Hi foi determinado como sendo de vinte fentogramas (20fg). É aceitável a variação de uma diluição acima ou abaixo do limite estabelecido. O teste teve uma eficiência de 88% com inclinação de -3,646 (Figuras 5 e 6).

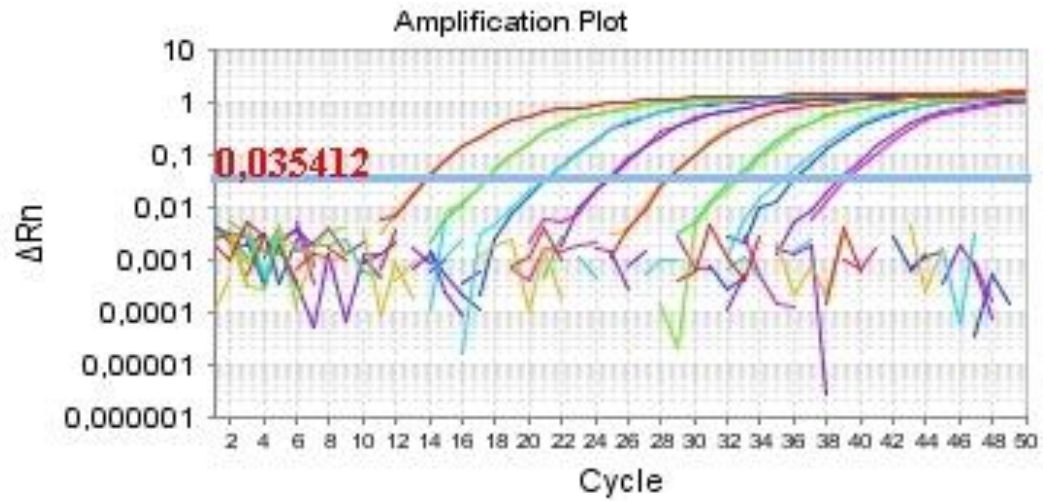


Figura 5. Limite mínimo de detecção (LMD) da reação para o gene *hpd*.

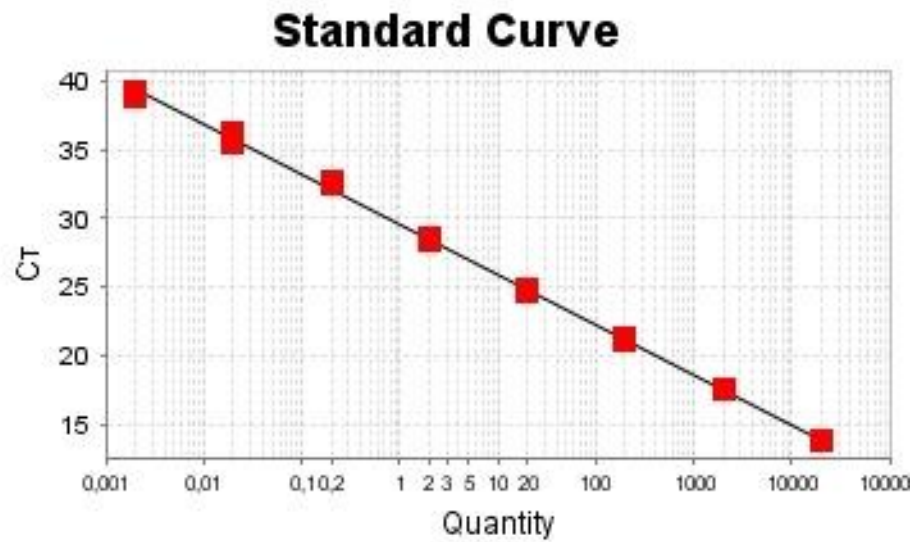


Figura 6. Eficiência da PCR-TR para detecção do gene *hpd*.
(Slope: -3,646; Y-Intercept: 29.583; R^2 : 0,999; Eff%: 88.056).

4.1.1.3. Acurácia da curva ROC

De acordo com a curva ROC observamos que a acurácia da PCR-TR para a detecção do gene *hpd* em amostras de nasofaringe foi de 0,979 para o valor de Ct = 35, apresentando uma sensibilidade de 95% e especificidade de 92% (Figura 7).

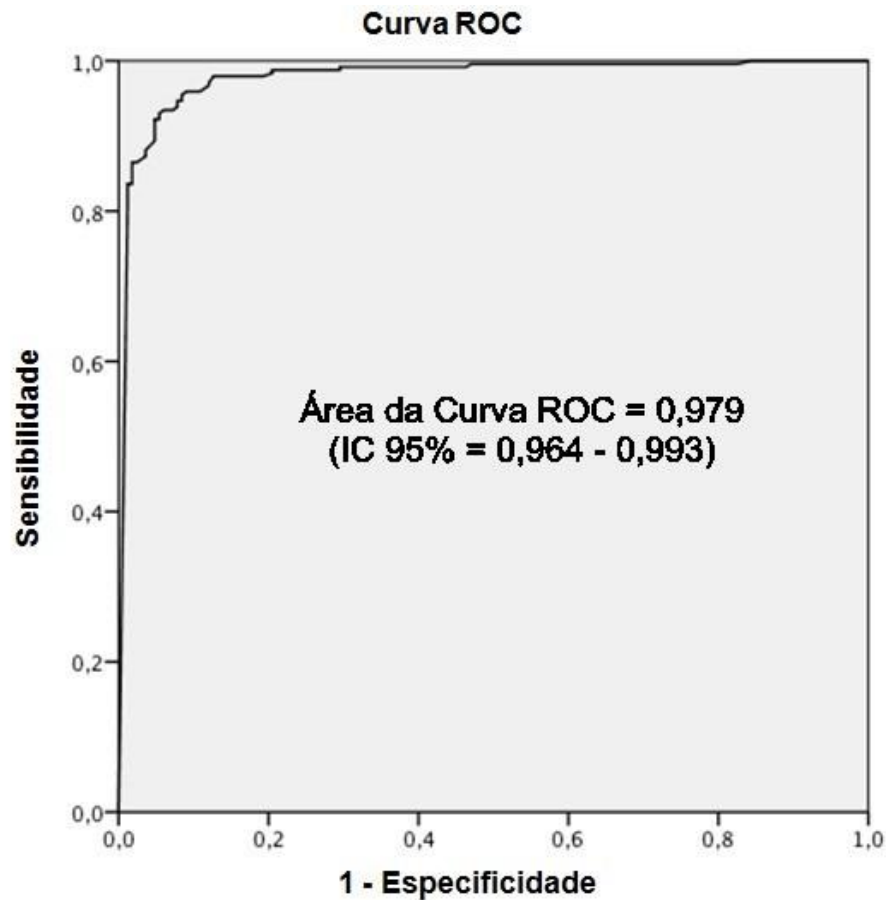


Figura 7. Curva ROC para valores de Ct preditivos positivos para a detecção do gene *hpd* em amostras de secreção de nasofaringe em STGG.

4.1.2. Detecção do gene *hpd* a partir de amostras de secreção de nasofaringe (STGG)

As 410 amostras de secreção de nasofaringe foram testadas pela PCR-TR utilizando o marcador molecular *hpd#3* para a detecção de Hi. Para este ensaio 161 (39,2%) amostras foram positivas para a presença do gene *hpd* e 249 (60,8%) negativas, como mostra a Figura 8.

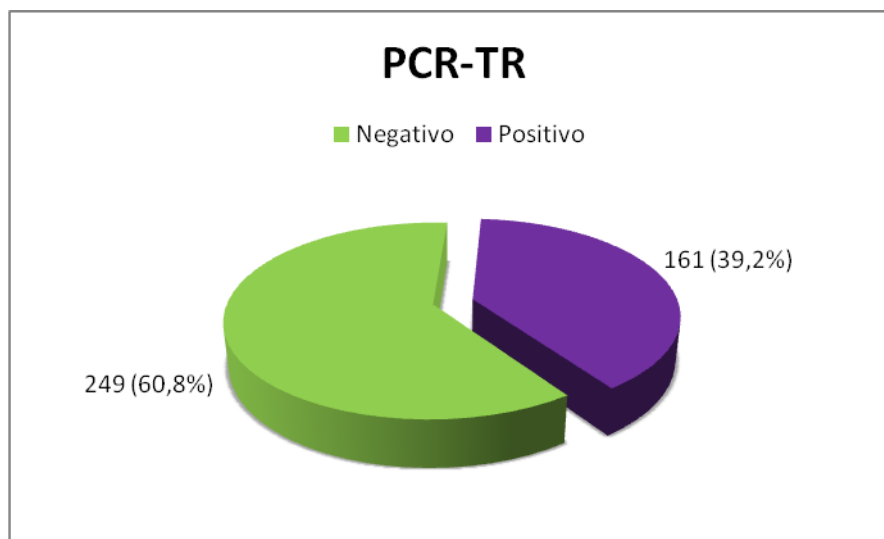


Figura 8. Porcentagem de positividade da PCR-TR (*hpd*) em 410 amostras de secreção de nasofaringe para detecção de Hi.

4.1.3. Análise da acurácia da PCR-TR para detecção do gene *hpd* (STGG) X Cultura

Os resultados da pesquisa de Hi pela PCR-TR e cultura a partir das 410 amostras de nasofaringe estão apresentados na Figura 9 e na Tabela 8. A PCR-TR detectou o Hi em 39,2% das amostras de secreção de nasofaringe estudadas. Este resultado foi semelhante ao obtido pela cultura bacteriológica, cuja positividade foi de 40,5%. A análise realizada pelo método do Qui-Quadrado de McNemar ($\chi^2=0,64$ $p>0,05$) não demonstrou diferença significativa entre as duas técnicas, assim como o índice Kappa que revelou uma excelente concordância entre elas (0,873).

