



Haemophilus influenzae

M^a Paula Bajanca-Lavado

**Laboratório Nacional de Referência de
Infeções Respiratórias - agentes bacterianos**

**Departamento de Doenças Infeciosas
Instituto Nacional de Saúde
Lisboa**

Alteração à epidemiologia da Infecção a *Haemophilus influenzae*, após a introdução da vacina para o *H. influenzae* serotipo b. Análise de estudos realizados no INSA, 1989-2012.

ÍNDICE

- * Resultados de trabalhos realizados e apresentados ao longo dos anos**
- * Projetos em curso**
- * O *Haemophilus influenzae*: o que é? o que provoca? técnicas utilizadas para a sua caracterização**
- * Projetos a desenvolver, no âmbito de tese de mestrado**

- ✿ Infecção invasiva a *Haemophilus influenzae* em Portugal. Conferência INSA, 2012.
- ✿ O *Haemophilus influenzae* não capsulado como agente responsável por conjuntivites em crianças. 12º Congresso Nacional de Pediatria, 2011.
- ✿ NTHi - O contributo do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Respiratórias a agentes bacterianos. Conferência GSK, 2009.
- ✿ Caracterização do mecanismo de resistência não enzimático à ampicilina em estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas em Portugal. I Congresso Nacional Saúde Pública, 2009.



Projetos em curso:

- ✿ "Epidemiologia molecular e caracterização da resistência aos antibióticos em estirpes de *H. influenzae* isolados em Portugal". Projeto INSA, iniciado em 1998.
- ✿ "Vigilância clínica e epidemiológica da doença invasiva por *H. influenzae* na Criança". Projeto INSA/Sociedade Portuguesa de Pediatria, 2010-2015.
- ✿ "Caracterização molecular de *H. influenzae* recorrendo a uma técnica de tipagem: *Multilocus sequencing typing (MLST)*". Projeto INSA/DDI; 2011.

Projetos em curso (continuação)

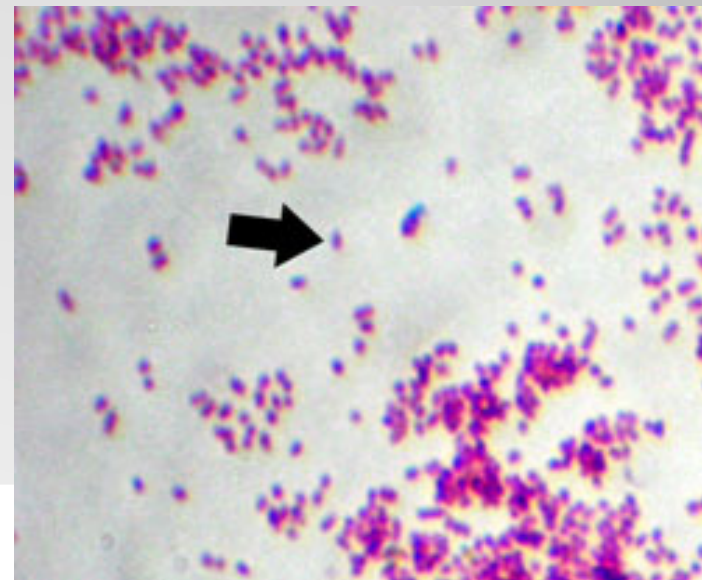
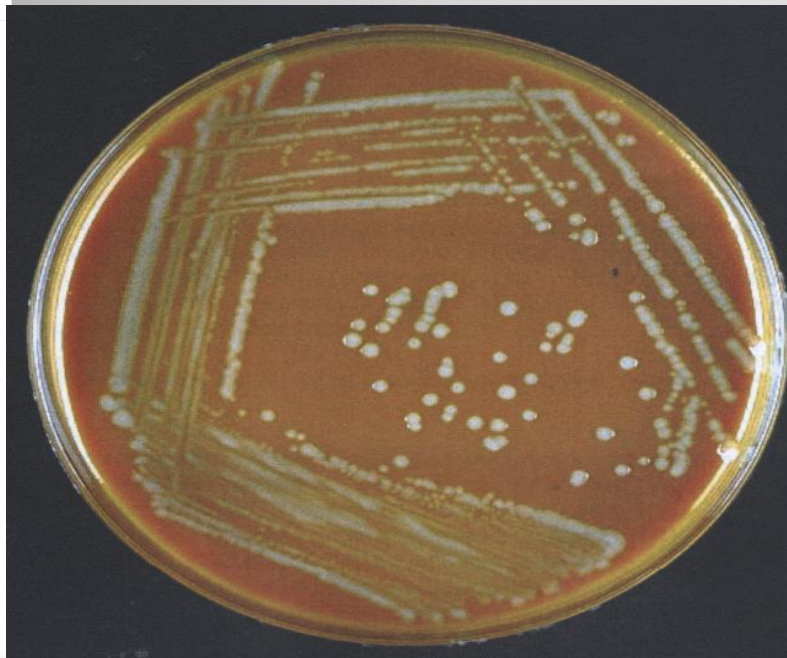
✿ "Insights into the ecology of the nasopharynx: impact of pneumococcal conjugate vaccines and epidemiology of *H. influenzae*." Projeto de pós-doutoramento, em colaboração com o ITQB, 2013-2015.

