

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

*mestrado*

**BC/50117**

**IB/ 81806**

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Universidade Estadual de Campinas



Marcelo Lancellotti

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E  
VARIAÇÃO CLONAL DE LINHAGENS DE *Haemophilus  
influenzae* ISOLADAS DE PACIENTES DO HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
UNICAMP**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Marcelo Lancellotti</i> <i>Marcelo Lancellotti</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
---

*W. Dias da Silveira*

Dissertação apresentada  
ao Instituto de Biologia  
para obtenção do título  
de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular na  
área de Concentração de  
Microbiologia

**Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira  
- 2002 -**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IB/FLC  
Nº CHAMADA 7/UNICAMP  
L222e  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 50.117  
PROC 16.837/02  
C \_\_\_\_\_ DX \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 30/07/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00170720-3

513 12 2002 0000

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**L222e**

**Lancellotti, Marcelo**

Estudo das características biológicas e variação clonal de linhagens de *Haemophilus influenzae* isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP./ Marcelo Lancellotti. --  
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Wanderley Dias da Silveira  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

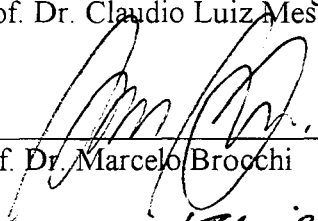
1. Adesão. 2. Antimicrobianos. 3. Filogenia. 4. Plasmídios. I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 20 de maio de 2002.



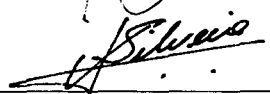
---

Prof. Dr. Claudio Luiz Messias



---

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



---

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

---

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

*“Dedico esta tese a todos aqueles que um dia foram da Ciência, que um dia perderam a vida tentando buscar a verdade, seja qual for o método, ramo, etnia, nacionalidade, idade ou sexo. O que foi feito, jamais poderá ser apagado..”*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Uma Força Maior por ter criado as bactérias, que são o objeto desse estudo e que nos fornece conhecimento e sabedoria, para que possamos lidar com estes seres;

Aos meus pais, irmão, irmãs (especialmente à saudosa Mary e à alegre Mariane) e sobrinhos, pela força e apoio durante todos esses anos de estudo, realmente vocês me ensinarem a encarar a vida de forma correta, apesar de sermos distantes;

Ao meu orientador Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, por ter me dado a oportunidade de desenvolver meu trabalho em sua equipe;

Aos meus amigos-irmãos mais velhos: André Garcia, Fabiana Bianchini, Luciana Maria de Hollanda, realmente vocês são pessoas que me ajudaram nas horas em que mais precisei;

Aos amigos-irmãos mais novos: Fábio, Jonatan, Lilian, Luiz, Melissa, Paul, Poly e Thales, que tiveram que me agüentar. Me sinto responsável por vocês e nunca se esqueçam disso;

Agradeço especialmente à Fernanda Mariana Tomazini;

Aos amigos de cantina: Cínthia, Luiz Fernando(Piá), Lucas, Sandra, José Carlos (Zé), Alexandre (Colombo), Julia, Eliane (Lilica), Karina (Kaká), Paola, Gustavo Thomazine, Gustavo Grigolon, Paola, Rebeca, Livia, pelos dias divertidos que passamos juntos;

Aos companheiros e funcionários do laboratório atualmente e aos que já passaram por lá: Alessandra, Isildinha, Tatiana, Eliana, Gláucia, Guilherme, Gustavo, Eunice, Paromita, Cissa, Fabiane, Luciana Leomil.

Aos docentes e funcionários do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, especialmente a Profa. Dra. Maria Cecília B. Villares;

Aos atualmente professores doutores e antigos colegas de trabalho: Fabiana Fantinatti, Marcelo Brocchi e Sérgio de Mendonça, devo grande parte do que sei hoje a vocês;

À minha pré-banca composta pelos professores: Cláudio Luiz Messias, Marcelo de Carvalho Ramos e Tomomasa Yano;

Ao curso de Genética e Biologia Molecular;

À FAPESP (Proc. Número: 00/01882-7);

À UNICAMP, especialmente ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia;

Aos docentes Clarice Weiss Arns, Maria Sílvia Viccarri Gatti, Shirlei Maria Recco Pimentel, Tomomasa Yano, pelo apoio prestado nos momentos de necessidade.

A todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, me auxiliaram na produção deste trabalho científico e de vida.

# ÍNDICE GERAL

<b>INTRODUÇÃO</b>	01
<b>OBJETIVOS</b>	13
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	16
1 – Meios de Cultura	18
2 – Soluções	21
3 – Métodos	27
3.1 – Cultivo e Isolamento das Amostras	27
3.2 – Determinação da Mínima Concentração Inibitória a Antibióticos	27
3.3 – Análise do Perfil Plasmidial	28
3.4 – Teste de Adesão em Células HeLa, Hep-2, KB e Vero e células do Epitélio Bucal	29
3.5 – Extração de DNA Genômico	31
3.6 – Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	33
3.7 – Análise do Polimorfismo da Região 16S <i>rDNA</i> amplificada por PCR através do perfil de restrição	35
3.8 – Ribotipagem	35
<b>RESULTADOS</b>	42
01 – Biotipagem	43
02 – Sorotipagem	46
03 – Perfil de Resistência a Antimicrobianos	48
04 – Perfil Plasmidial	51
05 – Adesão a Células Cultivadas <i>in vitro</i>	54
06 – Detecção de Genes de Patogenicidade de <i>Haemophilus influenzae</i> por PCR	59

07 – Análise do Polimorfismo da Região 16S <i>rDNA</i> amplificada por PCR seguida de restrição	62
08 – Ribotipagem com a sonda de 16S <i>rDNA</i> amplificada por PCR	68
09 – Ribotipagem com sonda <i>pRR64</i>	74
10 – ERIC – PCR	81
 <b>DISCUSSÃO</b>	 88
 <b>CONCLUSÕES</b>	 98
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	 100

## ÍNDICE DAS FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Gráfico percentual dos biotipos de <i>Haemophilus influenzae</i> .	45
<b>Figura 02</b> – Sorotipos de <i>Haemophilus influenzae</i> por PCR	47
<b>Figura 03</b> – Multiresistência das Linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i>	50
<b>Figura 04</b> – Perfil Plasmidial	52
<b>Figura 05</b> – Adesão em Células cultivadas <i>in vitro</i>	57
<b>Figura 06</b> – Gráfico de Adesão em Células cultivadas <i>in vitro</i>	58
<b>Figura 07</b> – Genes de Patogenicidade Detectados por PCR ( <i>hmw</i> e <i>licI</i> )	60
<b>Figura 08</b> – Análise do Polimorfismo obtido com a amplificação por PCR da região 16S <i>rDNA</i> seguida de restrição	64
<b>Figura 09</b> – Zimogramas de digestão dos fragmentos de 16S <i>rDNA</i> de <i>H. influenzae</i>	65
<b>Figura 10</b> – Dendrograma da Análise da região 16S <i>rDNA</i> por restrição	66
<b>Figura 11</b> – Ribotipagem com a sonda 16S <i>rDNA</i> amplificada por PCR	70
<b>Figura 12</b> – Zimograma da Ribotipagem com a sonda 16S <i>rDNA</i> amplificada por PCR	71
<b>Figura 13</b> – Dendrograma da Ribotipagem com a sonda 16S <i>rDNA</i> amplificada por PCR	72
<b>Figura 14</b> – Ribotipagem com a sonda <i>pRR64</i>	76
<b>Figura 15</b> – Zimograma de Ribotipagem com a sonda <i>pRR64</i>	78
<b>Figura 16</b> – Dendrograma de Ribotipagem com a sonda <i>pRR64</i>	79
<b>Figura 17</b> – Perfil de ERIC-PCR	83
<b>Figura 18</b> – Zimograma do Perfil de ERIC-PCR	84
<b>Figura 19</b> – Dendrograma do Perfil de ERIC-PCR	85

## ÍNDICE DAS TABELAS

<b>Tabela I</b>	Linhagens Utilizadas como Padrão neste Estudo	17
<b>Tabela II</b>	Condições de Utilização dos Oligonucleotídeos de DNA	34
<b>Tabela III</b>	Linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> , Biotipos e Sorotipos	44
<b>Tabela IV</b>	Perfil de Resistência a Antimicrobianos das Linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i>	49
<b>Tabela V</b>	Pesos Moleculares dos Plasmídios das linhagens de <i>H. influenzae</i>	53
<b>Tabela VI</b>	Propriedades de Adesão a células cultivadas <i>in vitro</i>	56
<b>Tabela VII</b>	Tabela dos Genes <i>lic1</i> e <i>hmw</i> Detectados por PCR	61
<b>Tabela VIII</b>	Distribuição das linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> no Polimorfismo da Região 16S <i>rDNA</i> e Características Biológicas	67
<b>Tabela IX</b>	Distribuição das linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> na Ribotipagem com sonda obtida por amplificação e Características Biológicas	73
<b>Tabela X</b>	Distribuição das linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> na Ribotipagem com sonda <i>pRR64</i> e Características Biológicas	80
<b>Tabela XI</b>	Distribuição das linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> no ERIC-PCR e Características Biológicas	86
<b>Tabela XII</b>	Linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> e Características Biológicas Gerais	87

## RESUMO

Quarenta e cinco linhagens *Haemophilus influenzae*, isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, tiveram seu biotipo, sorotipo, resistência a antimicrobianos, adesão a células cultivadas *in vitro*, perfil plasmidial, detecção por PCR de genes relacionados à patogenicidade (*lic1* e *hmw*) e sua análise filogenética, realizados. Estas linhagens apresentaram plasmídios com pesos moleculares variando entre 1,58 e 48,6 MDa, não sendo clara a relação entre estes e os perfis de multirresistência apresentados pelas linhagens. Verificou-se uma discriminação das linhagens pertencentes aos biotipos I e IV das demais quando estudos filogenéticos foram realizados. Dentre tais estudos, o ERIC-PCR mostrou-se ser o mais eficaz, pela sua capacidade discriminante e facilidades para a obtenção de resultados, porém não descartar-se o uso da ribotipagem que também mostrou-se satisfatória ao discriminar linhagens com o uso das sondas *pRR64* e a obtida a partir do fragmento do 16S *rDNA* amplificado por PCR. Não houve correlação entre os dados filogenéticos obtidos e o perfil de adesão às células cultivadas *in vitro*.

Palavras-chave: Adesão, Antimicrobianos, Caracterização, ERIC-PCR, Filogenia, *Haemophilus influenzae*, Plasmídios, Ribotipagem.

## Abstract

Forty-five *Haemophilus influenzae* strains, isolated from patients of the Clinical Hospital in the Campinas State University – UNICAMP, had the biotype, serotype, antimicrobial resistance, adhesion onto cells cultivated *in vitro*, plasmidial profile, PCR detection of the genes *hmw* and *lic1* and phylogenitcal analysis, realized in this study. These strains have plasmids with molecular weight between 1,58 and 48,6 MDa, not been defined the relationship with the multiresistence profile. Also was verified a discrimination of the strains belonged to biotype I and IV in the phylogenitcal studies make. In this studies, the ERIC-PCR showed be the most efficient, by its discriminate capacity and easiness to obtain the results, but the ribotype use is not discarded because showed satisfactory in discriminate the strains, with the *pRR64* probe use and 16S *rDNA* probe obtained by PCR amplification. There were not relationship between the phylogenitcal data and the adhesion profile found.

Key-words: Adhesion, Antimicrobial, Characterization, ERIC-PCR, Phylogeny, *Haemophilus influenzae*, Plasmid, Ribotype.

## INTRODUÇÃO

## **Classificação do *Haemophilus influenzae***

A bactéria *Haemophilus influenzae* é um importante patógeno humano (Kroll et al., 1989). Trata-se de um microorganismo Gram negativo, pertencente à família *Pasteurellaceae*, possuidora de pleomorfismo, podendo apresentar-se nas formas de cocobacilo, bacilo, filamentos, esféricos, ou mesmos em formas aberrantes (Holt et al. 1994).

A respeito de sua classificação, tal espécie pode ser subdividida por dois métodos, em biotipos e em sorotipos. A divisão em biotipos baseia-se na presença e produção de enzimas como ornitina descarboxilase, urease, na fermentação do açúcar D-xilose e na produção de indol. Esta classificação permite subdividir o *Haemophilus influenzae* em 9 biotipos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e *aegyptius* (Holt et al., 1994).

A sorotipagem baseia-se na estrutura antigênica apresentada pela cápsula de algumas linhagens desta espécie bacteriana (Salyers & Whitt, 1994), geralmente as mais patogênicas. Tais cápsulas são compostas por um polímero de (-3)- $\beta$ -D-ribose-(1-1)-ribitol fosfato (PRP) e dividem as linhagens capsuladas em 6 sorotipos a - f (Kroll et al., 1991). Além disso, existem linhagens cuja estrutura antigênica da cápsula ainda não foi determinada, sendo, portanto, conhecidas como não-tipadas - as NTHI - *Non-typeable Haemophilus influenzae* (Loos et al., 1989).

Apesar do *Haemophilus influenzae* ser encontrado em diferentes patologias humanas tais como: otites médias, sinusites, amigdalites, faringites, pneumonias; além de meningites e outras infecções em crianças (Kroll et al., 1988), também pertence à flora de pacientes mucoviscidóticos, assim como são a *Pseudomona aeruginosa* e o *Staphylococcus aureus* (Abman et al., 1991). Sua classificação poderia ser mais facilitada caso uma

característica comum, partilhada por todos os microrganismos da espécie fosse utilizada como padrão epidemiológico e de caracterização. Quanto aos NTHi, mostram-se causadores de outras patologias como otites médias, conjuntivite, doenças obstrutivas pulmonares, estando também relacionados a casos de fibrose cística.

Mesmo sabendo-se ser o *Haemophilus influenzae* sorotipo b (Hib) mais frequentemente associado a meningites e outras sérias doenças da infância (Saito et al., 1999), não descartam-se os demais sorotipos e ainda as linhagens não-capsuladas (*Non-Capsular H. influenzae* – NCHI) como capazes de colonizar o trato respiratório e, assim, causar diferentes processos patogênicos (Kroll et al., 1991).

Já se tem conhecimento de que o Hib tem como importante fator determinante de patogenicidade o polissacarídeo capsular (Moxon et al., 1984; Moxon & Vaughn, 1981). Sabe-se que a região cromossômica envolvida na expressão da cápsula consiste de uma duplicação *in tandem* de um segmento de cerca de 18kb (Hoiseth et al., 1985) – a região *cap b*. Tal região contém o gene conhecido como *bexA*, que codifica uma proteína de 25KDa responsável pelo transporte do lipopolissacarídeo capsular para o exterior da célula bacteriana (Hoiseth et al., 1986).

Atualmente, conhece-se o significativo grau de similaridade desta sequência com a os genes *malK* de *Escherichia coli* e com os gens *hisP* e *oppD* de *S. typhimurium* (Kroll et al., 1988). Tem-se conhecimento de que a presença de uma única cópia de 18kb da região *capb*, torna possível a síntese do PRP e, conseqüentemente, a expressão da cápsula do Hib (Hoiseth et al., 1986).

Contudo, a relação parasita-hospedeiro está relacionada ao microambiente em que a infecção e a doença ocorrem. Há especulações sobre um possível distúrbio nesta relação, que deveria ser balanceada, já que a bactéria somente coexiste nas mucosas

humanas. Entretanto, devido à extrema diversidade do microrganismo, este seria um fator determinante para a ocorrência de tal desequilíbrio (Foxwell et al., 1998).

Portanto, a variabilidade genética parece ser um fator preocupante principalmente nos NTHi. Musser et al. (1986) mostram que as linhagens Hib tem uma origem clonal, enquanto que os NTHi possuem origens diversas como fontes infecciosas. Procurando solucionar tal problema, e encontrar uma característica classificatória comum a todos os *Haemophilus influenzae*, Kilian (1976) propôs o uso da classificação em biotipos para elucidar a taxonomia desta bactéria. .

A divisão em biotipos através das provas bioquímicas de indol, fermentação de D – xilose, produção de urease e ornitina descarboxilase, mostra que a maioria dos isolados do tipo b obtidos por Kilian, eram pertencentes ao biotipo I e os isolados dos demais oito sorotipos se enquadrariam nos biotipos I, II, III e IV. Musser et al. (1986) sugere, ainda, que as linhagens do biotipo IV sejam organizadas em um grupo separado de *Haemophilus influenzae* devido às características genéticas apresentadas por tais estirpes.