A PCR-TR apresentou uma sensibilidade de 90,9% (95% IC: 85,3-94,7%) e uma especificidade de 95,9% (95% IC: 92,4-97,9%) quando comparada à cultura na detecção de Hi em amostras de nasofaringe mantidas em STGG.

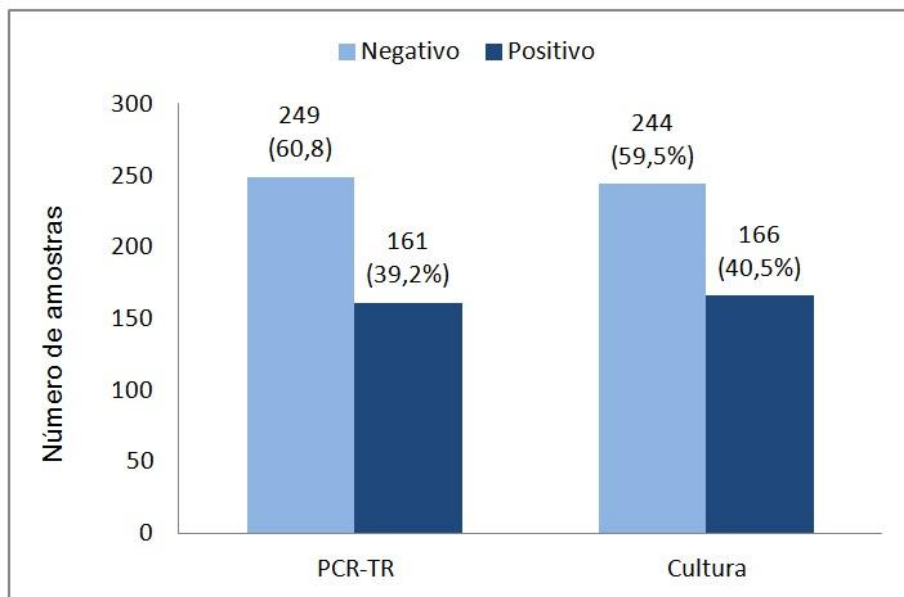


Figura 9. Comparação da pesquisa de Hi pela PCR-TR para o gene *hpd* e cultura a partir das 410 amostras de nasofaringe mantidas em STGG.

Tabela 8. Comparação dos resultados obtidos para a detecção de *H. influenzae* pela PCR-TR e cultura a partir das 410 amostras de nasofaringe (STGG).

PCR-TR (<i>hpd</i>)	Cultura		Total (%)
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Positivo	151 (36,8)	10 (2,4)	161 (39,2)
Negativo	15 (3,7)	234 (57,1)	249 (60,8)
Total	166 (40,5)	244 (59,5)	410 (100)

Entre as 244 amostras de secreção de nasofaringe com cultura negativa, 10 delas apresentaram resultado positivo pela PCR-TR. Entretanto, entre as 166 amostras com cultura positiva, 15 amostras foram negativas pela PCR-TR. O DNA destes 15 isolados foi extraído e testado pela PCR-TR para o gene *hpd* e somente o DNA de dois isolados apresentaram resultado negativo, como mostra a Tabela 9. O valor do Ct das 13 amostras de secreção de nasofaringe variou de 36 a 39, considerados valores negativos devido ao limite de ≤ 35 utilizado neste estudo.

Tabela 9. Resultados da PCR-TR das 15 amostras de secreção de nasofaringe (STGG) e do DNA dos 15 isolados bacterianos previamente identificados como *H. influenzae*.

Número das Amostras	Resultado da PCR-TR - <i>hpd</i> (Ct)	
	STGG	DNA de Isolado bacteriano
49	Negativo (38)	Positivo (13)
317	Negativo (36)	Positivo (14)
482	Negativo (36)	Positivo (13)
994	Negativo (36)	Positivo (15)
1203	Negativo	Positivo (15)
1350	Negativo (36)	Positivo (15)
1516	Negativo (38)	Positivo (14)
1684	Negativo (38)	Positivo (15)
1690	Negativo (38)	Positivo (17)
1736	Negativo (37)	Positivo (15)
1910	Negativo (38)	Negativo (39)
1915	Negativo (36)	Positivo (19)
1964	Negativo	Negativo
2016	Negativo (39)	Positivo (17)
2540	Negativo (36)	Positivo (18)

4.1.4. Detecção do gene *hpd* pela PCR-TR em isolados bacterianos

Entre os 79 isolados previamente identificados e selecionados para o ensaio de PCR-TR, 77 (97,5%) foram positivos para a presença do gene *hpd* e 2 (2,5%) isolados foram negativos, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10. Comparação dos resultados obtidos pela cultura e PCR-TR para detectar Hi nos isolados bacterianos.

Cultura*	PCR-TR (<i>hpd</i>)		Total (%)
	Positivo (%)	Negativo (%)	
<i>H. influenzae</i>	77 (97,5%)	2 (2,5%)	79 (100)

*Identificação previamente realizada pelo NMPI do IAL.

4.2. PCR convencional

4.2.1. Detecção do gene *fucK* pela PCR convencional a partir das amostras de secreção de nasofaringe (STGG)

Paralelamente à realização da PCR-TR, as 410 amostras foram também testadas pela PCR convencional para a pesquisa do gene *fucK* e os resultados obtidos foram de 99 (24%) amostras positivas e 311 (76%) negativas, como mostra a Figura 10.

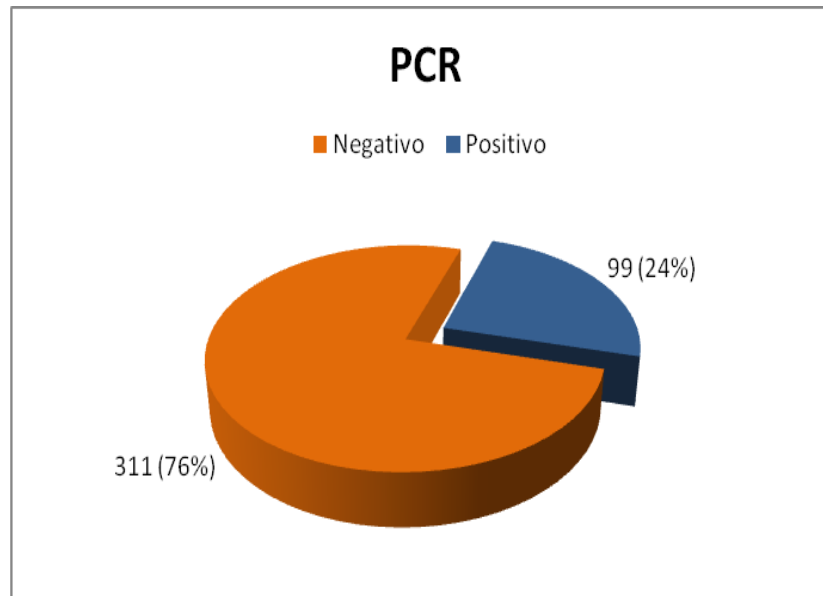


Figura 10. Positividade de Hi pela PCR convencional utilizando marcadores moleculares para o gene *fucK* em 410 amostras de secreção de nasofaringe mantidas em STGG.

4.2.2. Análise dos resultados da PCR convencional (STGG) X Cultura

A Tabela 11 apresenta a positividade de portador de Hi pela PCR convencional e cultura. A positividade de Hi foi significativamente menor pela PCR (24,2%) quando comparada com a cultura (40,5%), como mostra a análise feita pelo Qui-Quadrado de McNemar ($=59,7$ $p<0,05$). Embora o índice Kappa tenha revelado uma concordância moderada (0,605) entre as duas técnicas.

Tabela 11. Comparação dos resultados da PCR convencional e cultura para detectar Hi na secreção de nasofaringe.

PCR (<i>fucK</i>)	Cultura		Total (%)
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Positivo	96 (23,4)	3 (0,8)	99 (24,2)
Negativo	70 (17,1)	241 (58,7)	311 (75,8)
Total	166 (40,5)	244 (59,5)	410 (100)

A PCR convencional apresentou uma baixa sensibilidade de 57,8% (95% IC: 49,9 – 65,4) e uma especificidade de 98,8% (95% IC: 96,2 – 99,7).

Apesar da baixa sensibilidade em detectar Hi em amostra clínica, para uma análise complementar, as 15 amostras de secreção de nasofaringe que apresentaram discrepância entre os resultados de cultura positivo e PCR-TR negativo também foram analisadas pela PCR convencional para a detecção do gene *fucK*, como mostra a Tabela 12. Nesta tabela apresentamos os resultados das 15 amostras de nasofaringe mantidas em STGG e do DNA dos 15 isolados testados pela PCR-TR (*hpd*) em paralelo com os resultados obtidos pela PCR convencional (*fucK*). Podemos observar que somente uma amostra (1964) do STGG mostrou um resultado discordante entre PCR-TR e PCR. Para o DNA dos 15 isolados, dois resultados foram discrepantes.

Tabela 12. Resultados obtidos pela PCR-TR e PCR em amostras de secreção de nasofaringe em STGG e isolados bacterianos que apresentaram discrepância nos resultados de PCR-TR e cultura.