✿ "Molecular epidemiology of *H. influenzae* strains with and without altered PBP3 in a restricted patient cohort". Projeto URIR agentes bacterianos / University of Tasmania, Abril 2012-



❁ O *Haemophilus influenzae* é um microrganismo Gram negativo cujo nicho ecológico é o trato respiratório humano.

❁ Para além de colonizar a nasofaringe de pessoas saudáveis, o *H. influenzae* é normalmente responsável por infeções respiratórias e ainda infeções invasivas graves como a meningite e a septicemia, principalmente nas crianças.





- Há seis tipos serológicos de *Hi*, os serotipos **a, b, c, d, e, e f**. Estes serotipos são baseados na estrutura antigénica dos polissacarídeos capsulares, reconhecidos pelo sistema imunitário do hospedeiro
- Nas décadas de setenta e oitenta, as estirpes capsuladas, nomeadamente de serotipo b (Hib) estavam envolvidas em mais de 90% das infeções invasivas, com graves repercussões em Saúde Pública



- ✿ Uma grande percentagem destas estirpes era ainda multirresistente
- ✿ O desenvolvimento de uma vacina para o Hib e a sua introdução no Programa Nacional de Vacinação (PNV) da maior parte dos países desenvolvidos, demonstrou a elevada eficácia desta vacina, levando à quase total erradicação do serótipo b
- ✿ Em Portugal, a vacina é comercializada desde 1994, fazendo parte do PNV desde 2000



Com a introdução da vacina no PNV prevê-se:

- ✿ Detecção de estirpes deficientes em cápsula: b- (não apresentam cápsula, mas mantém a virulência das estirpes b)
- ✿ Aquisição de maior virulência por outros serotipos de *Hi*: a, c, d, e, f
- ✿ Aumento das infeções invasivas devido a estirpes NC (Emergência de NC!)
- ✿ Emergência dos outros serotipos como patogénios importantes nas crianças
- ✿ Aumento de infeções invasivas nos adultos



A diminuição das estirpes de serótipo b determinou um aumento da susceptibilidade aos antibióticos.

Assim, assistimos a:

- ✿ Ausência de estirpes multirresistentes aos antibióticos
 - ✿ Não detetamos um fenótipo de MR (Amp/Cm/Tc) desde 1994
- ✿ Daí a extrema importância da vigilância da resistência aos antibióticos, devido à crescente deteção de estirpes BLNAR, as quais poderão ser responsáveis por falências terapêuticas.