Verifica-se, diante de tais afirmações, que a classificação desta bactéria se torna extremamente confusa e pouco elucidativa, principalmente por apresentar duas formas classificatórias distintas e não relacionadas quanto ao aspecto molecular. Vê-se, contudo, uma esperança quanto às metodologias classificatórias capazes de relacionar as diversas linhagens de *Haemophilus influenzae* numa característica comum.

## **Características Biológicas e de Patogenicidade de *Haemophilus influenzae***

Além dos antígenos capsulares, o *Haemophilus influenzae* apresenta, também, em sua estrutura antigênica, outros componentes responsáveis pela sua patogenicidade. Podemos destacar a presença de estruturas fimbriais responsáveis pela adesão do microrganismo ao organismo do hospedeiro (Watson et al., 1994); produção de proteínas responsáveis pela aquisição de ferro do hospedeiro (Sanders et al., 1994; Wong et al., 1994; Jarosik et al., 1994; Gray et al., 1995); existência de sistemas enzimáticos como a enzima cobre-zinco superóxido dismutase - Cu(Zn)SOD, que confere à bactéria a capacidade de sobreviver ao ataque de macrófagos (Kroll et al., 1991); associação com fagos que potencializam a capacidade infectante do microrganismo (Kauc et al., 1991; Hauser & Scocca, 1992; Esposito & Scocca, 1994) e resistência a antimicrobianos (Tremblay et al., 1990; Deguchi et al., 1993; Iwai et al., 1990; Hashira et al., 1990).

Quanto à produção de fimbrias o *H. influenzae* apresenta dois tipos fimbriais distintos. O primeiro deles, encontrado nas linhagens tipáveis (a-f) é formado por uma proteína de 24kD a qual é codificada em um operon denominado *hif*, e que está presente em linhagens dos sorotipos a-f. O operon *hif* é formado por 5 genes *hifA*, *hifB*, *hifC*, *hifD* e *hifE*, sendo o *hifA* o responsável pela transcrição de toda a estrutura protéica da fimbria, a fimbria propriamente dita. A montante e com orientação inversa a ele, está o *hifB* responsável pela transcrição de uma chaperonina que controla a transcrição do *hifA*. Já o terceiro gene – *hifC* – encontra-se a jusante e com a mesma orientação do *hifA*, transcrevendo uma proteína de ancoragem da fimbria com o interior celular. Ainda, a jusante ao *hifC* há os genes *hifD* e *hifE*, que codificam proteínas que muito se assemelham

àquela produzida pelo *hifA* e que, também, são envolvidos com a biogênese da fimbria (Mc Crea et al., 1994).

Tal estrutura fimbrial está classificada dentre as pertencentes à família LKP, que contém resíduos de ácido siálico e promove microhemaglutinação em eritrócitos humanos contendo o antígeno AnWj (van Ham et al., 1995). Também confere adesão a diversos tipos celulares, entre as quais: células do epitélio bucal, Chang, HaCat, KB, HEp-2 (St. Geme & Cutter, 1996). Sabe-se, que através da fimbria *hif* um importante passo da colonização da nasofaringe humana ocorre, sendo tal estrutura, um fator determinante nos processos de persistência no epitélio hospedeiro e invasão sistêmica. Sabe-se que as linhagens fimbriadas de Hib são encontradas após infecção nasal, entretanto, quando isoladas do líquido e do sangue, as estruturas fimbriais já não são mais expressas (Mhlanga-Mutangadura et al., 1998). Assim, a expressão desta fimbria mostra-se inversamente regulada por variação de fase, agindo num promotor bidirecional encontrado entre o *hifA* e o *hifB* (Van Ham et al., 1993). A variação no número de repetições de TA no promotor *hif* modula a transcrição: 10 repetições conferem a expressão máxima, 11 reduzem a expressão e 9 conferem o silenciamento da transcrição. Portanto, a variação de fase pode ocorrer no decorrer da infecção, convertendo uma variante fimbriada apta à colonização, em uma variante não fimbriada capaz de invadir o tecido hospedeiro (Van Ham et al., 1994; Weber et al., 1991).

O segundo tipo fimbrial, encontrado nas NTHi, trata-se de uma fimbria de alto peso molecular (cerca de 220kDa) , com similaridade com a hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis*, promotora de adesão bacteriana a células do epitélio bucal. Tal fimbria filamentosa, dita HMW (*High Molecular Weight*), é conhecida por possuir duas famílias de proteínas distintas quanto às suas estruturas genéticas, funcionais e

imunológicas, relatadas como HMW1 e HMW2 (St. Geme et al. 1993).

A fimbria HMW1 é codificada pelo gene *hmw1A*, o qual é flanqueado pelos genes acessórios conhecidos como *hmw1B* e *hmw1C*. Já a proteína HMW2 é codificada pelo gene *hmw2A* que está flanqueado pelos genes acessórios *hmw2B* e *hmw2C* (Barenkamp & St Geme, 1994). A comparação entre as duas fimbrias revela 71% em grau de identidade e 80% em grau de similaridade (Barenkamp & Leininger, 1992). Mesmo com tal similaridade, estas proteínas exibem diferentes especificidades quanto à adesão celular, sugerindo diferentes padrões de reconhecimento frente a diferentes receptores celulares (Hultgren et al., 1993). Barenkamp & Bodor (1990), examinando o soro de pacientes acometidos por infecções causadas por NTHi, verificaram anticorpos anti-HMW, o que leva a crer num possível potencial imunológico e profilático destas proteínas (Dawid et al., 1999).

Além disso, o sistema de regulação deste tipo fimbrial em NTHi mostra uma grande similaridade com sistemas de regulação gênica encontrada em eucariotos. Tal sistema, baseado na repetição *in tandem* de 7pb a montante do códon inicializador, dos genes estruturais desta fimbria filamentosa, demonstra similaridade com genes de levedura (*Adr2p*), *hsp26* e *actin 5C* de *Drosophila*, gene *neu* de rato e gene  $\alpha$ -2(I) *colagen* de galinha (Dawid et al., 1999).

Em se tratando de outros mecanismos de patogenicidade, verifica-se a importância da síntese e expressão de lipooligossacarídeos (LOS). Sabe-se que muitos genes estão envolvidos na biosíntese e expressão de tais substâncias presentes na membrana externa, onde tais epítomos LOS podem ser imunologicamente reconhecidos pelo hospedeiro (Jarosik & Hansen, 1994). Sabe-se que nos Hib, quatro desses epítomos são

definidos por reagirem com anticorpos monoclonais (MAbs) 12D9, 6A2, 4C4 e 5G8. Tais epítomos foram descritos por demonstrarem correlações entre suas variações de fase e mudanças no potencial virulento de Hib. Tal diferença de expressão, quanto à variação de fase, tem sido atribuída à presença de seqüências de repetição (5'-CAAT-3') localizadas nas regiões 5' de genes relevantes, e que estão diretamente atribuídas à expressão destes epítomos.

A respeito dessa mesma variação de fase na expressão de tais estruturas, Hosking et al. (1999) mostram que as repetições nas seqüências de 5'-CAAT-3' nos genes *lic1A*, *lic2A* e *lic3A* influem na eficiência com que o *H. influenzae* coloniza a nasofaringe, a corrente sanguínea e as meninges. Essa mesma região, conhecida como operon *licI*, descrito e seqüenciado por Weiser et al. (1989), é a responsável pela expressão de dois epítomos de LPS, mostrando variação de fase e sendo controlada por seqüências repetidas.

Todavia, há nesta espécie bacteriana outros mecanismos de patogenicidade, cujos fatores determinantes também são expressos na superfície bacteriana, como a proteína receptora de transferrina humana – a Tbp (Webb et al., 1999). Tal fator protéico tem considerável atenção quanto ao seu potencial vacinal, principalmente por estar presente em *H. influenzae* de todos os sorotipos - incluindo o NTHi (Webb et al., 1999) e também ser expressa por outros patógenos respiratórios de importância médica e epidemiológica como *Neisseria meningitidis* (Holland et al., 1996).

A proteína Tbp pode ser encontrada em duas formas, a Tbp1 e a Tbp2. A primeira delas, com cerca de 105kDa, é detectada em linhagens de *H. influenzae* tanto do tipo b quanto nos NTHi. Entretanto, a Tbp2 além de ser encontrada também em *H. influenzae* com peso molecular variando entre 79 a 94kDa, também pode ser detectada em linhagens de *Neisseria meningitidis* (Webb et al., 1999).

Além das proteínas receptoras localizadas na membrana externa das células bacterianas, o *Haemophilus influenzae* ainda possui diversas outras peculiaridades que o faz sobreviver no organismo hospedeiro. A resistência a diversos antimicrobianos como ampicilina, trimetopim, tetraciclina, cloranfenicol e sulfonamida, tem sido verificada estando associada à presença de plasmídios (Powell et al., 1991; Dimopoulou et al., 1992, Jorgensen, 1992; Anderson et al., 1994; Dimopoulou et al., 1997; Gazagne et al., 1998; Abdel-Rahman et al., 2000; Casagrande et al., 2000; Leaves et al., 2000).

Historicamente, a resistência deste microrganismo começou a ser verificada no ano de 1974, quando o primeiro isolado de *Haemophilus influenzae* se mostrou resistente à ampicilina devido à produção de  $\beta$ -lactamase. Posteriormente, linhagens resistentes ao cloranfenicol e tetraciclina foram encontradas sendo, muitas delas, possuidoras de um perfil de multiresistência aos antimicrobianos citados associados a plasmídios de resistência (Dimopoulou et al., 1997; Leaves et al., 2000).

Sabe-se, através de estudos moleculares, que os plasmídios portadores de resistência a antibióticos em *H. influenzae* apresentam-se como sendo de dois tipos: pequenos e menores que 10kb, codificadores de TEM  $\beta$ -lactamase e que conferem resistência à ampicilina; e grandes, geralmente maiores que 30MDa, codificando multiresistência a diferentes antibióticos. Estas últimas estruturas extracromossômicas têm-se mostrado com baixo índice conjugativo (cerca de  $10^{-5}$ ) sendo a maioria indetectáveis em amostras clínicas, o que sugere que tais estruturas poderiam estar co-integradas ao cromossomo bacteriano, sendo somente detectadas devido ao perfil de resistência aos antimicrobianos apresentado pela linhagem (Leaves et al., 2000).

Sendo assim, verifica-se a importância da análise dos principais mecanismos de

patogenicidade e características biológicas do NTHi e dos sorotipos conhecidos de *H. influenzae*. Sabe-se, contudo, da extrema dificuldade em se analisar tais estruturas, por se tratar de uma bactéria de grande heterogeneidade apesar do alto interesse epidemiológico.

### **Metodologias de Análise Filogenética**

Buscando uma solução para os estudos epidemiológicos, e para a problemática do polimorfismo bacteriano apresentado pelo *H. influenzae*, torna-se importante a utilização de técnicas diversas de análise filogenética, na tentativa de homogeneizar o quadro taxonômico desta espécie bacteriana.

Metodologias como o *fingerprinting* genômico em associação com sorotipagem, biotipagem, perfil de proteínas e lipopolissacarídeos da membrana externa, são capazes de determinar os subtipos de tais linhagens de *H. influenzae* (Loos et al., 1989). Mesmo metodologias de uso geral em laboratórios clínicos, como o perfil de resistência a antimicrobianos, associadas a dados de biotipo e sorotipo, também têm sido utilizadas (Abdel-Rahman et al., 2000).

Outras técnicas, com enfoque bioquímico, vêm sendo utilizadas para o estudo filogenético do *H. influenzae*, mostrando-se discriminantes para a sua caracterização clonal. Metodologias, como o perfil eletroforético de isoenzimas (*Multiloci Enzyme Electrophoresis – MEE*), vêm sendo utilizadas com sucesso, principalmente quando aplicadas a linhagens NTHi (Musser et al., 1985).

Também, dentre as técnicas bioquímicas podemos destacar o perfil eletroforético de proteínas da membrana externa, que vem sendo utilizado como metodologia de análise das proteínas antigênicas e enzimas metabólicas do *H. influenzae*.

Entretanto, a capacidade discriminante desta metodologia não se mostra muito segura devido à alta variação nos perfis eletroforéticos de proteínas, apresentados durante as várias fases do crescimento bacteriano (Möller et al., 1996).

Já no âmbito molecular, o polimorfismo da região 16S (Kroll et al., 1991) têm sido proposto para a análise da estrutura clonal do *Haemophilus influenzae*. Técnicas como a ribotipagem, realizada mediante a digestão com endonucleases de restrição do DNA genômico total da linhagem a ser estudada, seguida de uma hibridização com sonda molecular contendo a região do 16S *rDNA*, tem sido pouco utilizada ou não tem sido utilizada, para a análise filogenética em *Haemophilus influenzae* (Zarko-Postawka et al., 1996; Gazagne et al., 1998).

Entretanto, a amplificação de tal região gênica, com oligonucleotídeos específicos à região do 16S *rDNA*, e sua posterior análise através do polimorfismo gerado pela digestão com enzimas de restrição, vem sendo utilizada com certa frequência tanto na análise epidemiológica e filogenética (Mitsuda et al., 1999), quanto na detecção desta bactéria em diversos materiais clínicos (Forsgren et al., 1994; Hendolin et al., 1997; Gonin et al., 2000).

Também, utilizando-se da técnica de PCR, a amplificação de fragmentos de DNA com iniciadores aleatórios (*Random Amplified Polimorphic DNA – RAPD*), também tem sido utilizada com relativo êxito para certas linhagens de *H. influenzae*, principalmente para linhagens do tipo b (Möller et al., 1996; Gazagne et al., 1998; Mitsuda et al., 1999).

Quanto à amplificação de seqüências repetitivas [*rep – Repetitive Extragenic Palindromic* e *eric – Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus* (Appuhamy et al., 1998)] estas não estão, ou vêm sendo pouco utilizadas para a determinação da estrutura clonal do *Haemophilus influenzae*. Gomez-de-Leon et al. (1999) mostraram que a técnica

de ERIC-PCR é confiável para distinguir o potencial de patogenicidade das linhagens de *H. influenzae*.

Outra técnica utilizada na análise genômica do *H. influenzae* usa a eletroforese de fragmentos de DNA em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE*), que torna possível separar fragmentos de DNA maiores que o *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polimorphism - RFLP*) e diferenciar as linhagens pelo perfil apresentado, possibilitando assim, uma melhor compreensão do genoma de cada linhagem (Lee et al., 1989).

Tal metodologia vem sendo largamente empregada (Gazagne et al., 1998; Moor et al., 1999; Saito et al., 1999). Usualmente o método empregado é o CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Field Electrophoresis*), o qual se utiliza a enzima de restrição *SmaI* para a obtenção de fragmentos de tamanho satisfatório à análise. Entretanto, também se utiliza o método de OFAGE (*Ortogonal Field Alternation Gel Electrophoresis*) (Lee et al., 1989), obtendo-se também resultados satisfatórios quanto à análise filogenética do *H. influenzae*.

Vale salientar sobre a utilização conjunta de metodologias, tanto moleculares e genéticas, quanto bioquímicas e fenotípicas, para a obtenção de uma análise completa e satisfatória do *Haemophilus influenzae*.

## **OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo a determinação da variação clonal de 45 linhagens de *Haemophilus influenzae* isoladas de pacientes apresentando quadros clínicos de infecção pelo microrganismo, do Hospital de Clínicas, Faculdade de Ciências Médicas – FCM, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Além da variação clonal, estudamos as principais características biológicas deste microrganismo para verificarmos a correlação entre as diferenças genéticas estabelecidas e os possíveis determinantes de patogenicidade de tais linhagens.

Para a análise do genoma das linhagens foram utilizadas as técnicas de análise de sequências repetitivas do genoma de *H. influenzae* (seqüências *eric*), análise do padrão de ribotipagem através de *RFLP* (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) com sonda *pRR64* marcada com [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, e com biotina para a sonda obtida por amplificação da região 16S *rDNA* da linhagem 46 (procurando confrontar a eficácia na utilização de ambas as sondas e medir a praticidade da marcação radiotiva e não radioativa).

Já para a verificação das características biológicas, procuramos evidenciar, através da adesão em células cultivadas *in vitro* em diferentes tipos celulares (células HeLa, HEp-2, Vero, KB e de epitélio bucal humano), de resistência a diferentes antimicrobianos, análise do DNA plasmidial e sorotipagem molecular através de PCR - em substituição à sorotipagem proposta por Kroll utilizando, para isto, a sonda *pUO38* (Kroll et al., 1989) e a possível relação destas com fatores de patogenicidade das estirpes aqui estudadas.