Número das Amostras	STGG		Isolado bacteriano	
	PCR-TR (Ct)	PCR	PCR-TR (Ct)	PCR
	<i>hpd</i>	<i>fucK</i>	<i>hpd</i>	<i>fucK</i>
49	Negativo (38)	Negativo	Positivo (13)	Positivo
317	Negativo (36)	Negativo	Positivo (14)	Positivo
482	Negativo (36)	Negativo	Positivo (13)	Positivo
994	Negativo (36)	Negativo	Positivo (15)	Positivo
1203	Negativo	Negativo	Positivo (15)	Positivo
1350	Negativo (36)	Negativo	Positivo (15)	Positivo
1516	Negativo (38)	Negativo	Positivo (14)	Positivo
1684	Negativo (38)	Negativo	Positivo (15)	Positivo
1690	Negativo (38)	Negativo	Positivo (17)	Positivo
1736	Negativo (37)	Negativo	Positivo (15)	Positivo
1910	Negativo (38)	Negativo	Negativo (39)	Positivo
1915	Negativo (36)	Negativo	Positivo (19)	Positivo
1964	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
2016	Negativo (39)	Negativo	Positivo (17)	Positivo
2540	Negativo (36)	Negativo	Positivo (18)	Positivo

4.2.3. Detecção do gene *fucK* pela PCR convencional a partir de isolados bacterianos

O DNA dos mesmos 79 isolados testados no item 4.1.7 (PCR-TR para detecção do gene *hpd*) também foram avaliados pela PCR convencional, utilizando iniciadores específicos para a amplificação do gene *fucK*. Todos os isolados (100%) foram positivos para a presença do gene *fucK*.

4.2.4. Detecção dos gene *hpd* (PCR-TR) e *fucK* (PCR convencional) a partir dos isolados bacterianos.

Considerando o critério de identificação estabelecido por Theodore et al. (2012), para diferenciar Hi de Hhae, os resultados obtidos neste estudo confirmam que todos os 79 isolados avaliados são Hi, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13. Resultado de identificação dos 79 isolados de Hi pela PCR-TR (*hpd*) e PCR (*fucK*), conforme critérios estabelecidos por Theodore et al. (2012).

Espécie	Número de isolados (n)				Total
	<i>fucK+</i> <i>hpd+</i> .	<i>fucK+</i> <i>hpd-</i>	<i>fucK-</i> <i>hpd+</i>	<i>fucK-</i> <i>hpd-</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	77	2	0	0	79

Discussão

5. Discussão

Estudos de prevalência de portador em regiões onde a vacina contra Hi foi introduzida permitem a caracterização das cepas circulantes na população. Para estimar o efeito da vacina com acurácia, a identificação correta de Hi é de fundamental importância. A cultura bacteriana é considerada a técnica padrão-ouro para detectar Hi em material clínico. Apesar de ser um método específico, a cultura apresenta sensibilidade variável e pode não diferenciar Hi de *H. haemolyticus*, já que são espécies fenotípica e filogeneticamente relacionadas. O uso de técnicas moleculares tem auxiliado na identificação e diferenciação de Hi de outras espécies do gênero *Haemophilus*, devido a maior sensibilidade e especificidade para detectar o microrganismo. Diferentes ensaios de PCR-TR e PCR foram desenvolvidos para o diagnóstico de Hi utilizando diversos genes alvo específicos como o gene *hpd* e o gene *fucK*. Estes genes são altamente conservados e estão presentes nos Hi capsulados e não capsulados. Com isso, este estudo avaliou a acurácia da PCR-TR em detectar Hi na secreção de nasofaringe comparando-a com a cultura.

Para a determinação da eficiência da PCR-TR utilizando marcadores moleculares para detectar o gene *hpd* foi realizada o limite mínimo de detecção. A PCR-TR possui uma eficiência de 1 ou 100% quando a inclinação da curva padrão é de -3,322, indicando que a quantidade do produto da reação dobra a cada ciclo. Uma curva com inclinação menor que -3,322 é um indicativo de que a eficiência do ensaio seja menor do que 100% e em geral, a maioria das reações de amplificação não possuem 100% de eficiência devido a diversas limitações experimentais (Raymaekers et al., 2009). Neste estudo, a curva padrão teve uma inclinação de -3,646 e eficiência de 88%.

A porcentagem de amostras de secreção de nasofaringe positiva para Hi pela PCR-TR (39,2%) e pela cultura (40,5%) não apresentou diferença estatística. A PCR-TR (*hpd*) apresentou uma sensibilidade de 90,9% e uma especificidade de

95,9% para identificar Hi quando comparada à cultura bacteriana, resultados muito semelhantes àqueles publicados por Wang et al. (2011).

A PCR-TR é considerada uma técnica mais sensível que a cultura e, em estudos de doenças invasivas, pode aumentar a detecção do microrganismo (Corless et al., 2001; Wang et al., 2011; Sacchi et al., 2011; Wang et al., 2012; Wu et al., 2013). Saukkoriipi et al. (2004) compararam a PCR-TR com a cultura em um estudo de portador, semelhante a este, para detectar *S. pneumoniae* em secreção de nasofaringe de crianças saudáveis conservada no meio de STGG. Neste estudo, a técnica molecular foi mais sensível para detectar o microrganismo (62%) quando comparada com a cultura (40%), sendo que 2% das amostras com resultado de cultura positiva apresentaram resultado negativo pela PCR-TR. Em outro estudo realizado por Almeida et al. (2012), esta maior sensibilidade também foi observada, a PCR-TR apresentou um acréscimo de 13% quando comparada com cultura para detectar *S. pneumoniae* em secreção de nasofaringe de crianças saudáveis.

Esta diferença de resultados encontrada na PCR-TR e cultura para a pesquisa de pneumococo e Hi pode ser justificada por existir uma dificuldade maior de isolamento do pneumococo na cultura bacteriana a partir de uma amostra clínica não estéril, fato este que pode não ocorrer com o Hi.

Das 410 amostras testadas, 15 (3,7%) apresentaram resultado negativo pela PCR-TR e foram positivas para Hi pela cultura bacteriana. Alguns fatores poderiam justificar estes resultados discordantes, como a presença de inibidores na reação da PCR-TR, erro no procedimento de extração de DNA, degradação do DNA por ciclos de congelamento e descongelamento do eluído de DNA ou a quantidade de DNA existente na amostra.

No entanto, todas as amostras apresentaram resultados positivos no ensaio da *maseP*, indicando a ausência de inibidores da reação de PCR-TR e

comprovando a eficiência da extração do material clínico com a presença de DNA humano. Uma segunda extração foi realizada nas amostras discordantes e o mesmo resultado foi obtido, descartando a possibilidade de erro na extração de DNA ou degradação pelos ciclos de congelamento e descongelamento. Neste estudo não foi realizada uma cultura semiquantitativa para determinar o número de colônias bacterianas que cresceram na cultura. Como há uma relação inversa entre a quantidade de material genético e valor de Ct, logo a baixa quantidade de DNA bacteriano pode explicar os valores de Cts obtidos nestas amostras.

Este trabalho seguiu um protocolo previamente estabelecido por Wang et al. (2011), onde foi considerado o $Ct \leq 35$ para determinar a positividade da amostra. Considerando este $Ct \leq 35$, 13 amostras de secreção de nasofaringe, após a nova extração e repetição da PCR-TR, permaneceram negativas.

Com o objetivo de avaliar se os parâmetros de resultados positivos com a utilização do Ct limite de 35 estabelecido por Wang et al. (2011) era reprodutível ao se comparar com a cultura bacteriana, foi construída a curva ROC. Ao criar uma tabela com os resultados dos valores de Cts preditivos das amostras de secreção de nasofaringe que apresentaram resultado positivo pela cultura bacteriana obteve-se uma acurácia da técnica de 0,979 para o valor de $Ct \leq 35$, que representa uma sensibilidade de 95% e especificidade de 92%. Portanto, neste estudo foi mantido o valor de $Ct \leq 35$ para considerar as amostras positivas para a presença de Hi em secreção de nasofaringe, assim como previamente estabelecido por Wang et al. (2011).

Em estudos de portador com base populacional, técnicas com maior especificidade são mais adequadas, pois garantem um resultado verdadeiramente negativo. De acordo com a tabela da curva ROC, um aumento no valor de Ct limite acarretaria uma diminuição da sensibilidade e um aumento da especificidade da técnica. Para verificar a possibilidade de alteração do valor de Ct limite em

estudos de portador sem prejudicar a sensibilidade e especificidade da técnica é necessário um estudo mais detalhado.

A PCR convencional com a utilização de marcadores moleculares para a detecção do gene *fucK*, como já esperado, apresentou uma baixa positividade em detectar Hi na amostra clínica (24%) quando comparada à cultura (40,5%). Isto pode ser justificada pelo fato da PCR convencional possuir uma menor sensibilidade na detecção do material genético neste tipo de material, uma característica inerente à técnica e totalmente corrigida quando se utiliza a PCR-TR. Entretanto, a detecção do gene *fucK* apresentou alta especificidade, o que resulta em uma diminuição dos resultados falsos negativos.

Diante dos isolados bacterianos, as duas técnicas moleculares foram eficientes para a detecção de Hi, tanto a PCR-TR (97,5%) como a PCR convencional (100%). Entretanto, evidenciamos as limitações da PCR convencional, que depende de uma concentração de DNA maior para melhor eficiência da técnica.

Neste estudo, o uso dos genes *hpd* e *fucK* como recomendado por Theodore et al. (2012) permitiu a confirmação dos 79 isolados bacterianos como Hi, por apresentarem resultado positivo para *fucK* e/ou *hpd*. De acordo com os resultados obtidos, somente 2,5% dos isolados não seriam confirmados como Hi, caso fosse utilizada somente a pesquisa do gene *hpd* pela PCR-TR para a sua identificação.

Neste estudo, não foi possível avaliar qual seria o melhor gene alvo para ser utilizado na detecção de Hi na amostra clínica, pois as técnicas empregadas apresentam sensibilidades diferentes. Não havia um protocolo de PCR-TR estabelecido para a detecção do gene *fucK* quando se iniciou este estudo, por isso a PCR convencional foi utilizada. Apenas no final de 2012, Meyler et al. publicaram um ensaio de PCR-TR utilizando o gene alvo *fucK* para identificar Hi.