Técnicas de Biologia Molecular

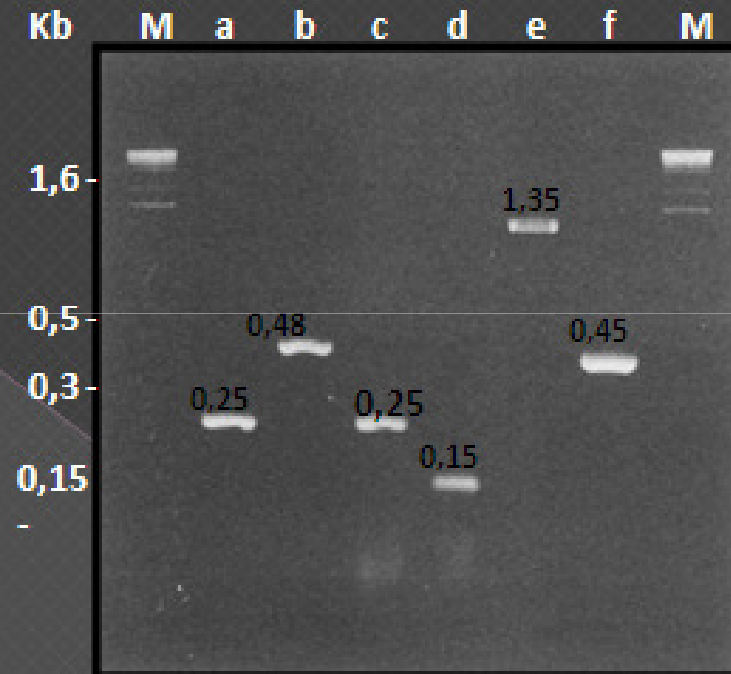
- ✿ **PCR tempo real**
- ✿ **PCR convencional**
- ✿ **Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE**
- ✿ **Amplificação e sequenciação:**
 - ✿ **Detecção de mutações**
 - ✿ **Multi Locus Sequencing Typing (MLST)**



Método de Referência / Caracterização do Serotipo Capsular



Electroforese em gel de agarose com produtos de PCR de *H. influenzae*, resultantes da amplificação do gene *hexA*. Linha 1: Estirpe padrão capsulada; linha 2: *H. influenzae* não capsulado; M: MW de 1114 pb a 19 pb.

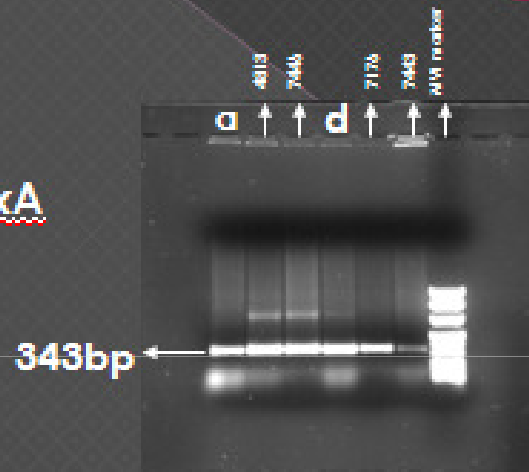


Electroforese em gel de agarose com produtos de PCR de *H. influenzae*: capsulados tipo a, b, c, d, e, f. As linhas designadas por M contêm marcador de massa molecular 1-Kb

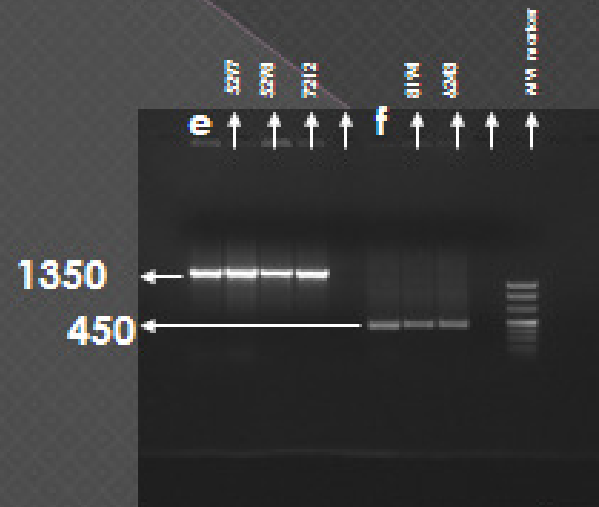
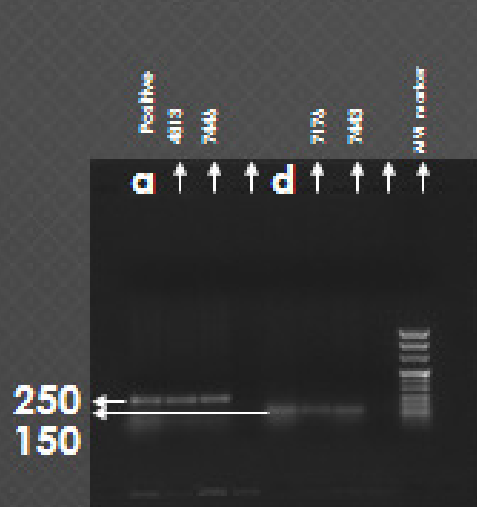