Além disso, procuraremos determinar, por técnicas de reação de amplificação em cadeia do DNA, genes responsáveis por alguns mecanismos de patogenicidade desta bactéria tais como: o gene *hif* (gene estrutural codificador da fimbria de linhagens tipáveis

*H. influenzae*), o gene *hmr* (gene estrutural da fimbria de linhagens NTHi) e o gene *lic1* (responsável pela síntese de lipopolissacarídeos de importância antigênica).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Tabela I - Linhagens Utilizadas como Padrão e Linhagens Estudadas neste Trabalho**

<b>Linhagens</b>	<b>Características</b>	<b>Origem</b>
<i>E. coli</i> <b>C600</b>	Nal <sup>R</sup> . Utilizada como padrão negativo em diversos experimentos e como receptora de plasmídios	LBMB – DMI - IB
<i>E. coli</i> <b>DH5<math>\alpha</math></b>	Nal <sup>R</sup> utilizada como receptora de plasmídios.	
<i>E. coli</i> <b>MS101</b>	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gir</i> A96, <i>relA1</i>	Hanahan et al., 1983
<i>E. coli</i> <b>V517</b>	<i>lac</i> <sup>-</sup> , Nal <sup>R</sup> utilizada como receptora de plasmídios	LBMB – DMI - IB
<i>H. influenzae</i> <b>13</b>	Linhagem contendo 8 plasmídios com pesos moleculares conhecidos com 32MD, 5,19MD, 3,48MD, 3,03MD, 2,24MD, 1,69MD, 1,51MD, 1,25MD) gentilmente cedido pelo Dr. James B. Kaper, do Centro de Desenvolvimento de Vacinas, USA.	Macrina et al., 1978
<i>H. influenzae</i> <b>32</b>	Isolado clínico deste trabalho utilizado como amostra padrão para detecção do gene <i>hmw</i> , responsável pela síntese da fimbria de alto peso molecular em linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> não tipáveis. .	LBMB – DMI - IB
<i>H. influenzae</i> <b>38</b>	Isolado clínico deste trabalho utilizado como amostra padrão para detecção do gene <i>lic1</i> , responsável pela síntese de oligossacarídeos em linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> .	LBMB – DMI - IB
<i>H. influenzae</i> <b>38</b>	Isolado clínico deste trabalho pertencente ao sorotipo a, utilizado para sorotipagem molecular. Amostra Padrão.	LBMB – DMI - IB
<i>H. influenzae</i> <b>46</b>	Isolado clínico deste trabalho pertencente ao sorotipo b, também utilizado para sorotipagem molecular. Amostra Padrão.	LBMB – DMI - IB
<i>H. influenzae</i> <b>C2836</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> não capsulado, não possuidor de plasmídios e fimbrias. Utilizado como controle negativo para reações de PCR para detecção de fimbrias e como receptora de plasmídios nos experimentos de conjugação. Gentilmente cedido pela Dr. Miriam Golomb, Division of Biological Sciences, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA.	Golomb et al., 1998
<i>H. influenzae</i> <b>IAL 402</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo c, padrão para sorotipagem molecular. ATCC 9007 NCTC 8469.	IAL – São Paulo
<i>H. influenzae</i> <b>IAL 421</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo e, padrão para sorotipagem molecular e possuidora do gene estrutural <i>hif</i> . NCTC 10479.	IAL – São Paulo
<i>H. influenzae</i> <b>IAL 422</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo f, padrão para sorotipagem molecular. NCTC 7918.	IAL – São Paulo
plasmídio <i>pRI</i>	Plasmídio do grupo de incompatibilidade II inserido em <i>E. coli</i> linhagem J53 (F <sup>-</sup> , <i>pro</i> <sup>-</sup> , <i>met</i> <sup>-</sup> ) de 62MD, contendo genes de resistência Ap <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Su <sup>R</sup> .	Crosa et al., 1976
plasmídio <i>pRR64</i>	Plasmídio inserido em <i>E. coli</i> contendo região 5, 16 e 23S rRNA de <i>Streptomyces lividans</i> , utilizado como sonda molecular em Ribotipagem.	Zarko-Postawka et al., 1997.

DMI - Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia (IB) – UNICAMP

IAL – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo – SP.

LBMB – Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana - DMI – (IB) - UNICAMP .

## ***1 - Meios de Cultura***

### **1.1 - Meio Luria Bertani (LB e LA)**

Triptona.....	10g
Extrato de levedura.....	5g
Cloreto de sódio.....	10g
Água destilada q.s.p.....	1L

pH 7,0 - 7,2

Ao meio LB foram adicionados 1,5% de ágar para a obtenção do meio LA.

### **1.2 - Infusão de cérebro-corção (BHI) e BHI Ágar**

Foi utilizado a forma comercializada pela Oxoid Cat. No.CM 225.

BHI.....	37g
Água Destilada q.s.p.....	1L

O material foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos

Para o preparo do BHI ágar foram adicionados 1,5% de ágar ao meio de cultura líquido.

### **1.3 - Suplemento de NAD e Hemina**

NAD.....	4mg
Água Destilada.....	20mL

Depois de dissolvida, a solução foi esterilizada por filtração (membrana de nitrocelulose 0,22µm)

Hemina cristalizada.....40mg

NaOH 1N.....20mL

Após ser dissolvida, a solução foi esterilizada conforme a solução de NAD.

#### **1.4 - Provas Para Biotipagem**

Todos os meios de cultura descritos a seguir foram baseados naqueles determinados por Kilian (1976). Estes foram adicionados de hemina e NAD nas concentrações acima citadas, tiveram seu pH ajustado e foram esterilizados por filtração em membrana de nitrocelulose 0,22 $\mu$ m.

##### ***1.4.1 - Detecção de Ornitina descarboxilase***

BHI suplementado com 1% de ornitina e 1mL de solução alcóolica de púrpura de bromocresol na concetração de 0,02g/L pH 6,8.

Incubou-se a 37°C e observou-se, após 18 horas, o aparecimento de coloração amarela (resultado negativo), a coloração roxa demonstra a descarboxilação do aminoácido e alcalinização do meio (resultado positivo).

##### ***1.4.2 - Detecção de Urease***

BHI suplementado com 5mL de solução aquosa de uréia e 6mL de solução de vermelho fenol a 0,2%, ambas para 1L de meio de cultura pH 6,9.

Incubou-se a 37°C e observou-se, após 18 horas, o aparecimento de coloração rosa forte positiva para a produção de urease.

#### ***1.4.3 - Detecção da Produção de Indol***

Crescimento feito em BHI a 37°C e observou-se, após 18 horas, por adição de reativo de Kovaks, o aparecimento de um anel de coloração rosa, demonstrando a presença do indol.

#### ***1.4.4 - Fermentação de D-xilose***

BHI suplementado com D-xilose a 1% e 9 mL de vermelho fenol 0,2% para 1 litro de meio de cultura pH 7,4.

Ocorrendo acidificação do meio de cultura com mudança da coloração do mesmo, considerou-se o resultado positivo.

## ***2 - Soluções***

### **2.1 - Tampão PBS pH 7,4**

Cloreto de sódio.....	8,00g
Cloreto de potássio.....	0,20g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,61g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,20g
Água destilada q.s.p.....	1,00L
Esterilizou-se a 120°C por 20 minutos.	

### **2.2 - Tampão de Ressuspensão de DNA**

Solução de sacarose a 50% na qual adicionou-se azul de bromofenol e xileno cianol, na concentração final de 0,25% cada, mantido à temperatura ambiente.

### **2.3 - Tampão Tris - Borato - EDTA (TEB) 5X**

Tris-base.....	54,0g
Ácido bórico.....	27,5g
Solução a 0,5M de EDTA.....	20,0mL
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL.

### **2.4 - Tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE pH 8,0)**

Tris-HCl.....	10mM
EDTA.....	1,0mM

## 2.5 - Solução de Tris - HCl (pH 8,0) 1M

A 121,1g de Tris-base, adicionaram-se 800mL de água destilada e 42mL de ácido clorídrico concentrado. Completou-se para 1000mL com água destilada.

## 2.6 - Solução de EDTA (pH 8,0) 0,5M

Adicionaram-se 186,1g de EDTA dihidratado em 800mL de água destilada. Agitou-se vigorosamente e ajustou-se o pH com solução a 10N de hidróxido de sódio.

A solução foi distribuída em pequenas alíquotas e autoclavadas a 120°C por 20 minutos.

## 2.7 - Soluções para a Extração de Plasmídios

### 2.7.1 - Solução I

Glicose.....50 mM  
 Tris-HCl.....25 mM (pH8,0)  
 EDTA.....10 mM (pH8,0)  
 Autoclavou-se a 120°C por 20 minutos e conservou-se em geladeira a 4°C.

### 2.7.2 - Solução II

Hidróxido de sódio.....0,2N  
 Duodecil-sulfato de sódio (SDS).....1,0%

### 2.7.3 - Solução III

Solução de acetato de potássio 5M.....60,0mL  
 Ácido acético glacial.....11,5mL  
 Água destilada ....28,5mL

## 2.8 - Soluções para extração de DNA Genômico

### 2.8.1 - Solução de CTAB/NaCl

Pesaram-se 8g de brometo de cetramônio (Sigma Cat. No.H5882), 4,1g de NaCl e estes foram dissolvidos em 80mL de água deionizada aquecida a 65°C, sendo o volume completado para 100 mL.

## 2.9 - Soluções para Southern-Blotting (Ribotipagem)

### 2.9.1 - Solução de 20X SSC \*

NaCl .....	352g
Citrato de Sódio.....	176g
Água deionizada q.s.p.....	2 L

### 2.9.2 - Solução de Denaturação \*

NaCl.....	29g
NaOH.....	20g
Água deionizada q.s.p.....	1L

### 2.9.3 - Solução de Denhardt's 50X concentrada

Ficoll.....	5g
Polivinilpirrolidona (PVP).....	5g
Soralbumina Bovina (fração V).....	5g
Água deionizada.....	500ml

Esterilizou-se por filtração e conservou-se a -20° C para uso posterior.

#### 2.9.4 - Solução de Hibridização

Concentrações finais de:

6X SSC

0,5% de SDS

100 µg/mL de fragmento de DNA de esperma de salmão denaturado

50% de formamida (aquecida a 42°C)

#### 2.9.5 - Solução de Pré - Hibridização

Concentrações finais de:

6X SSC

5X solução Denhardt's

0,5% de SDS

100 µg/mL de fragmento de DNA de esperma de salmão denaturado

50% de formamida (aquecida a 42°C)

#### 2.9.6 - Solução de Neutralização \*

Trizma Base.....1M

NaCl.....2M

pH7,4

\* Estas soluções foram esterilizadas a 120°C por 20 minutos.

### 2.9.7 - Solução TBS-Tween 20\*\*

Trizma base.....	100mM
NaCl.....	150mM
Tween 20.....	0,05% (v/v)

pH 7,5

### 2.9.8 - Solução de BSA Bloqueadora\*\*

Dissolveram-se 3g de BSA em TBS-Tween 20.

### 2.9.9 - Solução final de lavagem\*\*

Trizma base.....	100mM
NaCl.....	100mM
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0,05% (v/v)

pH 9,5

\*\* Tais soluções foram esterilizadaspor filtração em membrana de nitrocelulose de 0,22µm.

## 2.10 - Soluções para Cultura Celular

### 2.10.1 - Tampão de Sörensen

#### *Solução A*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	9,08g
Água destilada q.s.p.....	1,00L

*Solução B*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....9,47g

Água destilada q.s.p.....1,00L

Para obter pH 7,3 foram misturados 23,2ml da solução A e 76,8ml da solução

B.

**2.10.2 - Corante de Giemsa (Solução Estoque)**

Adicionaram-se a 54mL de glicerina 1g do corante de Giemsa, aqueceu-se em banho-maria a 60°C por 90 minutos. Esfriou-se e adicionaram-se à mistura 84mL de metanol. A solução estoque foi diluída 1:5 em Tampão de Sörensen, sendo filtrada em papel de filtro sempre antes do uso.

**2.10.3 - Corante May-Grünwald (Solução Estoque)**

Deixou-se uma solução a 2% de May-Grünwald em metanol, em banho-maria a 60°C durante 30 minutos. A solução estoque foi diluída 1:2 em Tampão de Sörensen, filtrando-se em papel filtro antes do uso.

### **3 - MÉTODOS**

#### **3.1 - Cultivo e Isolamento das Amostras**

As 45 amostras coletadas no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas foi realizado em meio infusão de cérebro-coração (BHI) suplementado com hemina e NADP a uma concentração final de 10 e 2µg/mL, respectivamente. Foram incubadas a 37°C sob agitação de 150-180 rpm por 18-24 horas (Musser *et al.*, 1985). Para manutenção do isolado foi adicionado glicerol ao meio de cultura para uma concentração final de 15%, sendo a suspensão mantida a -70°C.

#### **3.2 - Determinação da Mínima Concentração Inibitória a Antimicrobianos**

A determinação da mínima concentração inibitória aos diferentes antimicrobianos foi realizada inoculando 5 µL de crescimento bacteriano em BHI suplementado, em 200µL de concentrações seriadas de 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL dos antimicrobianos: ácido nalidíxico, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, novobiocina, canamicina, ampicilina e neomicina.

Após o inoculo, cada amostra foi incubada a 37°C por 12-18 horas. A leitura foi realizada considerando-se como mínima concentração inibitória padrão para os antimicrobianos, aquelas descritas em Sambroock et al. 1989.

### **3.3 - Análise do Perfil Plasmidial**

#### **3.3.1 - Extração de DNA Plasmidial em Média Escala**

O método utilizado para extração de DNA plasmidial baseou-se na técnica de lise alcalina de Birboin & Doly (1979). As linhagens bacterianas foram inoculadas em 100mL de meio BHI suplementado com hemina de NADP e incubadas sob agitação de 150rpm a 37°C por 12-18 horas. O crescimento bacteriano foi transferido para um tubo de centrifuga, sendo centrifugado a 5000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em 5mL de solução I gelada e mantido em banho de gelo por 30 minutos.

A seguir, 10mL de solução II foram adicionados e o conteúdo do tubo misturado por inversão suave e vagarosa. Após o tubo ter sido mantido em banho de gelo por não mais que 5 minutos, 7,5mL da solução III foram acrescentados ao conteúdo do mesmo e então, novamente, invertido suavemente e mantido em banho de gelo por mais 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10000rpm por 5 minutos e 20mL do sobrenadante transferido para outro tubo de centrifuga com a adição de 13mL isopropanol 100% a -20°. Após este procedimento, o tubo foi mantido a -20°C por pelo menos 1 hora. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12000g por 5 minutos, ressuspensionado em 400µL de água deionizada esterilizada e reprecipitado, adicionando-se solução de NaCl 5M a concentração final de 100mM, e 1mL de etanol 100% a -20°C.

O precipitado, contendo DNA plasmidial, foi lavado por centrifugação com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspensionado com 50 µL de tampão TE pH 8,0.

Para uso, alíquotas de 15µL foram transferidas para tubos tipo Eppendorff contendo 5µL de tampão de ressuspensão de DNA, homogeneizadas com o auxílio de uma

micropipeta e, então, aplicadas em canaletas de géis submersos de agarose a 0,7% em tampão TEB 1X concentrado.

Como pré-corrida, aplicou-se, inicialmente, uma voltagem de 20V, até que todo o corante azul penetrasse no gel. Após este procedimento, a voltagem foi aumentada para 100V até que o marcador alcançasse a extremidade oposta do gel. Após o término da corrida, o gel foi transferido para um recipiente contendo solução de coloração de brometo de etídeo e a visualização das bandas realizada em transiluminador de luz ultra-violeta. Após este procedimento, o gel foi fotografado pelo sistema EDAS, com filtro vermelho utilizando-se o software 1D-KDS da Kodak.

### **3.4 - Teste de Adesão em Células em Cultura HeLa, Hep-2, KB e Vero**

#### **3.4.1 - Cultivo de Células**

As linhagens celulares Hela, HEp-2, KB e Vero foram mantidas *in vitro* em ampolas de criogenia em nitrogênio líquido, em soro fetal bovino contendo 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO). Quando de sua necessidade para o teste, uma ampola foi descongelada rapidamente sendo as células lavadas por centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos e, posteriormente, inoculadas em uma garrafa contendo meio mínimo de Eagle suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), e estas incubadas a 37°C por 72 horas em estufa de CO<sub>2</sub>.

Após a formação da monocamada celular, o meio mínimo de Eagle foi removido e as células tripsinizadas. Com o despreendimento total das células, a estas foi adicionado meio de Eagle suplementado com 10% de SFB, para uma quantidade final de

25-30mL. Aos orifícios de uma placa de cultura celular (em cada orifício havia uma lamínula esterilizada), foi colocada uma alíquota de 1mL da suspensão celular ( $1.10^5$  células/mL), descrita anteriormente. Esta foi incubada a 37°C por 48 horas em estufa de CO<sub>2</sub>.