Em seu ensaio foi detectado 105 isolados bacterianos de Hi com uma eficiência de 91% e nas amostras clínicas de sangue e líquido identificou 100% (10/10) das amostras que tiveram cultura positiva para Hi e 29% (2/7) das amostras com cultura negativa. Em 2013, Abdeldaim et al. avaliaram a PCR-TR para detectar o gene *fucK* em secreção de nasofaringe, obtendo uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 89,5%, resultado este muito semelhante ao encontrado com o gene *hpd*.

As duas técnicas possuem vantagens e apresentam limitações. A cultura bacteriana é específica, permite o isolamento da bactéria, a caracterização fenotípica e molecular completa e é considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de diferentes patógenos. Suas limitações são a sensibilidade variável e o tempo para a completa identificação do microrganismo. Se comparado com a cultura, a PCR-TR apresenta maior sensibilidade e especificidade, o tempo para a liberação do resultado é menor e permite a detecção do material genético de microrganismos inviáveis de serem detectados pela cultura. Embora, para a realização da PCR-TR sejam necessários equipamentos automatizados de alto custo, um laboratório com uma infraestrutura adequada e pessoal treinado para execução da técnica.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, a escolha da técnica a ser utilizada para detectar Hi em amostras de secreção de nasofaringe dependerá principalmente dos recursos e da infraestrutura do laboratório que irá desenvolver o trabalho.

Conclusão

6. Conclusão

- Houve alta concordância na positividade entre a cultura bacteriana e a PCR-TR para a pesquisa de Hi em amostras de secreção de nasofaringe.
- A PCR-TR pode ser utilizada em estudos de portador com base populacional para avaliação de impacto vacinal para Hi.
- A PCR-TR (*hpd*) apresentou maior sensibilidade para detectar Hi em amostras de secreção de nasofaringe ao compará-la com a PCR clássica (*fucK*).
- As duas técnicas, PCR-TR (*hpd*) e PCR (*fucK*) podem ser utilizadas para a identificação de Hi a partir de isolados bacterianos.
- A detecção dos dois genes, *hpd* e *fucK*, possibilita uma identificação de Hi mais precisa.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

Abdeldaim GM, Stralin K, Kirsebom LA, Olcen P, Blomberg J, Herrmann B. Detection of *Haemophilus influenzae* in respiratory secretions from pneumonia patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2009; 64(4):366-73.

Abdeldaim GM, Strålin K, Olcén P, Blomberg J, Mölling P, Herrmann B. Quantitative *hlyB* gene polymerase chain reaction on sputum and nasopharyngeal secretions to detect *Haemophilus influenzae* pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(2):141-6.

Ada G, Isaacs D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9(2):79-85.

Adam HJ, Richardson SE, Jamieson FB, Rawte P, Low DE, Fisman DN. Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontario, Canada: evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. *Vaccine*. 2010; 28(24):4073-8.

Adegbola RA, Secka O, Lahai G, Lloyd-Evans N, Njie A, Usen S, et al. 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*. 2005; 366(9480):144-50.

Afonso ET, Minamisava R, Bierrenbach AL, Escalante JJ, Alencar AP, Domingues CM, et al. Effect of 10-valent pneumococcal vaccine on pneumonia among children, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(4):589-97.

Almeida AE, Filippis I, Abreu AO, Ferreira DG, Gemal AL, Marzochi KB. 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. 2005; 38(5):777-81.

Almeida SCG, Brandao AP, Zanella RC, Lemos APS, Gorla MCO, Prado LS, et al. Simultaneous nasopharyngeal carriage of Hi and Spn in 1 and 4-years old children from Sao Paulo, SP, Brazil. In: 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases; 2012 mar 11-15; Foz do Iguaçu, Brasil.

Azevedo J, Silva MS, Silva E, Escobar EC, Galvão LA, Vilasboas R, et al. Impacto da vacina pneumocócica decavalente (PCV10) na doença pneumocócica invasiva em Salvador-BA. In: 27º Congresso de Microbiologia; 2013 set 29-out 03; Natal, Brasil.

Bajanca P, Canica M, Multicenter Study Group. Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). J Clin Microbiol. 2004; 42(2):807-10.

Binks MJ, Temple B, Kirkham LA, Wiertsema SP, Dunne EM, Richmond PC, et al. Molecular surveillance of true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays. PLoS One. 2012; 7(3):e34083.

Bouskela MA, Grisi S, Escobar AM. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b. Rev Panam Salud Publica. 2000; 7(5):332-9.

Brown VM, Madden S, Kelly L, Jamieson FB, Tsang RS, Ulanova M. Invasive *Haemophilus influenzae* disease caused by non-type b strains in Northwestern Ontario, Canada, 2002–2008. Clin Infect Dis. 2009; 49(8):1240-3.

Bruce MG, Deeks SL, Zulz T, Navarro C, Palacios C, Case C, et al. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* serotype a, North American Arctic, 2000-2005. Emerg Infect Dis. 2008; 14(1):48-55.

Carvalhanas TRM, Brandileone MCC, Zanella RC. Meningites Bacterianas. BEPA. 2005; 17(2).

Carvalho CX, Kipnis A, Thörn L, Andrade JG, Pimenta F, Brandileone MC, et al. Carriage of *Haemophilus influenzae* among Brazilian children attending day care centers in the era of widespread Hib vaccination. *Vaccine*. 2011; 29(7):1438-42.

Cassiolato AP, Almeida SCG, Guerra MLS, Brandão AP, Prado LS, Bokermann S, et al. Prevalência de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 19A antes e após a introdução da vacina conjugada 10-valente no Brasil. In: 27º Congresso de Microbiologia; 2013 set 29-out 03; Natal, Brasil.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). PCR for detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. In: Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*, 2nd ed. 2011, chapter 10. 2011a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html>. Acessado em: 18 de outubro de 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Characterization of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* by Molecular Typing Methods. In: Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*, 2nd ed. 2011, chapter 12. 2011b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt12-molecular-typing-methods.html>. Acessado em: 22 de maio de 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Haemophilus influenzae* type b - epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. The Pink Book:

Course Textbook, 12th ed 2nd printing. 2012; 87-100. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html>. Acessado em 22 de maio de 2013.

Centro de Vigilância Epidemiológica - São Paulo (CVE). Meningites por *Haemophilus influenzae* b: casos, coeficientes de incidência (por 100.000 hab.) e porcentagem segundo faixa etária, Estado de São Paulo - 1998 a 2013. 2013. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/meni_chife.htm. Acessado em: 01 de julho de 2013.

Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. 1960; 20:37-46.

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(4):1553-8.

Crisel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem*. 1975; 250(13):4926-30.

Dabernat H, Plisson-Sauné MA, Delmas C, Séguy M, Faucon G, Pélissier R, et al. *Haemophilus influenzae* carriage in children attending French day care centers: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(4):1664-72.

Dworkin MS, Park L, Borchardt SM. The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, especially in persons ≥ 65 years old. *Clin Infect Dis*. 2007; 44(6):810-6.

Fukasawa LO, Salgado MM, Gonçalves MG, Custódio AV, Araújo TP, Carvalhanas TRMP, et al. Limitações no uso da técnica de contraímunoeletroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b. Bepa 2010; 7(76):4-12.

Giufrè M, Cardines R, Caporali MG, Accogli M, D'Ancona F, Cerquetti M. Ten years of Hib vaccination in Italy: prevalence of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* among invasive isolates and the possible impact on antibiotic resistance. Vaccine. 2011; 29(22):3857-62.

Guerra MLS, Almeida SCG, Prado LS, Bokermann S, Brandão AP, Brandileone MCC. Efeito da vacinação pneumocócica (PCV10) na prevalência de sorotipos de pneumococos obtidos pela Vigilância Laboratorial Nacional. In: 27º Congresso de Microbiologia; 2013 set 29-out 03; Natal, Brasil.

Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. Radiology. 1982; 143(1):29-36.

Hare KM, Binks MJ, Grimwood K, Chang AB, Leach AJ, Smith-Vaughan H. Culture and PCR detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in Australian Indigenous children with bronchiectasis. J Clin Microbiol. 2012; 50(7):2444-5.

Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, Slack MP, Bowen-Morris J, Griffiths H, et al. Antibody concentration and clinical protection after Hib conjugate vaccination in the United Kingdom. JAMA. 2000; 284(18):2334-40.

Hobson RP, Williams A, Rawal K, Pennington TH, Forbes KJ. Incidence and spread of *Haemophilus influenzae* on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction. Epidemiol Infect. 1995; 114(1):93-103.

Jain A, Kumar P, Awasthi S. High nasopharyngeal carriage of drug resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in North Indian schoolchildren. Trop Med Int Health. 2005; 10(3):234-9.

Janson H, Hedén LO, Forsgren A. Protein D, the immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*, is a lipoprotein. Infect Immun. 1992; 60(4):1336-42.

Kastrin T, Paragi M, Kolman J, Cizman M, Kraigher A, Gubina M, et al. Characterisation of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Slovenia, 1993–2008. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010; 29(6):661-8.

Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Immunology. 2004; 113(2):163-74.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006; 27(2-3):95-125.

Ladhani S, Slack MP, Heath PT, Ramsay ME. Changes in ascertainment of Hib and its influence on the estimation of disease incidence in the United Kingdom. Epidemiol Infect. 2007; 135(5):861-67.

Ladhani S, Slack MP, Heys M, White J, Ramsay ME. Fall in *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) disease following implementation of a booster campaign. Arch Dis Child. 2008; 93(8):665-9.