Metodologia para Serotipagem: PCR Convencional

BexA

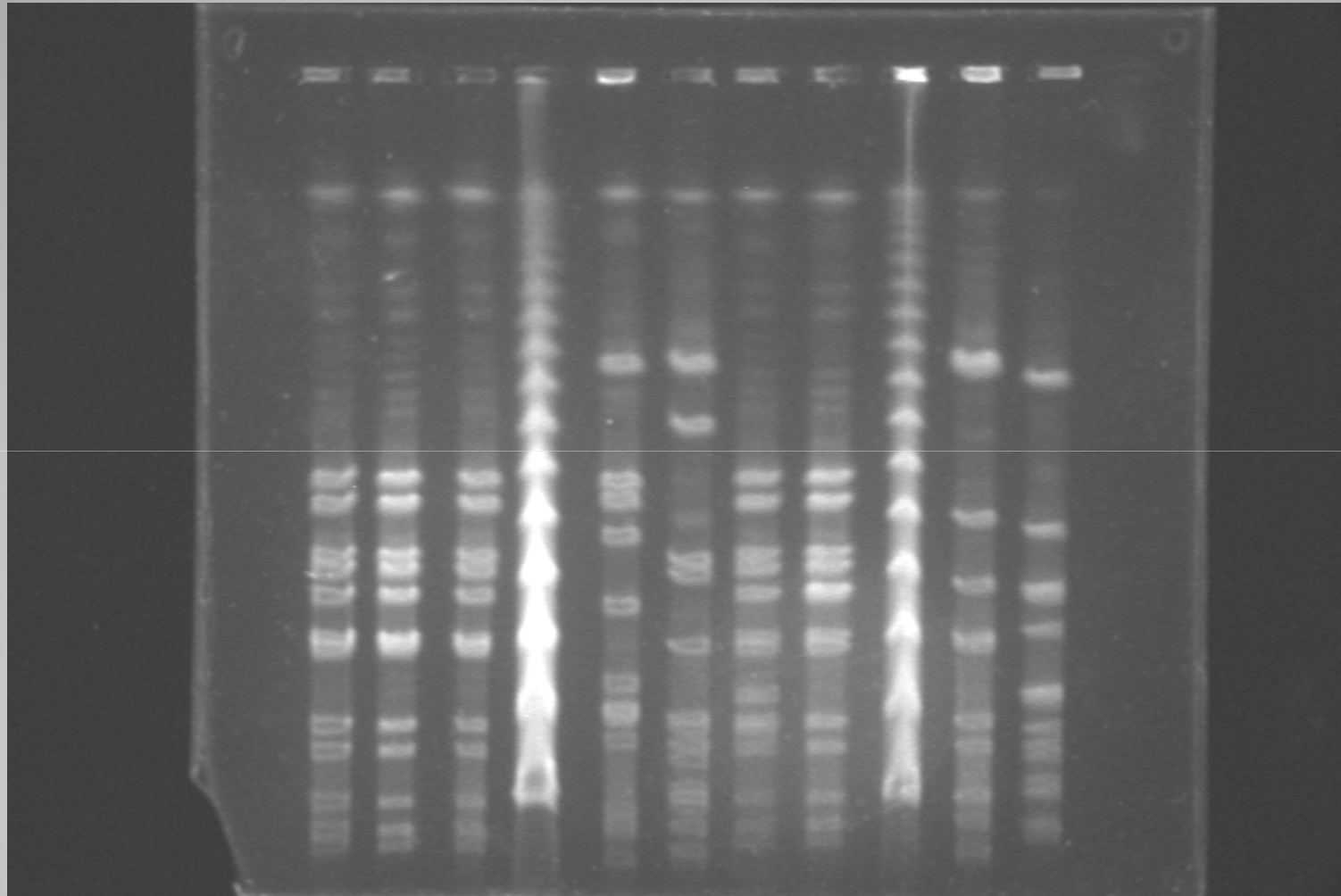