#### **3.4.1.1 - Teste de Adesão**

O teste de adesão em células seguiu a metodologia descrita por Scaletsky et al. (1984). Para a realização do teste de adesão, o meio de cultura das placas foi descartado, as células lavadas com 1mL de PBS pH 7,4 e um volume de 40µL de cada suspensão bacteriana (concentração de  $1.10^6$  bactérias /mL) foi adicionado aos orifícios contendo 1mL de meio Eagle suplementado com 10% de SFB. Incubou-se a 37°C por 30 minutos (período de infecção). Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas 6 vezes com 1mL de PBS pH 7,4. Em seguida, adicionou-se novamente aos orifícios a mesma quantidade de meio, nas mesmas condições, incubando-se a 37°C por mais 6 horas (período de multiplicação). Após este período, o meio de cultura foi descartado, as células lavadas 3 vezes com 1,0 ml de PBS pH 7,4 e as lamínulas fixadas com uma solução de metanol-ácido acético 3:1 durante 10 minutos, sendo as mesmas, posteriormente, coradas com corante May Grünwald 0,3% por 5 minutos. Após a coloração com o corante May Grünwald por 5 minutos, adicionou-se o corante Giemsa 0,2% deixando-se corar por 10 minutos. As lamínulas foram lavadas várias vezes com PBS pH 7,4, diafanizadas em xilol por 5 minutos e montadas com Entellan®/MERCK sobre lâmina de microscopia óptica, convenientemente limpa e sem riscos. A adesão bacteriana foi visualizada em microscopia óptica com aumento de 1000X.

### **3.4.3 - Adesão em Células do Epitélio Bucal**

Esta metodologia baseada na descrita por St. Geme & Cutter (1996), consistiu na obtenção asséptica por raspagem, com espátula metálica esterilizada, de uma suspensão de células do epitélio bucal de um único doador em PBS pH7,4. A suspensão celular foi lavada por centrifugação a 12000rpm com PBS pH 7,4 adicionado de penicilina e streptomicina (concentração final de mg/l). A suspensão foi incubada em PBS contendo antibióticos acima citados por 90 minutos, com o intuito de retirar a flora normal pré-existente.

A suspensão celular foi lavada novamente com PBS pH7,4 sem antibióticos numa concentração final de células de  $1.10^6$  células/mL. Frente a esta concentração celular foi colocada a mesma concentração de células bacterianas cultivadas como descritas acima. Um esfregaço celular foi assim realizado e corado com o método acima descrito.

Após coradas e diafanizadas, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico e tiveram o número de células aderentes contado e uma relação entre células aderentes e não aderentes foi determinada. As linhagens que possuíram uma relação de células aderentes maior do que 50% foram consideradas positivas quanto à adesão às células do epitélio bucal.

### **3.5 - Extração de DNA Genômico**

DNA genômico bacteriano foi isolado a partir de 10mL de crescimento bacteriano incubado a 37°C sob agitação de 150rpm, durante 24 horas em BHI suplementado. Ao precipitado foram adicionados 400µL de tampão TE pH 8,0 e 50µL de lisozima a 10mg/mL em água deionizada. A suspensão foi homogeneizada em vortex e

incubada a 37°C por 2-3 horas. Foi adicionada uma mistura de 70µL de 10% SDS e 5µL de Proteinase K a 10mg/ml. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de NaCl 5M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl. Tal suspensão foi agitada até formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65°C por mais 10 minutos. Foram adicionados, então, 750µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (v/v) e a mistura agitada por cerca de 10 segundos. O material foi centrifugado a 12000g, sendo o sobrenadante aquoso (600µL) cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 volumes de isopropanol -20°C (cerca de 450µl). A mistura foi mantida à temperatura de -20°C por 30 minutos.

A solução foi centrifugada a 12000g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi, por centrifugação, lavado duas vezes com solução de etanol 70% a -20°C. O DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso com movimentos cuidadosos e circulares em 100µL de tampão TE pH 8,0. A dosagem de DNA realizou-se como descrito por Sambrook et al. (1989), onde a concentração e pureza do DNA foram determinadas a partir de leitura em espectrofotômetro a 260 e 280 nm. Para isso, o seguinte cálculo foi realizado:

$$\text{Concentração de DNA}(\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{fator de diluição}$$

$\text{Pureza do DNA} = A_{280}/A_{260} \Rightarrow$  foram utilizados aqueles que apresentaram valores entre 1,50 e 1,80 (sem contaminação por RNA e/ou proteínas).

O ácido nucleico extraído foi conservado à temperatura de -20°C.

### 3.6 - Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

O DNA dosado foi submetido a uma amplificação utilizando-se, para isso, inicializadores de diversos genes e regiões de interesse do genoma de *Haemophilus influenzae*. Uma mistura de 10µL de 10X PCR Buffer, 2µL da mistura de dNTP a 10mM, 3µL de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 50pmoles do oligonucleotídeo e 2µL do DNA, extraído de cada linhagem a ser analisado, foi realizada. Completou-se o volume para 100µL com água MiliQ esterilizada. Cada tubo, contendo tal mistura, foi submetido a um aquecimento de 95°C por 10 minutos e adicionado de 2,5U de *Taq* DNA Polimerase (Gibco BRL Cat.Nº 18038-018). Posteriormente, o tubo foi submetido à amplificação em termociclador (Gene Amp PCR System 9700) segundo as especificações para cada região ou gene descrito na tabela II. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo.

O tamanho dos fragmentos foi determinado com o uso do Software Kodak 1D tendo-se como padrão de peso molecular o 1kb DNA-ladder (Gibco BRL - Cat.Nº10381-010) ou 100bp (Gibco BRL - Cat.Nº10381-010).

O ERIC-PCR, assim como ribotipagem pela sonda *pRR64*, e 16S *rDNA*, e a ribotipagem usando como sonda o 16S *rDNA* amplificado de linhagens de *Haemophilus influenzae*, tiveram as análises dos dados realizadas utilizando-se do programa **Popgen32**, onde a distância genética e o dendrograma, foram determinados.

Tabela II - Condições de Utilização dos oligonucleotídeos de DNA para *H. influenzae*

Iniciador	Gene amplificado	Sequência 5'— 3'	Ciclos	Tamanho do fragmento	Estrutura codificada
<b>ERIC1</b> <b>ERIC2</b>	ERIC PCR	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	30 ciclos de: 90°C/30seg. 52°C/1min. 72°C/8min. 1 ciclo de: 72°C/16 min.	Diversos	
16SHI Forward 16SHI Reverse (1)	16S <i>rDNA</i>	GCTGACGAGTGGCGGACGGG GCTCGTTGCGGGACTTAACC	30 ciclos de: 94°C/1min 61°C/1min 72°C/2min 1 ciclo de: 72°C/7min	1100pb	16S <i>rDNA</i>
HifA1 HifA2 (2)	<i>hifA</i>	TGCTGTTTATTAGGCTTTAG TTGTAGGGTGGGCGTAAGCC	30 ciclos de: 94°C/1min 55°C/1min 72°C/2min 1 ciclo de: 72°C/8min	600pb	Fímbria de <i>Haemophilus influenzae</i> b baixo peso molecular
HMW-HI Forward HMW-HI Reverse (3)	<i>hmw</i>	GCTGGCATATCTACCCGAAA AGGATATGCTTGCGGACAAG	35 ciclos de: 94°C/1min 58°C/1min 72°C/2min 1 ciclo de: 72°C/10min	569pb	Fímbria de <i>Haemophilus influenzae</i> NT de alto peso molecular
Chop-HI Forward Chop-HI Reverse (4)	<i>licA</i>	GGCATATTAGCGGACCAAT TCTTGCGCCAGAGAAAAGGA	35 ciclos de: 94°C/1min 58°C/1min 72°C/2min 1 ciclo de: 72°C/10min	829pb	Lipopolisacáride fosforilado
<b>CapA1</b> <b>CapA2</b>	<i>BexABCD</i>	GAATATGACCTGATCTTCTG AGTGGACTATTCCTGTTACAC		180pb	Gene <i>bexABCD</i> localizado entre as repetições <i>in tandem</i> do gene <i>cap</i> . É responsável pela exportação do antígeno capsular e utilizado na sorotipagem de linhagens capsuladas.
<b>CapB1</b> <b>CapB2</b>	<i>bexABCD</i>	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA ACCATGAGAAAGTGTTAGCG	25 ciclos de:	370pb	
<b>CapC1</b> <b>CapC2</b>	<i>bexABCD</i>	TCTGTGTAGATGATGGTTCA CAGAGGCAAGCTATTAGTGA	94°C/1min 60°C/1min	250pb	
<b>CapD1</b> <b>CapD2</b>	<i>bexABCD</i>	TCCACTCTTCAAACCATTTCT CTCTTCTTAGTGCTGAATTA	72°C/1min 1 ciclo de:	100pb	
<b>CapE1</b> <b>CapE2</b>	<i>bexABCD</i>	GCTTTACTGTATAAGTCTAG CAGCTATGAACAAGATAACG	72°C/10min	1160pb	
<b>CapF1</b> <b>CapF2</b>	<i>bexABCD</i>	GCTACTATCAAGTCCAAATC CGCAATTATGGAAGAAAGCT		1250pb	

(1) Sequência de oligonucleotídeos construída a partir do Genbank GI: 3551859, oligonucleotídeo *forward* a partir de 181pb e *reverse* a partir de 1258pb.

(2) Sequência de oligonucleotídeos obtida de Geluk et al. 1998.

(3) Sequência de oligonucleotídeos construída a partir do Genbank GI: 482840, oligonucleotídeo *forward* a partir de 7051pb e *reverse* a partir de 7601pb. Região comum entre *hmw1* e *hmw2*.

(4) Sequência de oligonucleotídeos construída a partir do Genbank GI: 148917, oligonucleotídeo *forward* a partir de 1621pb e *reverse* a partir de 2531pb.

### **3.7 - Análise do Polimorfismo da região 16S *rDNA* amplificada por PCR através do perfil de restrição**

Cerca de 100pg de DNA, extraído e purificado, foram submetidos à amplificação da região do 16S *rDNA* seguindo as especificações descritas na tabela II com os oligonucleotídeos 16SHI.

Após a amplificação, 2 µL da solução contendo a região de interesse foram submetidos à digestão com as enzimas *Hae*III e *Bam*HI, seguindo as especificações do fabricante.

## **3.8 - Ribotipagem**

### **3.8.1 - Southern Blotting**

#### **3.8.1.1 - Digestão do DNA Genômico**

Após extração e purificação do DNA (3-5 µg/ml), foi realizada sua digestão com a enzima *EcoR* I, em um tubo tipo Eppendorff, seguindo o protocolo abaixo:

DNA.....	5µg
Tampão da enzima 10X.....	2µL (conc. final 2X)
Enzima <i>EcoR</i> I .....	2µL (20U)
Água deionizada q.s.p.....	20µL

Incubou-se o tubo contendo a reação por 18-24 horas. Após este procedimento, toda a reação de digestão foi misturada em tampão de ressuspensão de DNA e então submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 0,7% juntamente com marcador de peso

molecular de 1kb DNA Ladder (Life Technologies). Após ter sido corado com brometo de etídio o gel foi fotografado e o DNA, nele contido, transferido para membrana de nylon conforme descrito a seguir.

### **3.8.1.2 - Transferência para Membrana de Nylon**

Seguindo a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989), o DNA do gel foi denaturado por 45 minutos com cerca de 500ml de solução de denaturação.

O gel foi rapidamente lavado com água deionizada e neutralizado com 300ml de solução de neutralização durante 30 minutos. Novamente, a solução foi trocada e continuou-se a neutralização por mais 15 minutos.

Enquanto o gel neutralizava, pedaços de papel Whatman 3MM foram cortados mais extensos e compridos que o tamanho do gel. Rapidamente, este papel foi umedecido com tampão 10X SSC (tampão de transferência) e colocado sobre o suporte em que fixou-se o gel para a transferência (tomando-se o cuidado para não haver formação de bolhas, que dificultaria a transferência do ácido nucléico).

A partir deste passo, após termos cortado a membrana de nylon do tamanho do gel, esta foi, então, molhada em água deionizada e posteriormente em tampão 10X SSC, permanecendo nesta solução por cerca de 5 minutos.

O gel foi removido da solução de neutralização e colocado invertido sobre o suporte de transferência. Colocou-se sobre ele a membrana de nylon e sobre estes, 2 papéis 3MM cortados exatamente do tamanho do gel molhados com tampão 2X SSC.

Sobre este sistema foram colocados 5 a 8 cm de papel toalha cortados do tamanho do gel sob um peso de cerca de 500g. A transferência de DNA procedeu-se durante 24 horas.

O papel toalha e o papel 3MM foram retirados e o local das canaletas do gel marcados com lápis d'água ou caneta porosa.

A membrana de nylon foi passada por uma solução de 6XSSC e seca em forno a vácuo por 2 horas a 80°C ou com exposição do lado da membrana contendo DNA à luz UV pelo mesmo período.

### 3.8.1.3 - Marcação da sonda com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP

A sonda de *rRNA* utilizada para a ribotipagem foi descrita por Zarko et al. (1996), contém os fragmentos de 5S, 16S e 23S *rDNA*. Tais genes, provenientes de *Streptomyces (lividans) violaceoruber* TK21 estão inseridos no sítio *SaII* do plasmídeo *pUC18* (plasmídeo *pRR64* descrito pelo autor).

Para obtenção deste fragmento, uma quantidade de 28µg do plasmídeo *pRR64* foi restringido com 40U da enzima *SaII*, em um volume final de reação de 50µL. O fragmento, com cerca de 7,2 kb, contendo o *rDNA*, foi purificado do gel de agarose a 1% (w/v) pelo processo de eletrodiluição descrito por Sambroock et al. (1989).

A marcação da sonda, assim purificada, foi realizada seguindo-se o protocolo de marcação, Oligolabelling Kit -Pharmacia LKB Biotechnology, onde 50µl de sonda foram marcados com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP seguindo o protocolo abaixo:

Sonda .....	3µL
Reagente Mix.....	10µL
Água deionizada q.s.p.....	44µL

A mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos e imediatamente resfriada. A ela foram adicionados 1µL de *DNA polimerase I*, Fragmento Klenow e 5µL de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP.

Incubou-se a 37°C por 1 hora e congelou-se a sonda já marcada.

#### **3.8.1.4 - Marcação da sonda da região 16S *rDNA* obtida por PCR com Biotina – dCTP.**

A sonda a ser utilizada, neste caso, foi obtida por amplificação da região 16S do *rDNA* de uma amostra referência deste trabalho (linhagem 46, sorotipo b). O amplificado obtido por PCR foi purificado, por precipitação em etanol como descrito por Sambroock et al. (1989) e ressuspendido em igual volume.

Em seguida, a sonda foi submetida à marcação randômica utilizando-se para isso o Bioprime DNA Labeling System seguindo o protocolo:

Amplificado lavado.....10µL

Random Primer 2,5X.....20µL

Ferveu-se o tubo por 10 minutos e acondicionou-se o mesmo em banho de gelo:

dNTP (com Biotina-dCTP).....5µL

Água deionizada.....14µL.

A mistura de 50µL, foi incubada a 37°C por um período de 12-18 horas.

### 3.8.2 - Hibridização da Membrana de Nylon com a sonda *pRR64*

A solução de pré-hibridização foi preparada momentos antes de seu uso. Enquanto se preparava a solução, as membranas contendo o DNA digerido, foram colocadas em solução de 6X SSC por 2 minutos.

Após este procedimento, as membranas foram acondicionadas no interior de uma garrafa de hibridização (com seu interior contendo um filme de Repel-Silane da PlusOne) com o lado contendo DNA inverso ao vidro. Cada membrana foi separada uma da outra por redes de hibridização (*meshs*).

Após as membranas terem sido acondicionadas, colocou-se dentro da garrafa a solução de pré-hibridização e incubou-se a garrafa em forno giratório (Red Roller II - Hoefer Scientific Instruments) a 42°C por 1 hora.

Decorrido tal período, toda solução de pré-hibridização foi retirada e uma solução de hibridização foi colocada. Conjuntamente, foram adicionados 75 µL da sonda marcada com  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ , fervida por 5 minutos a 100°C e imediatamente resfriada. O processo de hibridização transcorreu por 4 horas à temperatura de 42°C.

Após o tempo de hibridação, a solução foi descartada e as membranas lavadas em solução de 2X SSC 0,5% de SDS por cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiram-se as membranas para uma solução de 2X SSC 0,1% SDS e decorridos 15 minutos transferiram-se as mesmas para uma solução 0,1X SSC 0,5%SDS e incubaram-se a 37°C por 30 minutos.