Ladhani S, Slack MP, Heath PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996-2006. Emerg Infec Dis. 2010; 16(3):455-63.

Laval CA, Pimenta FC, Andrade JG, Andrade SS, Andrade AL. Progress towards meningitis prevention in the conjugate vaccines era. Braz J Infect Dis. 2003;

7(5):315-24.

Ledeboer NA, Doern GV. *Haemophilus*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC. 2011, p. 588-602.

Leibovitz E, Jacobs MR, Dagan R. *Haemophilus influenzae*: a significant pathogen in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23(12):1142-52.

López MG, Pino de la Fuente AD, Martín FJG, Torrecillas FC, Santaella IO, Campos J, Valverde AM. Meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo f. *An Esp Pediat*. 2000; 53(4):369-71.

Maaroufi Y, De Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(7):2305-8.

Margotto PR. Curva ROC - Como fazer e interpretar no SPSS. Disponível em: http://www.paulomargotto.com.br/documentos/Curva_ROC_SPSS.pdf. Acessado em 29 de outubro de 2013.

Marrs CF, Krasan GP, McCrea KW, Clemans DL, Gilsdorf JR. *Haemophilus influenzae* - human specific bacteria. *Front Biosci*. 2001; 6:E41-60.

Marty A, Greiner O, Day PJ, Gunzinger S, Mühlemann K, Nadal D. Detection of *Haemophilus influenzae* type b by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(9):3813-5.

McConnell A, Tan B, Scheifele D, Halperin S, Vaudry W, Law B, et al. Invasive infections caused by *Haemophilus influenzae* serotypes in twelve Canadian IMPACT centers, 1996-2001. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26(11):1025-31.

McCrea KW, Xie J, LaCross N, Patel M, Mukundan D, Murphy TF, et al. Relationships of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. J Clin Microbiol. 2008; 46(2):406-16.

McNemar Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. Psychometrika. 1947; 12(2):153-7.

McVernon J, Andrews N, Slack MP, Ramsay ME. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b (Hib) combination vaccines with acellular pertussis. Lancet. 2003; 361(9368):1521-3.

Meats E, Feil EJ, Stringer S, Cody AJ, Goldstein R, Kroll JS, et al. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2003; 41(4):1623-36.

Meyler KL, Meehan M, Bennett D, Cunney R, Cafferkey M. Development of a diagnostic real-time polymerase chain reaction assay for the detection of invasive *Haemophilus influenzae* in clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74(4):356-62.

Millar EV, O'Brien KL, Levine OS, Kvamme S, Reid R, Santosham M. Toward elimination of *Haemophilus influenzae* type B carriage and disease among high-risk American Indian children. Am J Public Health. 2000; 90(10):1550-4.

Ministério da Saúde (Brasil). Programa Nacional de Imunizações - 30 anos. Brasília: Ministério da Saúde. 2003; 16-25.

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2009; 7ª ed, cad 12, 21-47.

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Informe técnico da introdução da vacina pentavalente - Vacina adsorvida difteria, tétano, *pertussis*, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada). Brasília: Ministério da Saúde. 2012; 1-16.

Miranzi Sde S, de Moraes SA, de Freitas IC. Impact of the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program on Hib meningitis in Brazil. Cad Saude Publica. 2007; 23(7):1689-95.

Murphy TF, Brauer AL, Sethi S, Kilian M, Cai X, Lesse AJ. *Haemophilus haemolyticus*: a human respiratory tract commensal to be distinguished from *Haemophilus influenzae*. J Infect Dis. 2007; 195(1):81-9.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica, 6ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 2009, p. 338-46.

Nørskov-Lauritsen N, Overballe MD, Kilian M. Delineation of the species *Haemophilus influenzae* by phenotype, multilocus sequence phylogeny, and detection of marker genes. J Bacteriol. 2009a; 191(3):822-31.

Nørskov-Lauritsen N. Detection of cryptic genospecies misidentified as *Haemophilus influenzae* in routine clinical samples by assessment of marker genes *fucK*, *hap*, and *sodC*. J Clin Microbiol. 2009b; 47(8):2590-2.

O'Brien KL, Bronsdon MA, Dagan R, Yagupsky P, Janco J, Elliott J, et al. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of

Streptococcus pneumoniae from nasopharyngeal secretions collected during field studies. J Clin Microbiol. 2001; 39(3):1021-4.

Odutola A, Antonio M, Owolabi O, Bojang A, Foster-Nyarko E, Donkor S, et al. Comparison of the prevalence of common bacterial pathogens in the oropharynx and nasopharynx of Gambian infants. PLoS One. 2013; 8(9):e75558.

Oguzkaya-Artan M, Baykan Z, Artan C. Carriage rate of *Haemophilus influenzae* among preschool children in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2007; 60(4):179-82.

Osada N, Hirata M, Tanuma R, Kusuda J, Hida M, Suzuki Y, et al. Substitution rate and structural divergence of 5'UTR evolution: comparative analysis between human and cynomolgus monkey cDNAs. Mol Biol Evol. 2005; 22(10):1976-82.

Peltola H, Käyhty H, Virtanen M, Mäkelä PH. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. N Engl J Med. 1984; 310(24):1561-6.

Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(2):302-17.

Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. J Exp Med. 1931; 53(4):471-92.

Prymula R, Peeters P, Chrobok V, Kriz P, Novakova E, Kaliskova E, et al. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. Lancet. 2006; 367:740-8.

Poyrazoglu S, Kömeç S, Gökçay G, Ongen B. *Haemophilus influenzae* type b carriage among 3- to 24-month-old Turkish children. *Epidemiol Infect.* 2005; 133(6):1113-7.

Prymula R, Schuerman L. 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix. *Expert Rev Vaccines.* 2009; 8:1479-500.

Prymula R, Kriz P, Kaliskova E, Pascal T, Poolman J, Schuerman L. Effect of vaccination with pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to *Haemophilus influenzae*-derived protein D on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *H. influenzae* in children under 2 years of age. *Vaccine.* 2009; 28:71-8.

Prymula R, Hanovcova I, Splino M, Kriz P, Motlova J, Lebedova V, et al. Impact of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* Protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) on bacterial nasopharyngeal carriage. *Vaccine.* 2011; 29(10):1959-67.

Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23(3):145-51.

Ribeiro GS, Reis JN, Cordeiro SM, Lima JB, Gouveia EL, Petersen M, et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. *J Infect Dis.* 2003; 187(1):109-16.

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.* 1999; 5(3):197-9.

Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. PLoS One. 2011; 6(6):e20675.

Sarangi J, Cartwright K, Stuart J, Brookes S, Morris R, Slack M. Invasive *Haemophilus influenzae* diseases in adults. Epidemiol Infect. 2000; 124(3):441-7.

Saukkoriipi A, Leskelä K, Herva E, Leinonen M. *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions of healthy children: comparison of real-time PCR and culture from STGG-transport medium. Mol Cell Probes. 2004; 18(3):147-53.

Scheifele DW, Bettinger JA, Halperin SA, Law B, Bortolussi R. Ongoing control of *Haemophilus influenzae* type B infections in Canadian children, 2004-2007. Ped Infect Dis J. 2008; 27(8):755-7.

Secretaria de Estado da Saúde (São Paulo), Coordenação dos Institutos de Pesquisa, Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Informe técnico - Vacina combinada contra DTP e Hib. Divisão de Imunização. 2002; 1-4.

Silva MENB, Silva P, Medeiros MIC, Neme SN, Macedo C, Marin JM. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children attending day-care centers, in Ribeirão Preto, state of São Paulo, Brazil. Brazil J Microbiol. 2006; 37:33-38.

Smith-Vaughan H, Byun R, Nadkarni M, Jacques NA, Hunter N, Halpin S, et al. Measuring nasal bacterial load and its association with otitis media. BMC Ear Nose Throat Disord. 2006; 6:10.

Song XM, Forsgren A, Janson H. The gene encoding protein D (*hpd*) is highly conserved among *Haemophilus influenzae* type b and nontypeable strains. *Infect Immun*. 1995; 63(2):696-9.

Takala A, Eskola J, Leinonen M, Käyhty H, Nissinen A, Pekkanen E, Mäkelä PH. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 1991; 164(5):982-6.

Theodore MJ, Anderson RD, Wang X, Katz LS, Vuong JT, Bell ME, et al. Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(4):1422-4.

Tsang RS, Mubareka S, Sill ML, Wylie J, Skinner S, Law DK. Invasive *Haemophilus influenzae* in Manitoba, Canada, in the postvaccination era. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(4):1530-5.

Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(9):1267-84.

van den Bergh MR, Spijkerman J, Swinnen KM, François NA, Pascal TG, Borys D, et al. Effects of the 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization in young children: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(3):e30-9.

van Ketel RJ, Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol*. 1990; 33(4):271-6.

Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*. 2005; 37(5):360-3.

von Gottberg A, Cohen C, Whitelaw A, Chhagan M, Flannery B, Cohen AL, et al. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype b ten years after routine vaccination, South Africa, 2003-2009. *Vaccine*. 2012; 30(3):565-71.

Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, et al. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitidis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(4):303-9.

Wang X, Theodore MJ, Mair R, Trujillo-Lopez E, du Plessis M, Wolter N, et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(3):702-8.

Weiser JN, Shchepetov M, Chong ST. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. 1997; 65(3):943-50.

Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. The families and genera of the bacteria: final report of committee of the society of American Bacteriologists on characterization of bacterial types. *J Bacteriol*. 1920; 5(3):191-229.

World Health Organization (WHO). WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Wkly Epidemiol Rec*. 2006; 81(47):445-52.

Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, Carvalho M, Azevedo J, Oliveira TQ, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:26.