a.d.e.f





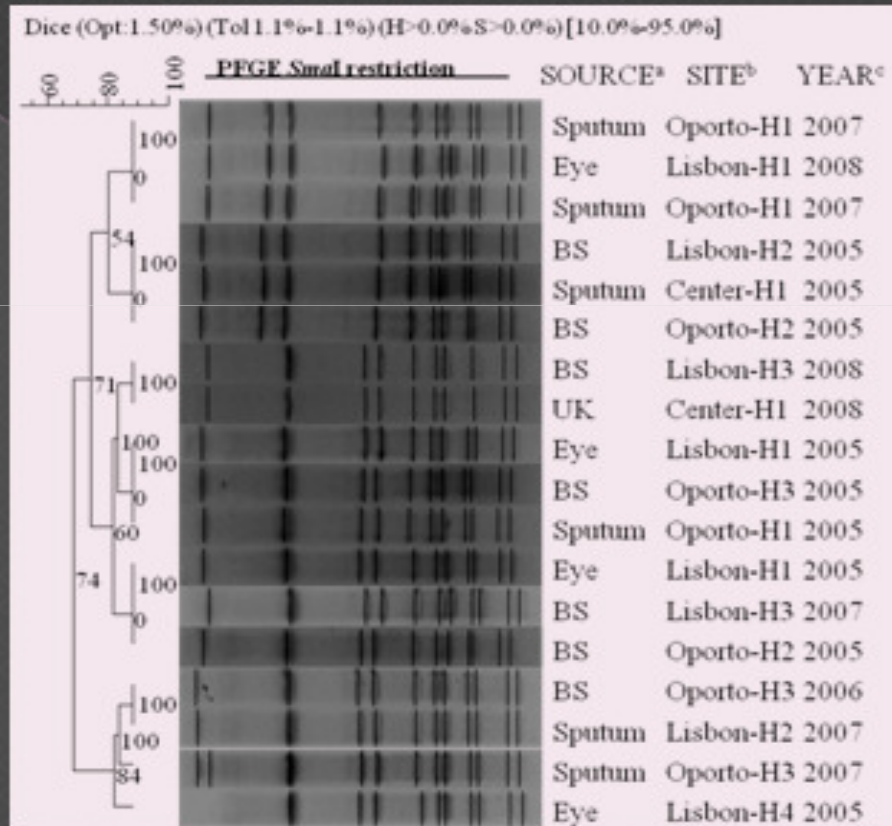
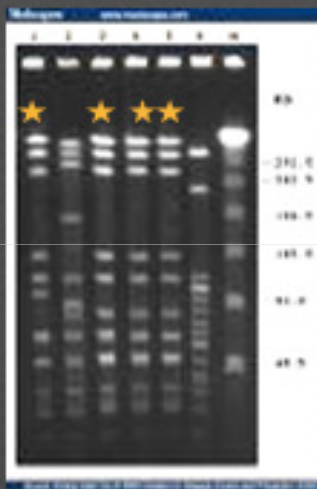
Gel de PFGE