Decorrido este período, transferiu-se cada membrana para uma nova solução de 0,1X SSC 0,5% SDS e incubou-se a 68°C pelo mesmo período de tempo.

Lavaram-se as membranas rapidamente em solução de 0,1X SSC e removeu-se o excesso de líquido com papel toalha. Fixou-se a membrana, com o lado contendo DNA para cima, em papel 3MM ou filmes usados de radiografia com o uso de fita adesiva. Colocou-se sobre este um filme de PVC. Foi realizada a exposição em filme de raioX para obtenção de bandas marcadas radioativamente. O tempo de exposição foi de 48 horas à temperatura de -70°C.

### **3.8.3 - Hibridização da Membrana de Nylon com a sonda da região 16S *rDNA* obtida por PCR**

A solução de pré-hibridização foi preparada momentos antes de seu uso seguindo as instruções do fabricante. Enquanto se preparava a solução, as membranas contendo o DNA digerido foram colocadas em solução de 6X SSC por 2 minutos.

Após tal procedimento, as membranas foram acondicionadas no interior de uma garrafa de hibridização (com seu interior contendo um filme de Repel-Silane da PlusOne) com o lado contendo DNA oposto ao vidro.

Após serem bem acondicionadas, colocou-se dentro da garrafa a solução de pré-hibridização (preparada segundo o prospecto do 2X Prehybridization/Hibridization Solution Life Technologies, sem formamida) e incubou-se a garrafa em forno giratório (Red Roller II - Hoefer Scientific Instruments) a 42°C por 18 horas.

Decorrido tal período, toda solução de pré-hibridização foi retirada e uma solução de hibridização, a qual também seguiu as especificações de preparo do fabricante, foi colocada. Conjuntamente, foram adicionados 50 µL da sonda marcada com biotina-dCTP, fervida por 5 minutos a 100°C e imediatamente resfriada. O processo de hibridização transcorreu por 18 horas à temperatura de 42°C.

Após o tempo de hibridização, a solução foi descartada e as membranas foram lavadas três vezes em solução de 0,1X SSC por cerca de 15 minutos à temperatura ambiente.

Uma vez lavadas, as membranas foram bloqueadas com solução bloqueadora contendo BSA, por 1 hora a 65°C em garrafas de hibridização utilizando-se do forno giratório.

Lavaram-se as membranas, rapidamente, em solução de TBS-Tween 20 pH 7,4, removeu-se o excesso de líquido e incubaram-se as mesmas em 30mL da mesma solução contendo 28  $\mu$ L do conjugado Gibco BRL SA-AP do BluGene Nonradioactive Nucleic Acid Detection System, por 30 minutos.

Descartou-se a solução de conjugado e lavaram-se as membranas por 15 minutos em TBS-Tween 20. Transcorrido o tempo, uma outra lavagem foi realizada, com tampão de lavagem pH 9,5 e posterior revelação da membrana com NBT BCIP conforme a descrição do kit utilizado em que 30mL de solução de lavagem foram adicionados de 53  $\mu$ L de solução de NBT do kit e 40  $\mu$ L de solução de BCIP.

As membranas foram incubadas por cerca de 45 minutos em pouco contato com a luz, tempo necessário para o aparecimento das bandas.



## 01 - Biotipagem

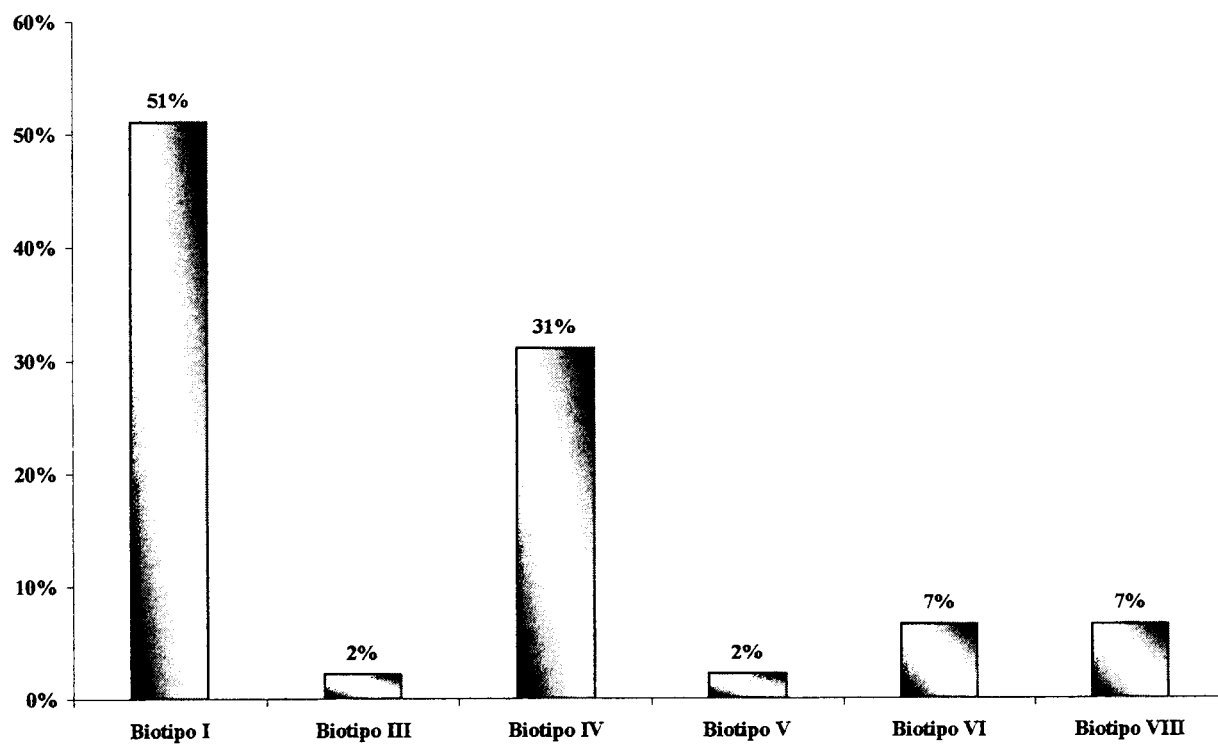
As 45 linhagens de *Haemophilus influenzae* foram biotipadas seguindo-se a metodologia descrita por Kilian et al. (1976), sendo cada linhagem submetida aos testes de fermentação de D – xilose, produção de urease, ornitina descarboxilase e indol.

Mediante tais ensaios bioquímicos, foi possível a aferição dos biotipos de cada uma das amostras (tabela III). Dentre os biotipos encontrados, o biotipo I foi o mais frequente (51% das linhagens), seguido pelo biotipo IV (31%). Linhagens pertencentes aos biotipos III (2%), V(2%), VI (7%) e VIII (7%), também foram encontradas. Linhagens dos biotipos II, VII e *aegyptius* não foram detectadas neste estudo.

Tabela III – Linhagens de *Haemophilus influenzae*, Biotipos e Sorotipos

Linhagens	Origem das Linhagens	Biotipo	Sorotipo
01	FIBROSE CÍSTICA	I	NT
02	FIBROSE CÍSTICA	I	NT
03	FIBROSE CÍSTICA	VIII	NT
05	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
06	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
07	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
08	FIBROSE CÍSTICA	I	NT
09	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
10	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
11	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
12	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
13	FIBROSE CÍSTICA	I	NT
14	FIBROSE CÍSTICA	I	NT
15	FIBROSE CÍSTICA	VI	NT
16	FIBROSE CÍSTICA	IV	NT
17	FIBROSE CÍSTICA	VIII	NT
18	FIBROSE CÍSTICA	VIII	NT
19	INFECÇÃO DE FARINGE	IV	NT
20	INFECÇÃO BRÔNQUICA	VI	NT
21	AMIGDALITE	III	NT
22	AMIGDALITE	I	NT
23	LAVADO BRÔNQUIO-ALVEOLAR	I	NT
24	LAVADO BRÔNQUIO-ALVEOLAR	I	NT
26	SECREÇÃO OCULAR	I	NT
27	SECREÇÃO OCULAR	IV	NT
28	SECREÇÃO OCULAR	I	NT
29	SINUSOPATIA	I	NT
30	LÍQUIDO SINOVIAL	VI	NT
31	SINUSITE	I	NT
32	LAVADO BRÔNQUICO	I	NT
33	LAVADO BRÔNQUICO	IV	NT
34	LAVADO BRÔNQUICO	I	NT
35	ESCARRO	I	NT
36	PNEUMONIA	I	NT
37	PNEUMONIA	I	NT
38	PNEUMONIA	I	a
39	LIQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO	IV	NT
40	LIQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO	I	NT
41	LIQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO	I	NT
42	LIQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO	I	b
43	LIQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO	IV	b
44	LIQUIDO PLEURAL	I	NT
45	HEMOCULTURA	V	b
46	HEMOCULTURA	I	b
47	HEMOCULTURA	IV	NT

### Biotipos de *Haemophilus influenzae*



**Figura 1** – Gráfico percentual dos biotipos encontrados das linhagens de *Haemophilus influenzae*.

## 02 - Sorotipagem Molecular das Linhagens de *Haemophilus influenzae*

As linhagens estudadas neste trabalho foram sorotipadas segundo a metodologia descrita por Falla et al. (1994), em que o DNA da estirpe a ser testada é submetido a uma amplificação por PCR, usando pares de iniciadores específicos para os sorotipos a-f.

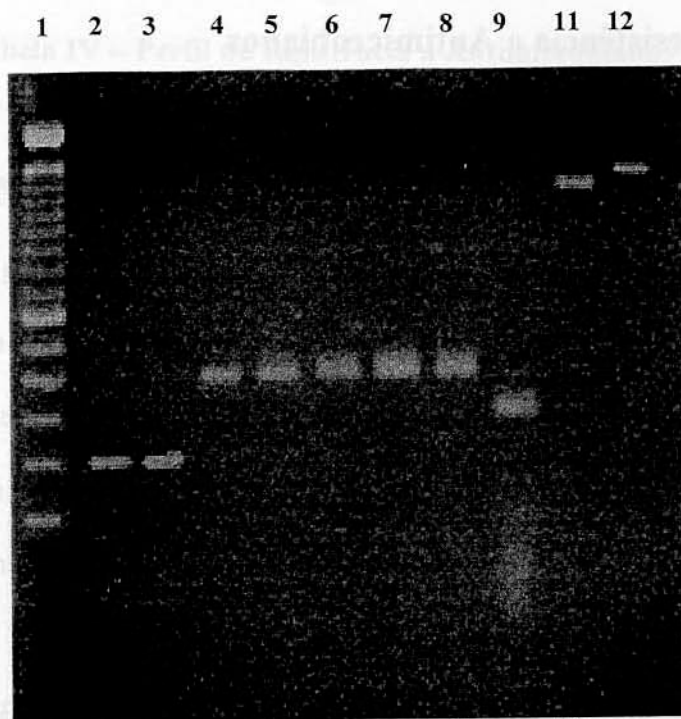
Através deste método foram detectadas cinco linhagens tipáveis (11%) pertencentes aos sorotipos a (2%) e b (9%). As demais linhagens estudadas (89%) foram determinadas como sendo capsuladas e não tipáveis (linhagens NT) (tabela III).

A figura 2 mostra os diferentes fragmentos obtidos, específicos para cada sorotipo, pela amplificação das linhagens tipáveis e de referência deste trabalho. Verificou-se a obtenção dos diferentes fragmentos de DNA amplificado para cada sorotipo como descrito abaixo: 180pb para o tipo a, 370 para o tipo b, 250 para o tipo c, 1160 para o tipo e, 1250 para o tipo f.

Apesar de não ter sido utilizada uma linhagem padrão sorotipo d neste trabalho, devido à não disponibilidade da mesma em coleções em cultura, todas as linhagens foram testadas com estes iniciadores específicos de todos os sorotipos, não sendo obtidos, porém, linhagens do sorotipo d.

As linhagens tipadas foram: linhagem 38, pertencente ao sorotipo a e isolada de um caso de pneumonia; linhagens 42 e 43, pertencentes ao sorotipo b e isoladas do líquido céfalo-raquidiano de diferentes pacientes apresentando meningite; linhagens 45 e 46, também pertencentes ao sorotipo b, entretanto isoladas de hemocultura, também isoladas de diferentes pacientes.

Vale ressaltar que linhagens não tipáveis como por exemplo as linhagens 39, 40 e 41 foram isoladas de casos de meningite e não são pertencentes ao sorotipo b.



**Figura 2** - Gel de agarose (1,5%) mostrando os diferentes fragmentos amplificados por PCR, específicos para cada sorotipo capsular de *Haemophilus influenzae*: **1** - 100bp Life Technologies; **2 e 3** - Linhagem Padrão número 38 (sor. a) em duas canaletas; **4 e 5** - Linhagem Padrão número 46 (sor. b) em duas canaletas; **6**- Linhagem 42; **7** - Linhagem 43; **8** - Linhagem 45; **9** - Linhagem *H.influenzae* IAL 402 (sor. c); **10** - Linhagem *H. influenzae* IAL 421 (sor. e); **11** - Linhagem *H. influenzae* IAL 422 (sor.f).

### 03 - Perfil de Resistência a Antimicrobianos

As 45 linhagens deste estudo foram analisadas quanto à concentração inibitória mínima (MIC) dos seguintes antimicrobianos: ampicilina (**Amp**), canamicina (**Km**), tetraciclina (**Tc**), estreptomicina (**Sm**), ácido nalidíxico (**Nal**), cloranfenicol (**Cm**), neomicina (**Neo**) e novobiocina (**Nov**).

Ao se analisar a resistência apresentadas pelas linhagens aos diferentes antimicrobianos verificou-se que das 45 linhagens analisadas, 25 (56%) foram resistentes a 5 antimicrobianos diferentes. Dentre estes, 3 linhagens (7%) foram resistentes à Amp, Km, Nal, Sm e Cm; 11 linhagens (24%) foram resistentes à Amp, Km, Nal, Neo, Sm; 6 linhagens (13%) foram resistentes à Amp, Km, Nov, Sm, Nal; 3 linhagens (7%) foram resistentes a Amp, Km, Nal, Tc e Sm. Quatorze linhagens (31%) apresentaram-se resistentes a 4 antimicrobianos. Dentre estas, 1 linhagem (2%) foi resistente à Amp, Cm, Nal, Sm; 1 linhagem (2%) foi resistente à Amp, Km, Neo e Sm; 1 linhagem (2%) foi resistente à Amp, Km, Nov e Sm; 10 linhagens (22%) foram resistentes à Amp, Km, Nal e Sm e 1 linhagem (2%) foi resistente à Km, Nal, Nov e Sm. Cinco linhagens (11%) apresentaram resistência aos 3 antimicrobianos Amp, Nal e Sm; 3 linhagens foram resistentes a 2 antimicrobianos [(1 linhagem foi resistente ao Nal e Sm (2%), 1 linhagem resistente à Amp, Nal (2%) e 1 linhagem resistente à Amp e Km (2%)]. Verificou-se, também, a existência de 1 linhagem (2%) (linhagem 37) que apresentou resistência a seis dos oito antimicrobianos testados (Amp, Cm, Km, Nal, Sm, Tc) (figura 3).

Não foram encontradas linhagens sensíveis a todos os antimicrobianos aqui estudados.