Zanella RC, Bokermann S, Andrade AL, Flannery B, Brandileone MC. Changes in serotype distribution of *Haemophilus influenzae* meningitis isolates identified through laboratory-based surveillance following routine childhood vaccination against *H. influenzae* type b in Brazil. *Vaccine*. 2011; 29(48):8937-42.

Anexos

1. Algoritmo do estudo

O estudo seguiu o seguinte algoritmo:

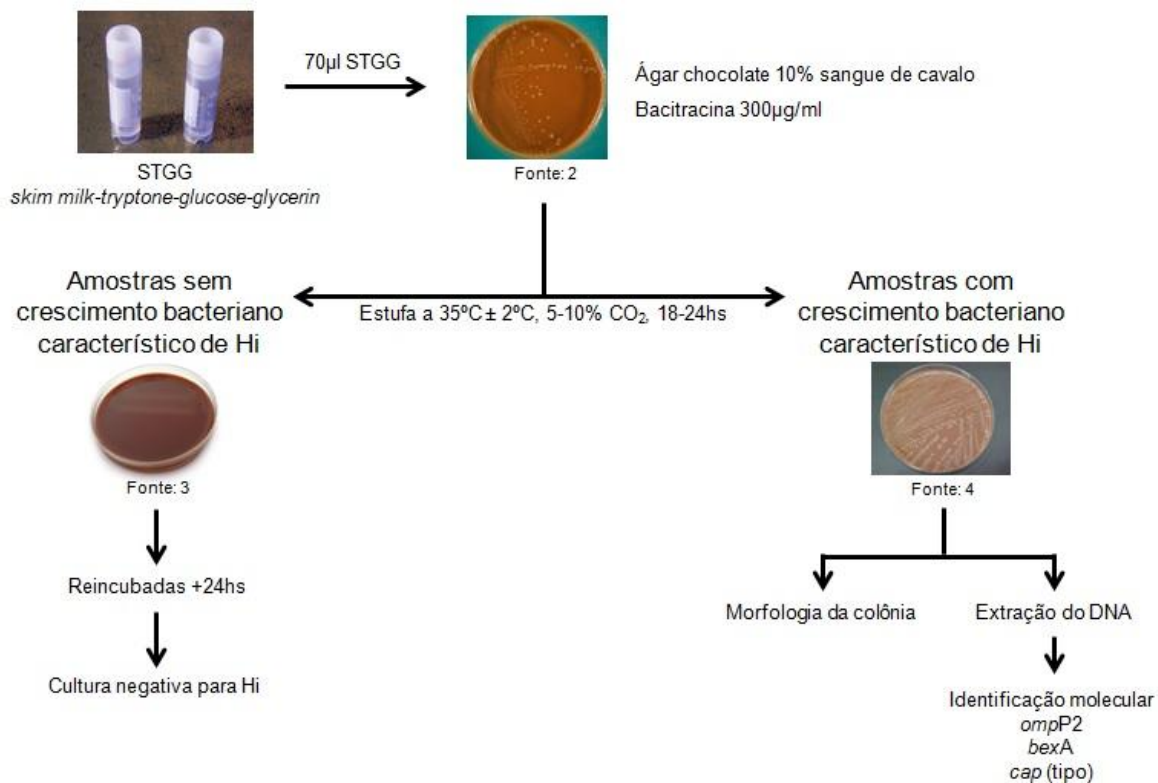
1) Cultura e identificação de Hi das 2.558 amostras de secreção de NF previamente realizadas pelo NMPI do IAL

a) Coleta da secreção de NF, seu transporte e armazenamento em meio STGG.



Fonte da figura: 1: Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE) (disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/pdf/coqueluche11_protocolo_coleta_transporte.pdf, acessado em 21 de maio de 2013).

b) Cultura bacteriana



Fonte das figuras:

2:

http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=3&materia_id=169&materiaver=1, acessado em 18 de setembro de 2013.

3:

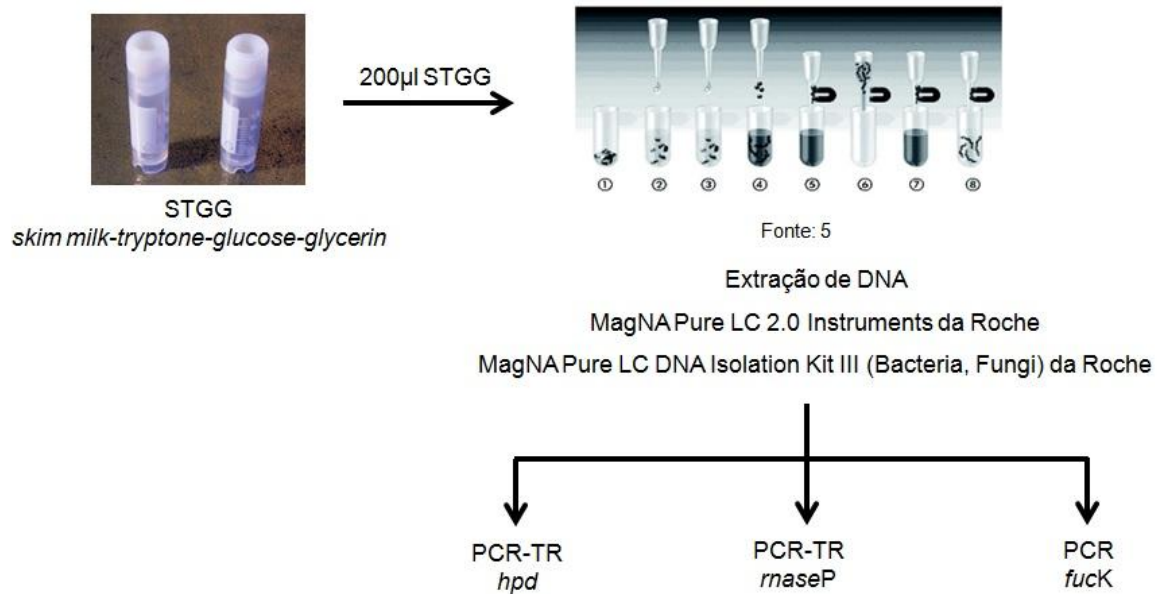
<http://www.biomedicinapadiao.com/2011/11/guia-meios-de-cultura-para-bacterias.html>, acessado em 18 de setembro de 2013.

4:

<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt09-id-characterization-hi.html>, acessado em 18 de setembro de 2013.

2) 410 amostras de secreção de NF, previamente analisadas pela cultura pelo NMPI, foram selecionadas aleatoriamente para o estudo da avaliação da PCR-TR em identificar Hi

a) Extração do DNA da amostra clínica e os ensaios moleculares realizados.

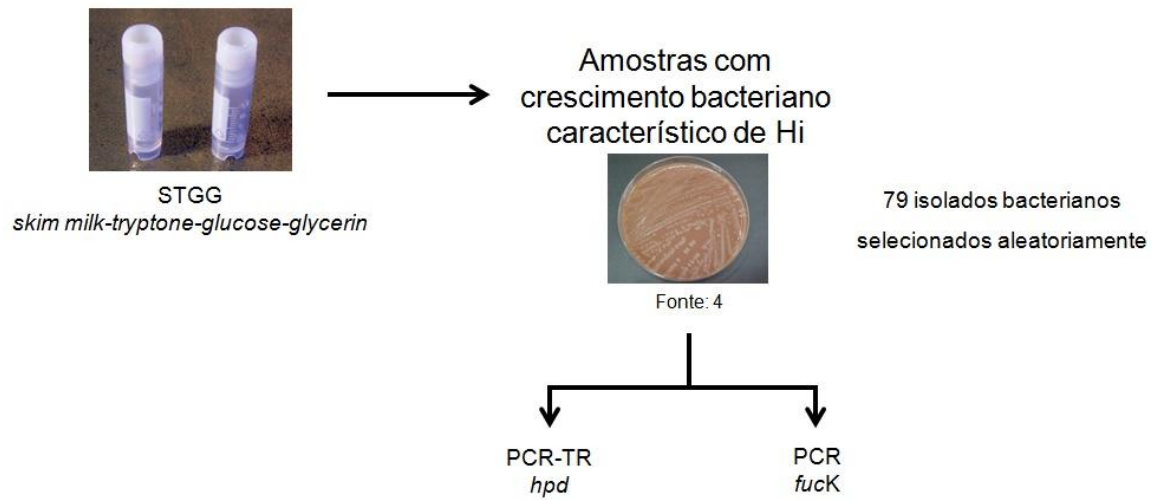


Fonte da figura:

5:

https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/03264785001_en_07.pdf, acessado em 18 de setembro de 2013.

b) 79 isolados bacterianos selecionados para a confirmação de identificação de Hi.



Fonte da figura:

4:

<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt09-id-characterization-hi.html>, acessado em 18 de setembro de 2013.

Identificação: _____

Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo de portador de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) em crianças saudáveis vacinadas com a vacina de Hib no município de São Paulo, Brasil.

Prezado Sr. /Sra:

O *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) são bactérias que podem estar presentes na narina posterior (fundo do nariz) sem causar doença. Estas bactérias se transmitem de uma pessoa a outra pessoa pelas vias respiratórias, porém em algumas pessoas estas bactérias podem, às vezes, produzir meningite, pneumonia e outras infecções graves.

No ano de 2000, o Ministério da Saúde do Brasil incorporou uma vacina contra Hib no programa nacional de vacinação para crianças até 5 anos. Esta vacina é gratuita para todas as crianças do Brasil. Esta vacina contra Hib protege as crianças contra infecções graves causada pelo Hib além de impedir que esta a bactéria se aloje no nariz.