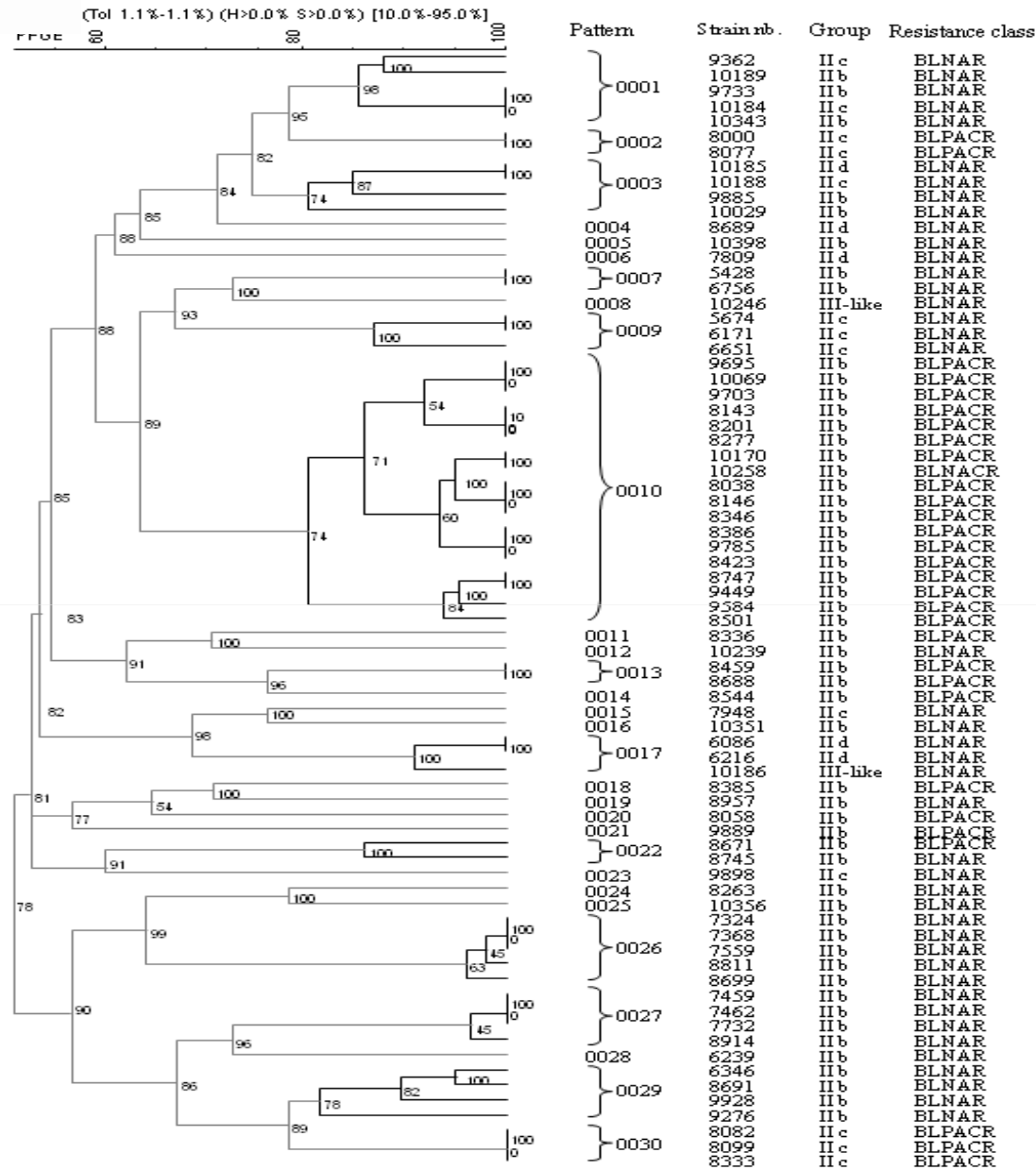




PFGE/ Estudos de Clonalidade (surtos) e Disseminação da Infecção

Exemplo de disseminação de um clone BLPACR







Proposta de Projetos de Investigação

✿ “Caracterização epidemiológica da infeção por *Haemophilus influenzae* capsulados no período pós-vacinal”

✿ “Evolução da resistência enzimática e não enzimática à ampicilina em *Haemophilus influenzae* isolados em Portugal: 2010-2012”

paula.lavado@insa.min-saude.pt