**Tabela IV – Perfil de Resistência a Antimicrobianos da Linhagens de**  
*Haemophilus influenzae*

Linhagens	Resistência a Antimicrobianos							
	Amp	Cm	Km	Nal	Neo	Nov	Sm	Tc
01	+	-	+	+	-	-	+	-
02	+	-	+	+	-	-	+	-
03	+	-	+	+	-	-	+	-
05	+	-	-	+	-	-	+	-
06	+	-	-	+	-	-	+	-
07	+	-	+	+	-	-	+	+
08	+	+	+	+	-	-	+	-
09	+	-	-	+	-	-	+	-
10	+	-	-	+	-	-	+	-
11	+	-	+	-	+	-	+	-
12	+	-	+	+	-	-	+	-
13	+	-	-	+	-	-	-	-
14	+	-	+	+	+	-	+	-
15	+	-	+	+	-	+	+	-
16	+	-	+	+	-	-	+	+
17	+	-	+	-	-	-	-	-
18	+	-	+	+	-	-	+	+
19	+	-	+	+	-	-	+	-
20	+	-	+	+	+	-	+	-
21	+	-	+	+	-	-	+	-
22	+	-	+	+	+	-	+	-
23	+	-	+	+	+	-	+	-
24	+	-	+	+	+	-	+	-
26	+	+	+	+	-	-	+	-
27	+	-	+	+	+	-	+	-
28	+	-	+	+	-	+	+	-
29	+	-	+	+	-	+	+	-
30	+	-	+	+	+	-	+	-
31	+	-	+	-	-	+	+	-
32	+	-	+	+	-	-	+	-
33	+	-	+	+	+	-	+	-
34	+	-	+	+	-	+	+	-
35	-	-	+	+	-	+	+	-
36	-	-	-	+	-	-	+	-
37	+	+	+	+	-	-	+	+
38	+	-	+	+	+	-	+	-
39	+	+	+	+	-	-	+	-
40	+	-	+	+	-	-	+	-
41	+	-	+	+	-	+	+	-
42	+	-	+	+	-	-	+	-
43	+	+	-	+	-	-	+	-
44	+	-	+	+	+	-	+	-
45	+	-	-	+	-	-	+	-
46	+	-	+	+	+	-	+	-
47	+	-	+	+	-	+	+	-

### Perfil de Multiresistência Das Linhagens de *Haemophilus influenzae*

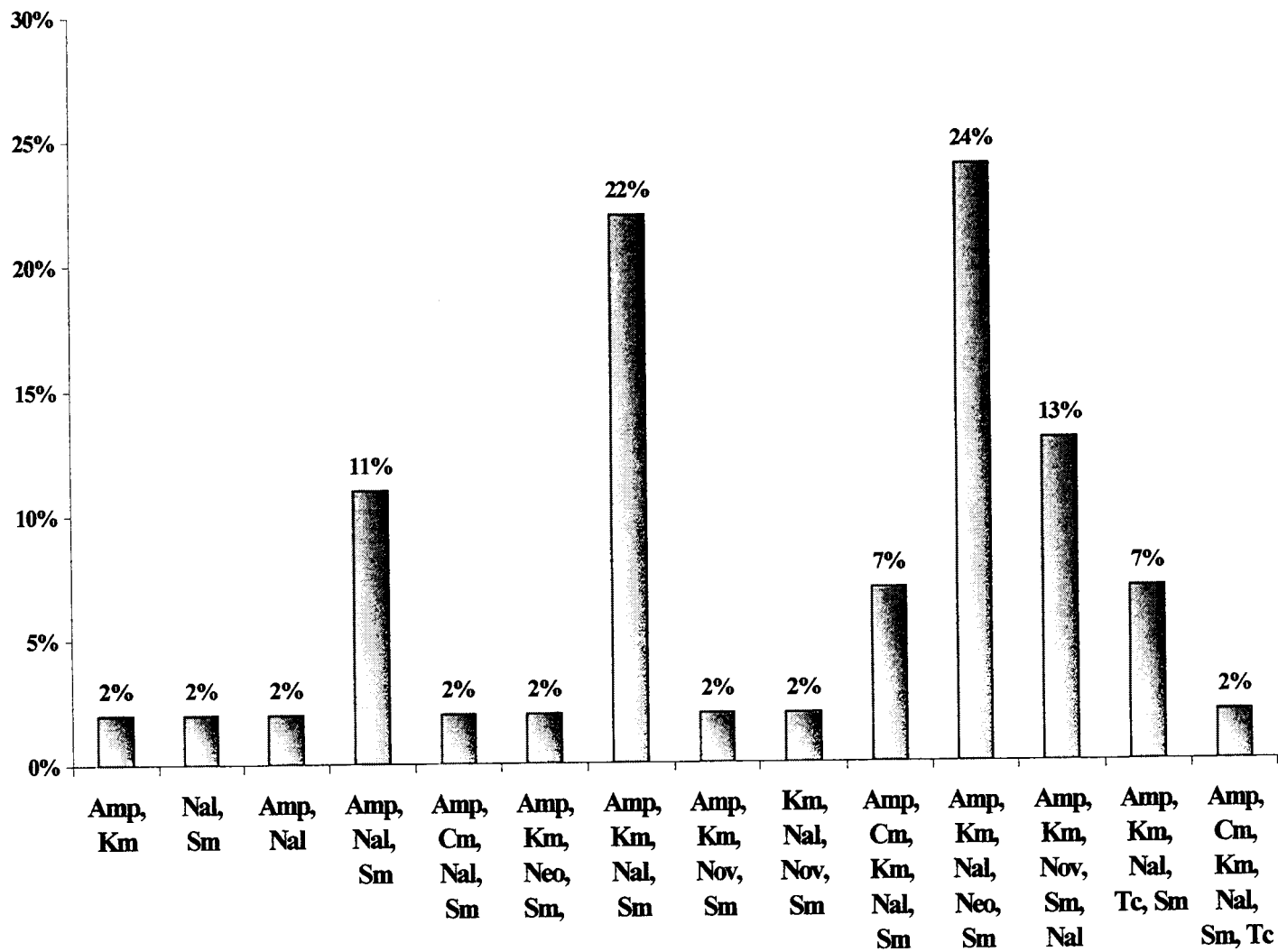
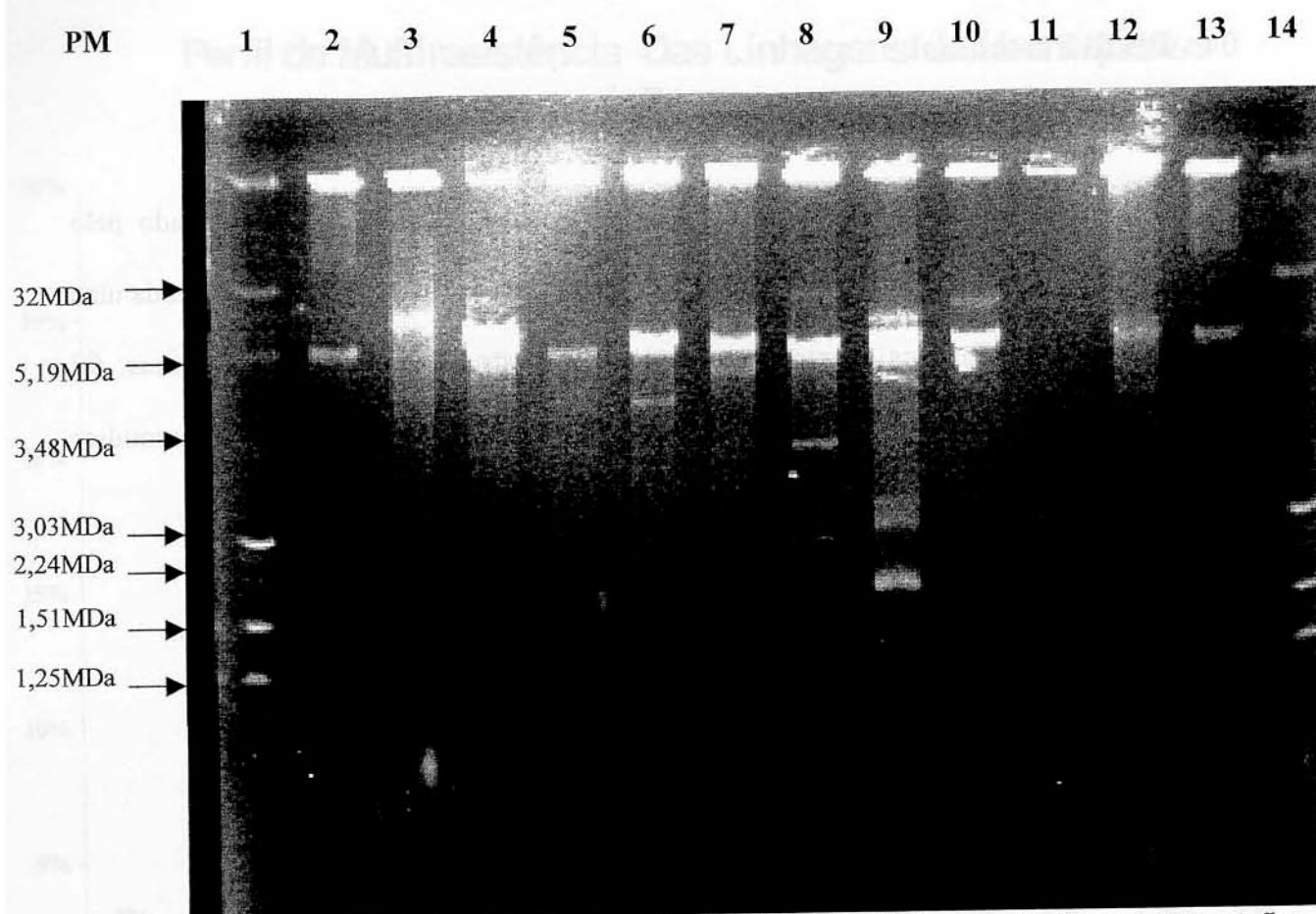


Figura 3 – Gráfico do Perfil de Multiresistência a antimicrobianos.

## 04 - Perfil Plasmidial

O perfil plasmidial das linhagens de *H. influenzae* deste trabalho, foi determinado pelo método da lise alcalina para média escala, descrito por Birnboim & Doly (1979). Uma vez realizada uma primeira análise de todas as linhagens quanto à presença de tais estruturas extra-cromossômicas, foi verificado que somente 10 linhagens dentre as 45 analisadas, mostraram-se possuidoras de plasmídios com pesos moleculares variando entre 1,58 a 48,6MDa (figura 4, tabela V).



**Figura 4** - Gel de agarose (0,7%) com o perfil plasmidial das linhagens de *Haemophilus influenzae* possuidoras de plasmídios, canaletas: **1 e 14** – Linhagem V517 (32MDa, 5,19MDa, 3,48MDa, 3,03MDa, 2,24MDa, 1,69MDa, 1,51MDa e 1,25MDa); **2 e 13** – Plasmídio pR1 (62MDa); **3** - Linhagem 02, **4** - Linhagem 13, **5** - Linhagem 14; **6** – Linhagem 16; **7** - Linhagem 19; **8** - Linhagem 21; **9** - Linhagem 22; **10** - Linhagem 28; **11** - Linhagem 42 e **12** - Linhagem 43.



## 05 - Adesão a Células Cultivadas *in vitro*

Neste estudo, foi analisada a capacidade de adesão das linhagens a células cultivadas *in vitro*. Foram utilizadas as células HeLa (carcinoma uterino), HEp-2 (carcinoma laríngeo), KB (carcinoma do epitélio bucal), Vero (carcinoma renal de macaco verde africano) e células do epitélio bucal.

O tipo celular em que ocorreu maior frequência de adesão foi a célula KB (96% das linhagens), seguida pela célula do epitélio bucal (82%), célula HEp-2 (56%), célula HeLa (22%) e célula Vero (16%).

Foram detectados pleomorfismos nas linhagens bacterianas em diversas fases dos experimentos em células cultivadas *in vitro*, sendo difícil uma padronização do perfil de adesão. Entretanto, foi possível verificar a existência de três tipos de adesão: tipo A, com células bacterianas aderidas em grupos de maneira difusa sobre o tapete celular; o tipo B, que demonstrou uma adesão difusa sobre a superfície celular sem a formação de grupos e o tipo C, que mostrou formas bacterianas aderidas de forma localizada (figura 5, tabela VI).

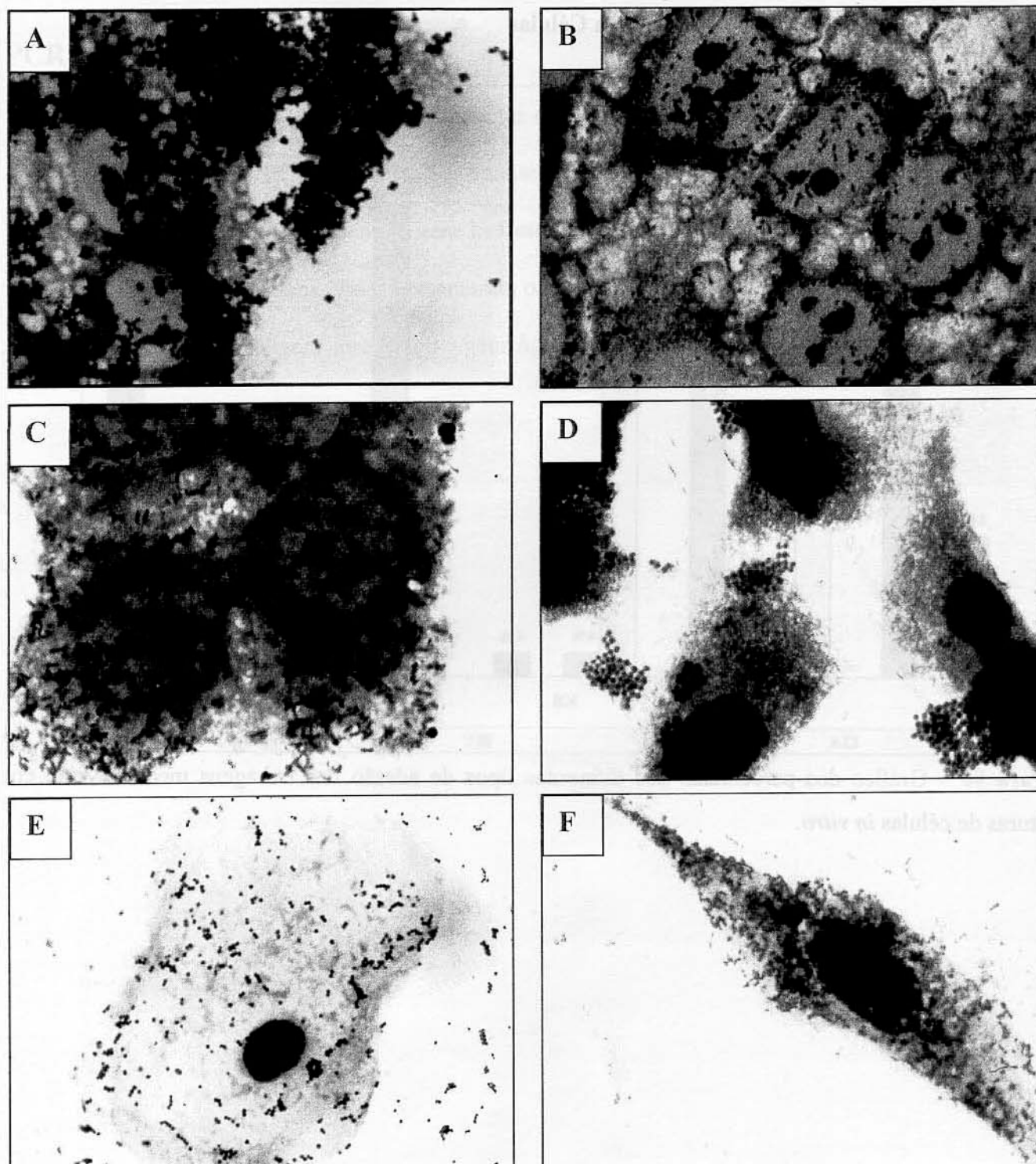
Dentre as linhagens que apresentaram-se aderentes à células HeLa, verificou-se somente o padrão B de adesão, o mesmo ocorrendo com as células de epitélio bucal. Já em células Hep-2, verificou-se que 47% das linhagens apresentando o padrão A, 4% o padrão B de adesão e 49% não aderentes. A mesma diferenciação entre os padrões de adesão ocorreu nas células KB onde 92% das linhagens apresentaram o padrão A e 4% o padrão B de adesão, sendo que 2% das linhagens foram não aderentes. As linhagens que apresentaram padrão B de adesão em Hep-2 e KB não foram as mesmas. Em células Vero obtiveram-se os padrões de adesão A com 7% e C com 9% de frequência nas

linhagens estudadas, sendo mais freqüentes as linhagens não aderentes a esta célula com 84% de freqüência (figura 06).

Tabela VI –Propriedades de Adesão a Células Cultivadas *in vitro*.