O Ministério da Saúde do Brasil decidiu avaliar o efeito da vacinação contra Hib. Este estudo também está sendo realizado em diferentes países da América Latina. A avaliação será feita por meio de dois componentes: 1- Um componente investigará os casos de meningites por Hib antes e depois da introdução da vacina; 2- outro componente será realizado pela investigação da presença de Hib no nariz de crianças com 1 e 5 anos, que tenham recebido a vacina de Hib. Também vamos pesquisar a presença do pneumococo no nariz.

A pesquisa envolve a coleta da secreção do nariz com o uso de um cotonete muito fino e flexível. Este procedimento é indolor e causa apenas um desconforto muito pequeno que dura 20-30 segundos, sem risco à saúde. A seguir, esta secreção é colocada em um tubo com meio de transporte, o qual será encaminhado ao laboratório de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz para exames, com o objetivo de verificar se a criança é portadora de Hib e/ou pneumococo no nariz. Os resultados serão divulgados apenas no meio científico e sem identificação dos participantes. Os resultados dos exames também serão enviados para o responsável da criança, via os centros de vacina.

Informamos que a presença destas bactérias Hib e/ou pneumococo na narina de seu filho não ocasiona qualquer risco a saúde dele e nem implicará em tratamento, pois as pessoas são normalmente portadoras destas bactérias no nariz.

As bactérias Hib ou pneumococo detectadas nas crianças serão armazenados no Instituto Adolfo Lutz, laboratório da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, para estudos posteriores de tipagem e realização de testes para observar a ação dos antibióticos. Estes resultados integrarão a rede de vigilância da resistência destas bactérias no Brasil. No entanto, as amostras de seu filho poderão ser destruídas a qualquer momento mediante sua solicitação.

Não há benefício esperado para seu filho pela participação neste estudo. Entretanto, a participação de seu filho pode ajudar outras crianças por fornecer informações que contribuirão para o conhecimento do efeito da vacinação contra o Hib nas crianças brasileiras. A coleta da secreção da narina e os testes de laboratório serão realizados sem nenhum custo para você.

Gostaríamos de convidar seu filho/filha, ou a criança sob vossa tutela, a participar deste estudo de portador de Hib e pneumococo que será realizado no nosso país. A participação é completamente voluntária e requer uma autorização livre e esclarecida da mãe ou do pai ou do representante legal da criança. Se seu filho ou crianças que você acompanha se recusar a participar, seu filho ou a criança terá o mesmo atendimento que você veio procurar.

Atenciosamente,

Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo

Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo de portador de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) em crianças saudáveis vacinadas com a vacina de Hib no município de São Paulo, Brasil.

Caso você autorize que seu filho (filha ou criança que acompanha) participe deste estudo, por favor, complete os dados seguintes nesta declaração.

Eu, _____

Nome completo da pessoa a quem se entrega o documento (pai, mãe ou representante legal)

Declaro que li e compreendi os procedimentos do estudo e que tive a possibilidade de fazer perguntas para solucionar minhas dúvidas. Dou voluntariamente o meu consentimento para que meu filho, filha ou criança que acompanho,

Nome completo da criança participante do estudo

participe deste estudo de portador de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo). Entendo que a pessoa encarregada do estudo revisará os dados de vacinação de meu filho (filha ou criança que acompanho), fará a coleta de uma amostra de secreção do nariz para investigar no laboratório, e aplicará um questionário sobre meu grupo de família ou da família do participante.

Assinatura da pessoa a quem se entrega o consentimento

Data: ____ de _____ de ____ (dia/mês/ano)

Nome completo do profissional que obteve o consentimento

Data: ____ de _____ de ____ (dia/mês/ano)

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento

Data: ____ de _____ de ____ (dia/mês/ano)

Pessoas que podem dar informação adicional:

Dra. Telma Carvalhanas, Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória, Centre de Vigilância Epidemiológica, CVE-CCD, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Tel: 3066-8757 / 3066-8236

Dra. Ana Freitas, Centro de Vigilância Epidemiológica, CVE-CCD, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo Tel: 3066-8741 / 99187333

Dra. Helena Sato, Imunizações, CCD, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Tel: 3066-8599 / 91195520

Dra. Rachel Maria Borelli Paradella, Grupo das Doenças de Transmissão Respiratória, CCD-COVISA, Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo Tel: 3350-6743

Dra. Maria Ligia B. R. Neger, Sub-Gerência de Imunizações, CCD-COVISA, Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo Tel: 3350-6745

Dra. Maria Cristina de Cunto Brandileone, Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, CCD, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo Tel: 3068-2894

Se você tiver perguntas sobre os direitos de seu filho como integrante da pesquisa, por favor, ligue para o Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP. Tel: 3061-7779

Para proteger os direitos e segurança de seu filho ou acompanhante, informamos que estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos.


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

 Universidade de São Paulo
 Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/132/09

PROTÓCOLO	1969
PROJETO DE PESQUISA	ESTUDO DE PORTADOR DE <i>Haemophilus influenzae</i> TIPO B (Hib) E <i>Streptococcus pneumoniae</i> EM CRIANÇAS VACINADAS COM A VACINA Hib NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, BRASIL
PESQUISADOR(A)	Maria Cristina de Cunto Brandilione
ÁREA TEMÁTICA	Grupo III

São Paulo, 24 Abril de 2009.

Prezado(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – COEP analisou, em sua 3.709 Sessão Ordinária, realizada em 17/04/2009, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – CNS e suas complementares, o protocolo de pesquisa acima intitulado e o considera **APROVADO**.

Cabe lembrar que conforme Resolução CN/196/96, são **deveres** do (a) pesquisador (a):

1. Comunicar, de imediato, qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa;
2. Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP, no caso eventual auditoria;
3. Comunicar, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto;
4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
5. Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Cláudio Leone

Professor Associado
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP
 Ilm.º Sr.º
 Prof.ª Maria Cristina de Cunto Brandilione
 Instituto Adolfo Lutz

 A/C
 Ilm.º Sr.
 Prof. Dr. Eliseu Alves Waldman
 Departamento de Epidemiologia
 Faculdade de Saúde Pública



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



CTC-095/2009

CADASTRO PROVISÓRIO DE PROJETO DE PESQUISA

Projeto nº 000P-BM-12731/2008

Estudo de portador de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e *Streptococcus pneumoniae* em crianças vacinas com a vacina de Hib no Município de São Paulo, SP, Brasil

Coordenação: Maria Cristina de Cunto Brandileone

CCD-BM

Comunicamos que o projeto supra citado apresenta **cadastro provisório** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz até que este Comitê receba a aprovação quanto o mérito científico pela CCD-BM e quanto aos aspectos éticos pela CEPIAL.


ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 06 de Janeiro de 2009



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

NMPI -Doc Nº 45/2012

São Paulo, 05 de novembro de 2012.

Aos cuidados
Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Costa Pires
Coordenadora do PPG - CCD

Prezada coordenadora,

venho por meio desta justificar a diferença entre o título do projeto desenvolvido pela aluna Cinthya Terumi e o título do projeto aprovado pela comissão de ética apresentado no ato de sua inscrição. Conforme registrado no curso da Pós-graduação, a aluna acima citada havia ingressado neste curso com o aceite de outro orientador e conseqüentemente com outro projeto a ser desenvolvido. No entanto, durante a execução de suas atividades, por motivos particulares, houve um desligamento entre a aluna e seu orientador.

Para que a aluna e o curso de Pós-graduação da CCD não fossem prejudicados, aceitei-a como orientanda para executar um dos objetivos de um projeto maior que estava em andamento já aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Saúde Pública.

Assim sendo, coloco-me a disposição para maiores esclarecimentos se forem necessários.

Atenciosamente,


Rosemeire C. Zanella Ramos
Pesquisador Científico
Instituto Adolfo Lutz
CRBM 2127

Evaluation of real-time PCR assay for *Haemophilus influenzae* detection in nasopharyngeal samples from healthy children

Ogassavara CT^{1*}, Lemos APS¹, Gorla MCO¹, Almeida SCG¹, Brandão AP^{1,2}, Fiorio CE¹, Andrade AL³, Brandileone MCC¹, Zanella RC¹

¹Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP; ²Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ;

³Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

*e-mail: cinthyaterumi@gmail.com

Keywords: *Haemophilus influenzae*, carriage, bacterial culture, PCR, *hpd*.

Haemophilus influenzae (Hi) colonizes the human nasopharynx (NP) and eventually can cause diseases in susceptible individuals. Culture is the gold standard method to detect Hi in clinical samples, but molecular techniques provide increase sensitivity. Several biomarker genes were assessed for the diagnosis of Hi such as *hpd#3* RT-PCR assay targeting the protein D gene to detect encapsulated and non-encapsulated Hi strains. The aim of this study was to evaluate the accuracy of *hpd#3* RT-PCR to detect Hi in NP samples of healthy children. A total of 410 NP swabs stored in STGG medium were randomly selected and tested in parallel by culture and RT-PCR. Considering the 410 NP swabs, 161 (39.2%) samples were positive for Hi and 249 (60.8%) had negative RT-PCR. By culture, 166 (40.5%) samples were positive for Hi and 244 (59.5%) were negative. Thus, the *hpd#3* RT-PCR showed a sensitivity of 90.9% (95% CI: 85.3 - 94.7) and a specificity of 95.9% (95% CI: 92.4 - 97.9) when compared to culture to detect Hi in NP swabs. We conclude that the use of RT-PCR using *hpd#3* molecular markers is an important tool to detect Hi and can be used in studies of population-based carriage to assess the effect of the Hi vaccine.

Introduction

Hi is a commensal microorganism which may be present in the human nasopharynx (NP) being a prerequisite for transmission and development of disease in susceptible individuals (Poyrazoglu et al., 2005; Oguzkaya-Artan et al., 2007; Hotomi et al., 2010). In the clinical laboratory, Hi needs to be detected, and also to be differentiated from closely related *Haemophilus* spp. For the detection, culture has been the “gold standard”, but now nucleic acid-based methods provide increased sensitivity. Real-time PCR (RT-PCR) is a powerful tool for detection of human pathogens because of the high sensitivity and specificity (Wu et al., 2013).

Several biomarker genes have been assessed for detection of Hi (Nørskov-Lauritsen, 2009; Theodore et al., 2012; Binks et al., 2012). Recently, a RT-PCR assay targeting the protein D gene (hpd#3) to detect both non-encapsulated and encapsulated Hi strains from meningitis cases was standardized (Wang et al., 2011; Wang et al., 2012).

Studies on NP carriage rates are frequently used to assess the effects of conjugate vaccines. So, the correct identification of Hi from the NP is crucial to determine carriage rates and the effect of conjugate vaccines. Effective conjugate vaccines against Hi type b (Hib) have been used widely, altering the global epidemiology of Hi infections. This vaccine reduced drastically the incidence of disease caused by Hib, and also reduced the nasopharynx (NP) colonization by Hib. The decrease of the Hib colonization in NP can lead to increase of the colonization by non vaccine type of Hi or other bacterial species (Takala et al., 1991; Murphy et al., 1993; Hviid et al., 2004; Carvalho et al., 2011).

Faced with this new epidemiological situation, this study aims to evaluate the use of hpd#3 RT-PCR for the detection of Hi in NP samples from healthy children.

Material and methods

Clinical samples

A total of 410 randomly single NP swabs were selected from 2.558 swab samples collected and stored in transport medium STGG at -70°C. These swab samples were collected from healthy children in nasopharyngeal survey which was held in 2010 in Brazil. This study was carried with the approval of the Ethical Committee of the Faculty of Public Health of São Paulo (protocol Of.COEP/132/009) and written an informed consent was requested from all families before taking nasopharyngeal swabs.

An aliquot of 70µl from STGG sample was plated onto 10% chocolate agar plates supplemented with 300 µg/mL bacitracin. The plates were incubated at 35-37°C for 48h in an atmosphere containing 5% CO₂. One colony showing the typical morphology, i.e., smooth, grayish and wet, were selected. The identification of Hi was performed by conventional PCR using primers based on DNA sequences for three genes for *H. influenzae*: *ompP2* (Hobson et al., 1995), *bexA* and *cap* (Falla et al., 1994).

DNA was extracted from 200 µl NP samples using the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with a MagNA Pure LC 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). A water sample (negative control) was also extracted each time of DNA extraction procedure. The negative control was performed on unknown specimen to ensure that the positive result of hpd#3 RT-PCR is not attributed to cross reactivity during the process of DNA extraction. The hpd#3 RT-PCR was performed as described previously by Wang et al., 2011.

NP samples were tested in parallel by culture and RT-PCR. Culture was considered as gold standard method for sensibility and specificity calculations. Positivity for Hi detection was

calculated in percentages. Concordance between laboratory techniques was calculated by kappa coefficient (Cohen, 1960) and CI95% was calculated by McNemar's chi-square test (McNemar, 1947).

Results

Considering the 410 NP swabs, a total of 166 (40.5%) Hi isolates were identified by culture; 244 (59.5%) had negative cultures. By hpd#3 RT-PCR, 161 (39.2%) samples were positive for Hi and 249 (60.8%) were negative (Table1). Of the 161 positive samples by hpd#3 RT-PCR, 10 were culture negative. However, of the 249 samples negative by hpd#3 RT-PCR, fifteen (6%) of them were positive for culture. The confirmation of these 15 isolates identified as NTHi by Falla et al. (1994) was performed using defined DNA extraction methods (van Ketel, 1990) and hpd#3 RT-PCR assay (Wang et al., 2011). Only two NTHi isolates returning negative hpd#3 RT-PCR results and were considered as non-Hi. Taking into account the both methods together, the positivity of Hi was about 40% and a strong positive correlation was seen by Kappa index (0.873). The hpd#3 RT-PCR showed a sensitivity of 90.9% (95% CI:85.3-94.7) and a specificity of 95.9% (95% CI:92.4-97.9) when compared to the culture to detect Hi in NP swabs.

Discussion

The RT-PCR assay targeting the *Haemophilus influenzae* protein D gene (*hpd*) has been developed to identify accurately the microorganism. This hpd#3 RT-PCR assay has been showed to be highly specific for Hi and providing a potential tool to differentiate from closed species. In this study the use of hpd#3 RT-PCR assay showed high sensitivity (90.9%) and specificity (95.9%) for Hi detection compared with the culture among NP swabs from health children. The positivity of 40% was found in the two laboratory

techniques, similar to other NP studies performed in other settings.

Hare et al. (2013) conducted a study to detect lower airway infection by HiNT using culture as the gold standard and quantitative hpd#3 RT-PCR (hpd#3 qPCR) in children with bronchiectasis. They found a positivity of 36% by culture and 49% by hpd#3 qPCR and a sensitivity and specificity of 93% and 75%, respectively. In another study conducted to evaluate the association between the presence of Hi in the nose and otitis media cases, 59% were positive for Hi by culture and 82% by qPCR (Smith-Vaughan-2006). However, the two techniques were highly correlated when evaluated by Spearman coefficient. In this study 4% of the samples was qPCR-negative but culture-positive, similar result found in our study. This difference in performance can be explained by the possible presence of an unknown inhibitor of the RT-PCR process or insufficient amount of DNA in these samples.

Bacterial culture remains as the gold standard for diagnosis of invasive Hi disease, when the number of cases is rare. However, hpd#3 RT-PCR assay is more rapid, saving time during survey studies when huge sampling is collected. The use of a sensitive and specific tool is very important to monitor the effect of Hib vaccine, to monitor changes in the Hi epidemiology and to inform any future vaccination policy.

We can conclude that the use of hpd#3 RT-PCR assay is an important tool for Hi identification and can be used in studies to assess the impact carrier vaccine.

References

Binks MJ, Temple B, Kirkham LA, Wiertsema SP, Dunne EM, Richmond PC, et al. Molecular surveillance of true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays. *PLoS One*. 2012; 7(3):e34083.

Carvalho CX, Kipnis A, Thörn L, Andrade JG, Pimenta F, Brandileone MC, et al. Carriage of *Haemophilus influenzae* among Brazilian children attending day care centers in the era of widespread Hib vaccination. *Vaccine*. 2011; 29(7):1438-42.

Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. 1960; 20:37-46.

Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:2382-6.

Hare KM, Marsh RL, Binks MJ, Grimwood K, Pizzutto SJ, Leach AJ, et al. Quantitative PCR confirms culture as the gold standard for detection of lower airway infection by nontypeable *Haemophilus influenzae* in Australian Indigenous children with bronchiectasis. *J Microbiol Methods*. 2013; 92(3):270-2.

Hobson RP, Williams A, Rawal K, Pennington TH, Forbes KJ. Incidence and spread of *Haemophilus influenzae* on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction. *Cambr Univ Press*. 1995; 114:93-105.

Hotomi M, Arai J, Billal DS, Takei S, Ikeda Y, Ogami M, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from intractable acute otitis media internalized into cultured human epithelial cells. *Auris Nasus Larynx*. 2010; 37(2):137-44.

Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Childhood vaccination and type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2004; 350(14):1398-404.

McNemar Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika*. 1947; 12(2):153-7.

Murphy TV, White KE, Pastor P, Gabriel L, Medley F, Granoff DM, et al. Declining incidence of *Haemophilus influenzae* type b disease since introduction of vaccination. *J Am Med Assoc.* 1993; 269:246–8.

Nørskov-Lauritsen N. Detection of cryptic genospecies misidentified as *Haemophilus influenzae* in routine clinical samples by assessment of marker genes *fucK*, *hap*, and *sodC*. *J Clin Microbiol.* 2009b; 47(8):2590-2.

Oguzkaya-Artan M, Baykan Z, Artan C. Carriage rate of *Haemophilus influenzae* among preschool children in Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2007; 60(4):179-82.

Poyrazoglu S, Kömeç S, Gökçay G, Ongen B. *Haemophilus influenzae* type b carriage among 3- to 24-month-old Turkish children. *Epidemiol Infect.* 2005; 133(6):1113-7.

Smith-Vaughan H, Byun R, Nadkarni M, Jacques NA, Hunter N, Halpin S, et al. Measuring nasal bacterial load and its association with otitis media. *BMC Ear Nose Throat Disord.* 2006; 6:10.

Takala A, Eskola J, Leinonen M, Käyhty H, Nissinen A, Pekkanen E, Mäkelä PH. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 1991; 164(5):982-6.

Theodore MJ, Anderson RD, Wang X, Katz LS, Vuong JT, Bell ME, et al. Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4):1422-4.

van Ketel RJ, Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol.* 1990; 33(4):271-6.

Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, et al. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitidis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(4):303-9.

Wang X, Theodore MJ, Mair R, Trujillo-Lopez E, du Plessis M, Wolter N, et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(3):702-8.

Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, Carvalho M, Azevedo J, Oliveira TQ, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:26.

Table1. *Haemophilus influenzae* identification in 410 nasopharyngeal swabs from Brazilian healthy children by culture and *hpd#3* RT-PCR.

RT-PCR (<i>hpd#3</i>)	Culture				Total	
	Positive		Negative			
	n	%	n	%	n	%
Positive	151	36,8	10	2,4	161	39,2
Negative	15	3,7	234	57,1	249	60,8
Total	166	40,5	244	59,5	410	100

Using culture as the gold standard, *hpd#3* RT-PCR sensitivity is 90.9% (95% CI:85.3-94.7) and specificity 95.9% (95% CI:92.4-97.9).