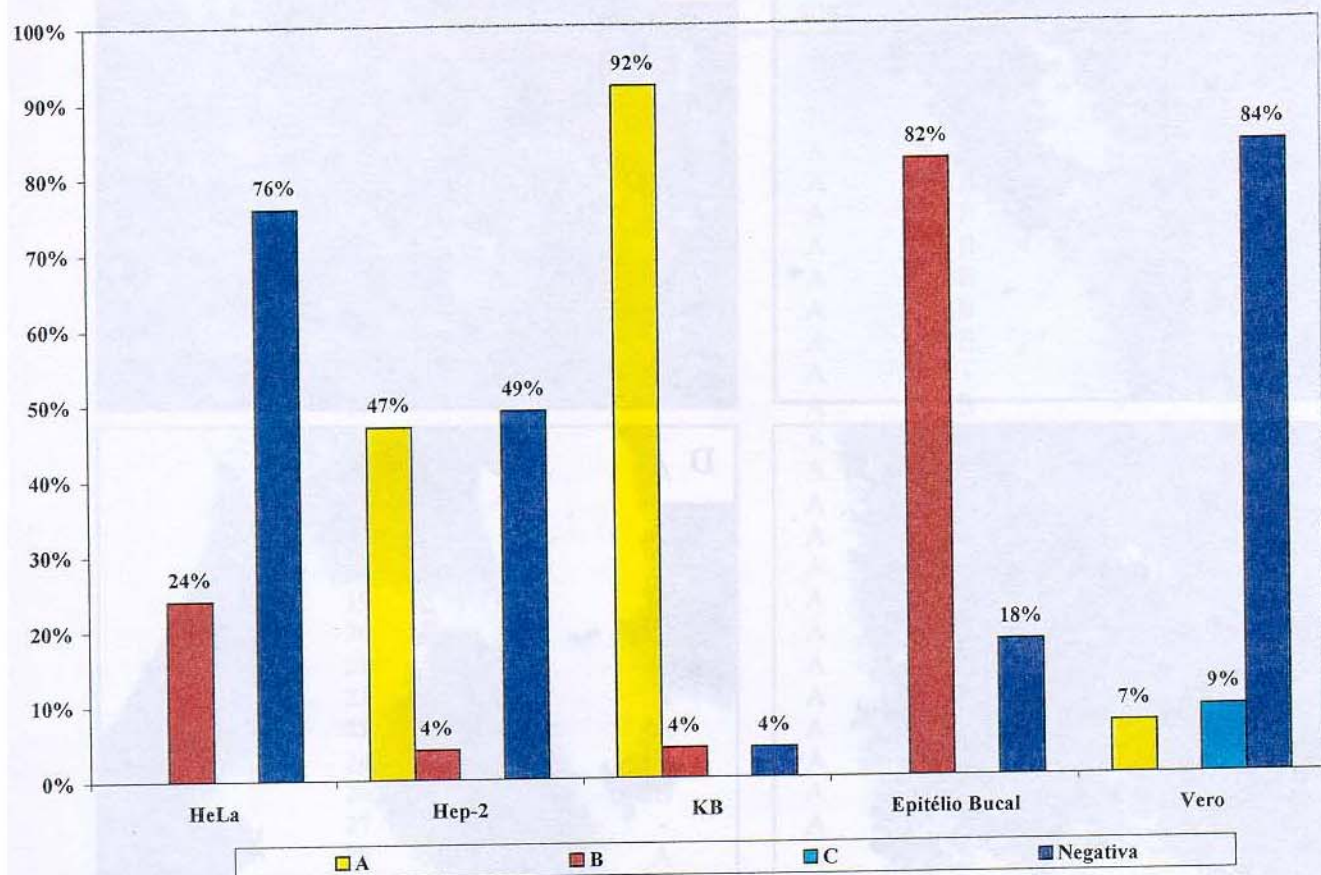
Linhagens	Adesão				
	HeLa	Hep-2	KB	Epit.	Vero
01	-	A	A	B	-
02	B	B	-	B	-
03	-	A	B	B	-
05	-	-	A	B	-
06	-	A	A	B	-
07	B	-	A	B	-
08	-	-	A	B	-
09	B	A	A	B	C
10	-	-	A	B	-
11	-	-	A	B	-
12	-	-	A	-	-
13	B	-	A	B	-
14	-	-	A	B	-
15	-	A	A	B	-
16	-	-	A	B	-
17	-	A	A	B	-
18	-	A	A	B	-
19	-	A	A	B	-
20	B	-	A	-	-
21	-	A	A	-	-
22	-	A	A	B	A
23	-	A	A	B	-
24	-	A	A	B	-
26	B	B	A	B	-
27	B	-	A	B	-
28	B	A	A	B	-
29	-	-	A	B	-
30	B	-	B	-	-
31	-	-	A	B	-
32	-	-	A	-	-
33	-	-	A	B	-
34	-	A	A	-	A
35	-	A	A	B	-
36	-	-	A	B	-
37	B	A	A	B	-
38	-	-	A	-	A
39	-	A	A	-	-
40	-	-	-	B	C
41	B	A	A	-	-
42	-	-	A	B	C
43	-	A	A	B	-
44	-	A	A	B	C
45	-	-	A	B	-
46	-	-	A	B	-
47	-	A	A	B	-

Tipos de adesão : A - células bacterianas arranjadas em grumos distribuídos de maneira difusa; B - células bacterianas distribuídas de maneira difusa; C - células bacterianas distribuídas de maneira localizada.



**Figura 05** - Fotos de Adesão de linhagens de *Haemophilus influenzae* em células cultivadas *in vitro*. **A:** linhagem 18, distribuída em grupos sobre células HEp-2, demonstrando o padrão A de adesão. **B:** linhagem 02, com corpos bacterianos distribuídos de maneira difusa sobre, demonstrando o padrão B de adesão em HEp-2. **C:** linhagem 30 demonstrando o padrão B de adesão em células KB. **D:** linhagem 42, com a presença localizada de corpos bacteriano sobre as células Vero, demonstrando o padrão C de adesão. **E:** linhagem 36, mostrando o padrão B de adesão em células do epitélio bucal e **F:** linhagem 07 demonstrando o padrão B de adesão em células HeLa. Magnificação de 1000X, coloração May Grünwald-Giemsa.

## Adesão a Células



**Figura 06** – Gráfico dos percentuais dos diferentes tipos de adesão das linhagens mediante este em culturas de células *in vitro*.

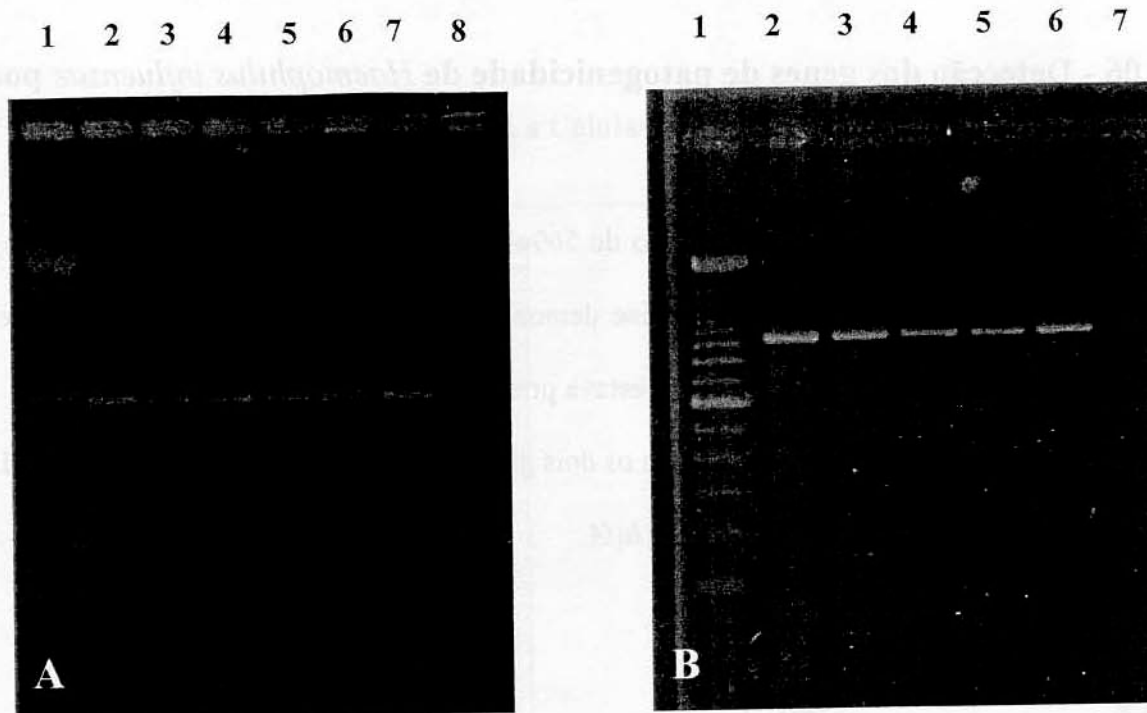
## 06 - Detecção dos genes de patogenicidade de *Haemophilus influenzae* por

### PCR

A presença dos genes *hmr* (fragmento de 569pb) e do gene *lic1* (fragmento de 829pb) foi pesquisada através de PCR (figura 07). Tal análise demonstrou que o gene *hmr* estava presente em 24% das linhagens estudadas enquanto o gene *lic1* estava presente em 11% das linhagens.

Destas, 3 linhagens (7%) apresentaram os dois genes, as linhagens 13, 32 e 37 (tabela VII).

Nenhuma linhagem apresentou o gene *hifA*.



**Figura 07** – Geis de agarose (1,5%). **(A)** Perfil eletroforético do fragmento de 569pb produtos da amplificação do gene *hmw*, canaletas: **1** - 100bp DNA Ladder Life Technologies; **2 e 3** - linhagem referência 19 (linhagem de referência); **4** - Linhagem 06; **5** - Linhagem 07; **6** - Linhagem 32; **7** - Linhagem 37 e **8** - Linhagem 27 (controle negativo). **(B)** Perfil eletroforético do fragmento de 829pb do gene *lic1*: **1** - 100bp DNA Ladder Life Technologies; **2 e 3** - Linhagem padrão 13; **4** - Linhagem 36; **5** - Linhagem 37; **6** - Linhagem 38 e **7** - Linhagem 9 (controle negativo).

Tabela VII – Genes *lic1* e *hmv* detectados por PCR

Linhagens	Genes Detectados por PCR	
	<i>licA</i>	<i>hmv</i>
01	-	-
02	-	-
03	-	+
05	-	-
06	-	+
07	-	+
08	-	-
09	-	-
10	-	+
11	-	-
12	-	+
13	+	+
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
26	-	-
27	-	+
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	-
32	+	+
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	+	-
37	+	+
38	+	-
39	-	-
40	-	+
41	-	-
42	-	-
43	-	-
44	-	-
45	-	-
46	-	-
47	-	-

## **07 - Análise do Polimorfismo obtido com a amplificação por PCR da região 16S *rDNA* seguida de restrição**

A amplificação por PCR da região 16S *rDNA* das linhagens de *Haemophilus influenzae* apresentou um fragmento de aproximadamente 1100 pb. A digestão deste fragmento com a enzima *Bam*HI produziu dois padrões distintos quanto ao número e tamanho dos fragmentos (figura 08). O primeiro perfil demonstra a não digestão do fragmento apresentado pela linhagem 02, já o segundo perfil demonstra a digestão em dois fragmentos de tamanhos distintos, um de aproximadamente 880pb e outro de 160pb (figura 09.1).

Com a digestão do fragmento 16S *rDNA* com a enzima *Hae*III, houve a obtenção de 4 perfis diferentes de restrição, com números e tamanhos de fragmentos distintos (figuras 08 e 09.2). O primeiro deles, é formado por dois fragmentos, um com aproximadamente 785pb e outro com 235pb. O segundo perfil encontrado a partir da digestão com a mesma enzima é formado por três fragmentos de 785pb, 480pb e 235pb. O terceiro perfil encontrado mostra, também, a existência de três fragmentos obtidos a partir da digestão com a enzima *Hae*III, são fragmentos de aproximadamente 685pb, 480pb e 330pb. Já o quarto perfil obtido também mostra a presença de três fragmentos, um de aproximadamente 480 pb e dois fragmentos de 143pb e 180 pb (figura 08).

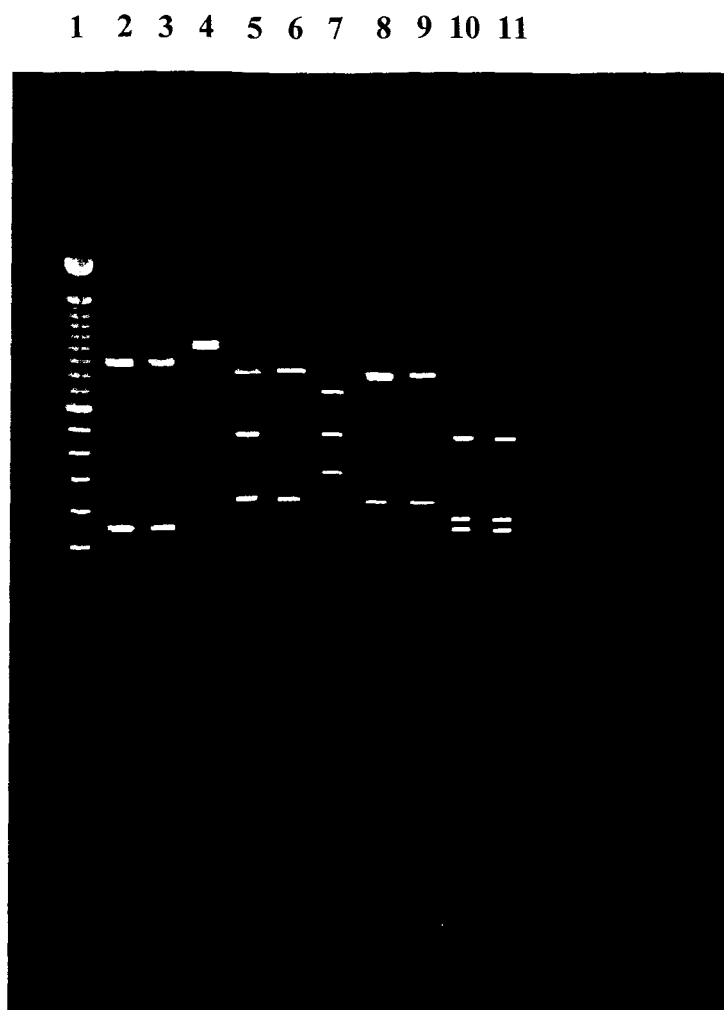
Posteriormente, os perfis de restrição do fragmento 16S *rDNA* de *H. Influenzae* obtidos a partir da digestão com a enzima *Bam*HI e *Hae*III, separadamente, foram distribuídos em um dendrograma de dissimilaridade pelo Software Popgene 32, o que resultou numa distribuição em 4 ramos distintos, como mostra a figura 10.

Tal distribuição, não mostra relações entre a distribuição das linhagens no dendrograma e as características biológicas estudadas (biotipo, sorotipo, propriedades de adesão a células cultivadas *in*

*vitro*, perfil plasmidial e presença dos genes *lic1* e *hmv*)(tabela VIII), mesmo sendo encontradas linhagens com o mesmo perfil eletroforético de restrição para a região 16S *rDNA*.

Verifica-se que tal metodologia não é satisfatória, pelo fato de apresentar uma baixa discriminação das diferentes linhagens deste estudo.

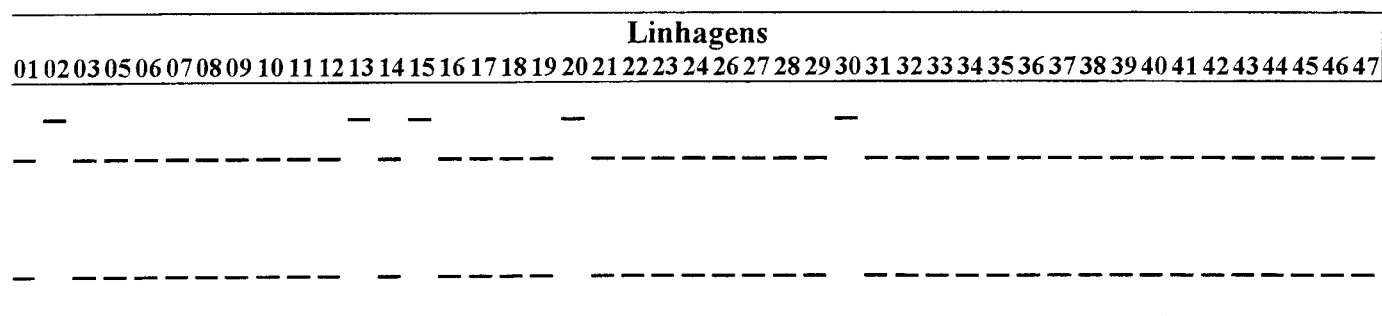
Entretanto, ao se analisar a origem das linhagens, e a distribuição das mesmas no dendrograma, verifica-se que linhagens de origens diferentes localizaram-se no mesmo agrupamento, como fica demonstrado no ramo 1 do dendrograma. Isso sugere uma relação entre linhagens consideradas oportunistas e isoladas de sítios (ramo 1, linhagens isoladas de pacientes com fibrose cística) com aquelas que conservam características genéticas das linhagens de *H. influenzae* invasivas, como linhagens isoladas de líquido, secreção ocular, amigdalite, também presentes no mesmo ramo de igualdade.



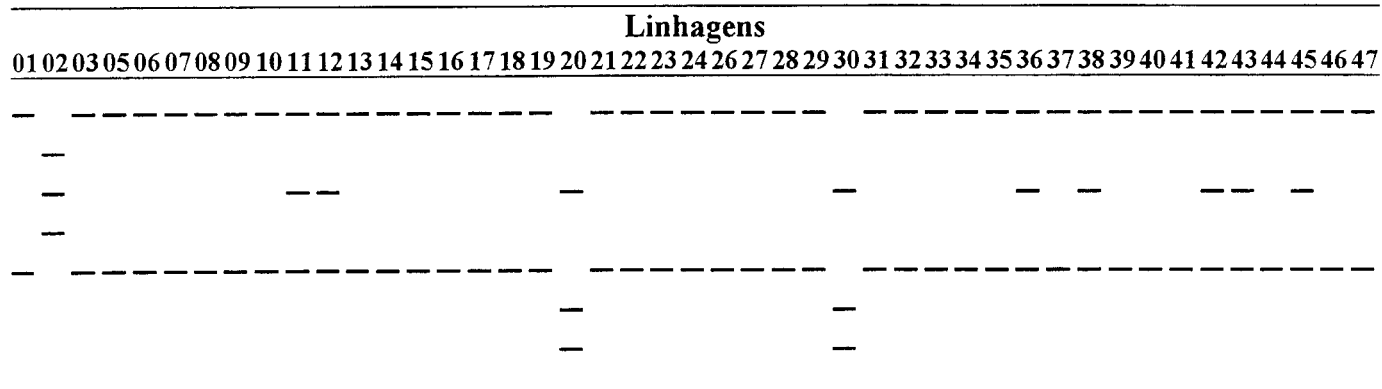
**Figura 08** - Gel de agarose (1,5%) - Perfis eletroforéticos do fragmento de 1,1kb do 16S *rDNA* de *Haemophilus influenzae*, mediante digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hae*III, contendo em: 1 - 100bp DNA Ladder Life Technologies, 2 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 43 digerido com *Bam*HI, 3 - Fragmento da Linhagem 44 digerido com *Bam*HI, 4 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 30 digeridos com *Bam*HI, 5 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 45, 6 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 01 digerido com a enzima *Hae*III, 7 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 02 digerido com a enzima *Hae*III, 8 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 14 digerido com a enzima *Hae*III, 9 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 16 digerido com a enzima *Hae*III, 10 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 20 digerido com a enzima *Hae*III, 11 - Fragmento 16S *rDNA* da Linhagem 30 digerido com a enzima *Hae*III.

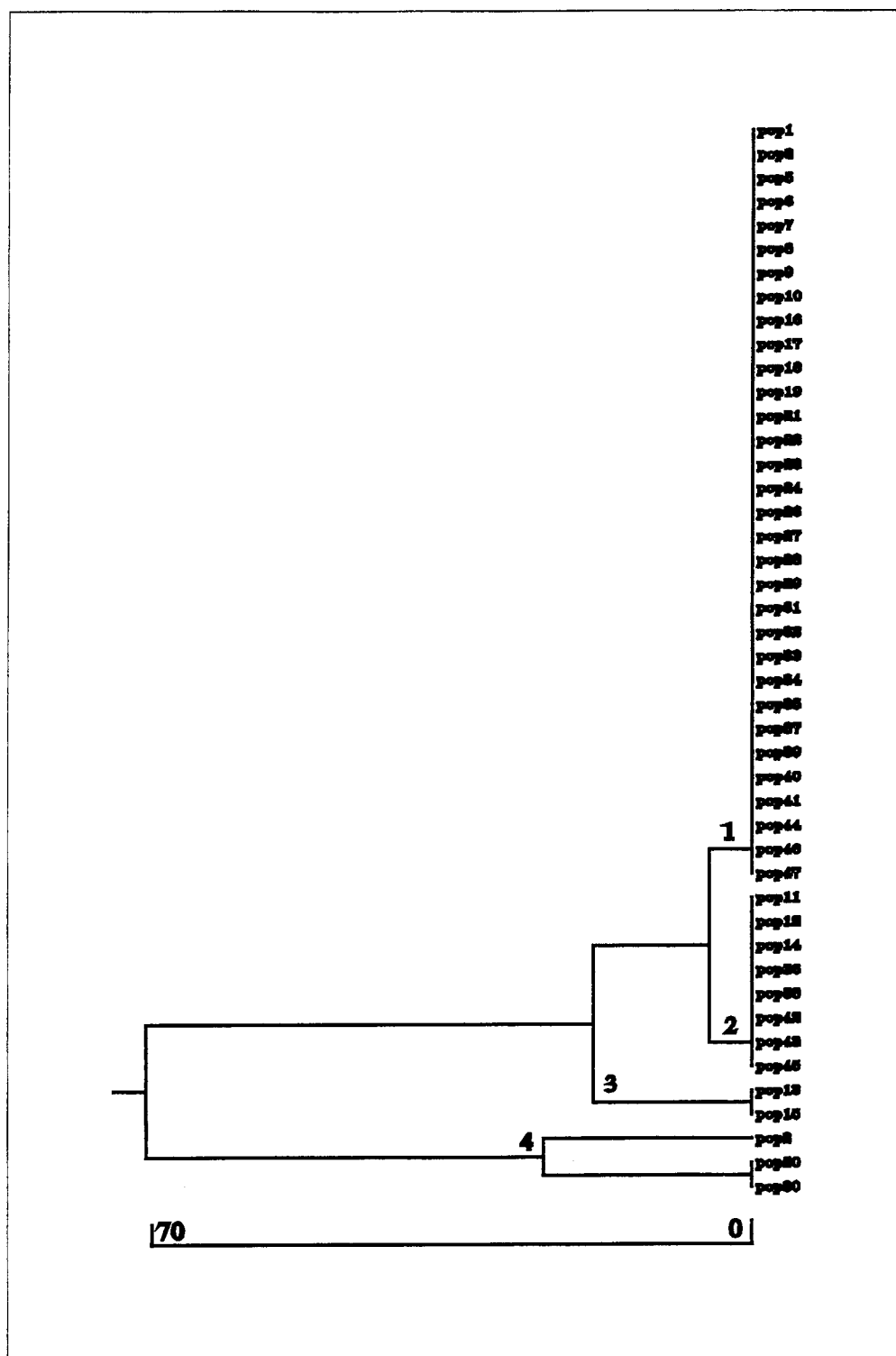
**Figura 09 – Zimogramas de digestão dos fragmentos de 16S *rDNA* de  
*Haemophilus influenzae***

**Figura 09.1 – Zimograma mostrando digestão com a enzima *Bam*HI**



**Figura 09.2 – Zimograma mostrando digestão com a enzima *Hae*III**





**Figura 10** - Dendrograma do Grau de Dissimilaridade do 16S *rDNA*, mediante análise após a digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hae*III nas linhagens de *Haemophilus influenzae* - Método de UPGMA mod. Neighbor, 1978 - programa Popgen 32.

**Tabela VIII – Distribuição das linhagens de *Haemophilus influenzae* no Polimorfismo da Região 16S *rDNA* e Características Biológicas**

Pop	Origem	Biotipo	Sorotipo	Plasmídeos	Genes Detectados		HeLa	Hep-2	Adesão		Epit.	Vero
					<i>licI</i>	<i>hmr</i>			KB			
01	FC	I	NT	-	-	-	<sup>a</sup>	A	A	B	-	-
03	FC	VIII	NT	-	-	+	-	A	B	B	-	-
05	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	-
06	FC	IV	NT	-	-	+	-	A	A	B	-	-
07	FC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-	-
08	FC	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	-
09	FC	IV	NT	-	-	-	B	A	A	B	C	-
10	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	B	-	-
16	FC	IV	NT	4	-	-	-	-	A	B	-	-
17	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	-
18	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	-
19	IF	IV	NT	3	-	-	-	A	A	B	-	-
21	AM	III	NT	5	-	-	-	A	A	-	-	-
22	AM	I	NT	7	-	-	-	A	A	B	A	-
23	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	-
24	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	-
26	OC	I	NT	-	-	-	B	B	A	B	-	-
27	OC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-	-
28	OC	I	NT	3	-	-	B	A	A	B	-	-
29	SP	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	-
31	SN	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	-
32	LB	I	NT	-	+	+	-	-	A	-	-	-
33	LB	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	-
34	LB	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	A	-
35	ES	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	-
37	PN	I	NT	-	+	+	B	A	A	B	-	-
39	LCR	IV	NT	-	-	-	-	A	A	-	-	-
40	LCR	I	NT	-	-	+	-	-	-	B	C	-
41	LCR	I	NT	-	-	-	B	A	A	-	-	-
44	LP	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	C	-
46	HM	I	b	-	-	-	-	-	A	B	-	-
47	HM	IV	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	-
11	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	-
12	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	-	-	-
14	FC	I	NT	2	-	-	-	-	A	B	-	-
36	PN	I	NT	-	+	-	-	-	A	B	-	-
38	PN	I	a	-	+	-	-	-	A	-	A	-
42	LCR	I	b	2	-	-	-	-	A	B	C	-
43	LCR	IV	b	7	-	-	-	A	A	B	-	-
45	HM	V	b	-	-	-	-	-	A	B	-	-
13	FC	I	NT	2	+	+	B	-	A	B	-	-
15	FC	VI	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	-
02	FC	I	NT	1	-	-	B	B	-	B	-	-
20	IB	VI	NT	-	-	-	B	-	A	-	-	-
30	LS	VI	NT	-	-	-	B	-	B	-	-	-

Abreviações: FC = fibrose cística; IF = infecção de faringe; IB = infecção brônquica; AM = amigdalite; BAL = lavado brônquio-alveolar; OC = secreção ocular; SP = sinusite; LS = líquido sinovial; SN = sinosite; LB = lavado brônquico; ES = escarro; PN = pneumonia; LCR = líquido céfalo-raquidiano (meningite); LP = líquido pleural; HM – hemocultura. Tipos de adesão : A - células bacterianas arranjadas em grumos distribuídos de maneira difusa; B - células bacterianas distribuídas de maneira difusa; C - células bacterianas distribuídas de maneira localizada.

## 08 - Ribotipagem com a sonda de 16S *rDNA* amplificado por PCR

Para o estudo do polimorfismo existente entre as linhagens estudadas e mensurar a capacidade discriminante das metodologias de análise filogenética do *Haemophilus influenzae*, promoveu-se uma amplificação da região do 16S *rDNA* do próprio microorganismo. Tal amplificação visou a obtenção de uma sonda proveniente da própria espécie bacteriana - a sonda 16S *rDNA* (sendo utilizado o amplificado da linhagem 46 tipo b biotipo I). Foram obtidos assim, 30 fragmentos eletroforéticos distintos (figuras 11 e 12), com pesos moleculares variáveis entre 195 a 19212 pb , através do corte do DNA genômico das linhagem com a enzima *EcoRI*.

O dendrograma de dissimilaridade obtido, permitiu agrupar as linhagens em 5 ramos (figura 13). Relacionando a distribuição das linhagens no dendrograma e as características biológicas estudadas neste trabalho, verificou-se um agrupamento de 67% das linhagens pertencentes ao biotipo I nos ramos 3, 4 e 5 (Tabela IX). Ainda no ramo 4, vê-se que além de apresentar linhagens filogeneticamente próximas, há também linhagens que apresentaram o mesmo perfil eletroforético formando grupos de igualdade dentro do dendrograma como as linhagens 28 e 31 (ambas do mesmo biotipo), 35 e 43 (que apesar de serem de biotipos e sorotipos distintos apresentaram o mesmo perfil eletroforético).

Os demais ramos apresentaram-se mistos quanto à distribuição das linhagens segundo seus biotipos, não demonstrando nenhuma discriminação das linhagens nem quanto ao biotipo, nem quanto a nenhuma das outras características biológicas estudadas e descritas na tabela IX.

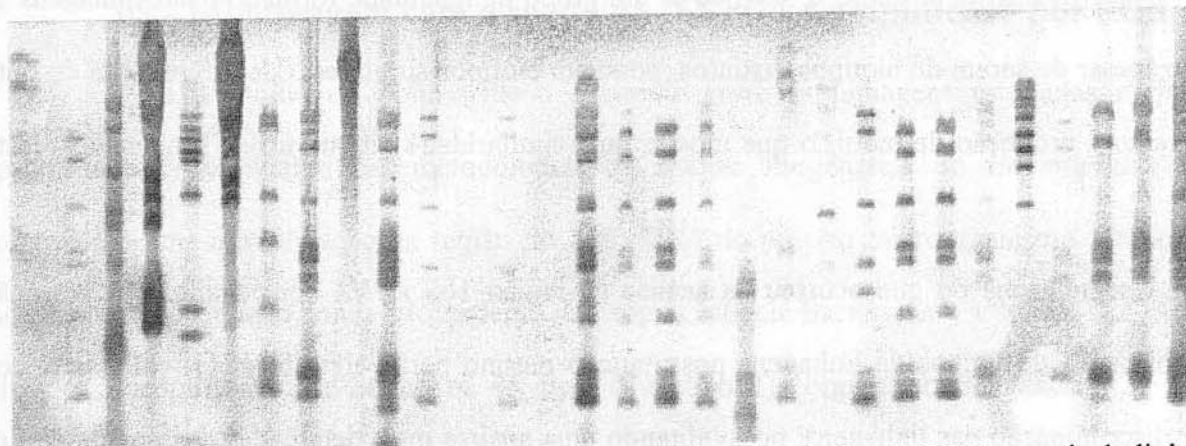
Entretanto, nos ramos 1 e 2, verifica-se grupos de igualdade quanto aos perfis eletroforéticos, como o que ocorre com as linhagens 05, 07 e 16 no ramo 1, que apresentam o mesmo perfil eletroforético, biotipo e sorotipo, além das linhagens 22, 23 e 24 que se apresentaram nas mesmas condições.

Especificamente no ramo 2, verifica-se um grupo de igualdade formado pelas linhagens 27, 37 e 39 que apesar de serem de biotipos distintos, possuem biotipos similares, que diferem um do outro somente quanto à produção de indol, o que mostra uma similaridade bioquímica e filogenética destas linhagens.

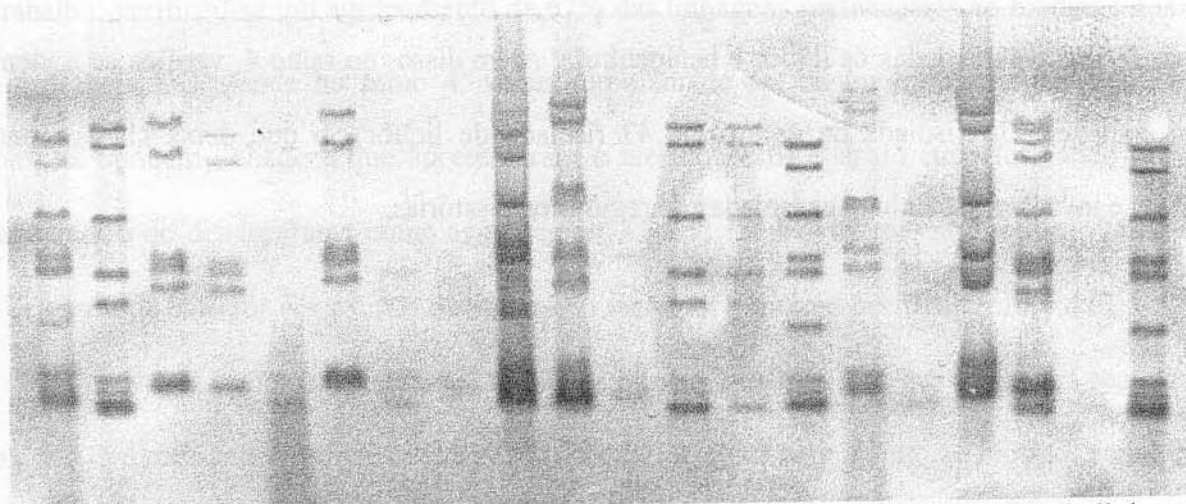
À semelhança do que ocorreu na análise da região 16S *rDNA* com enzimas de restrição, ocorreu a formação de grupos de linhagens possuindo o mesmo perfil eletroforético, entretanto, com uma maior discriminação das linhagens, possibilitando uma análise mais detalhadas das populações em estudo.

Quanto à distribuição das linhagens no dendrograma segundo suas origens, verificou-se nos ramos 1 e 2, uma discriminação das linhagens isoladas de pacientes com fibrose cística (70% do total de linhagens desse ramo) e ainda, certa identidade entre essas estirpes, com linhagens invasivas como as linhagens 39, 40 e 47 isoladas de líquido e hemocultura. Além disso, no ramo 4, verifica-se a identidade entre as linhagens 35 (isolada de escarro) e 43 (isolada de líquido), o que deixa claro o potencial patogênico e invasivo das linhagens isoladas de regiões respiratórias.

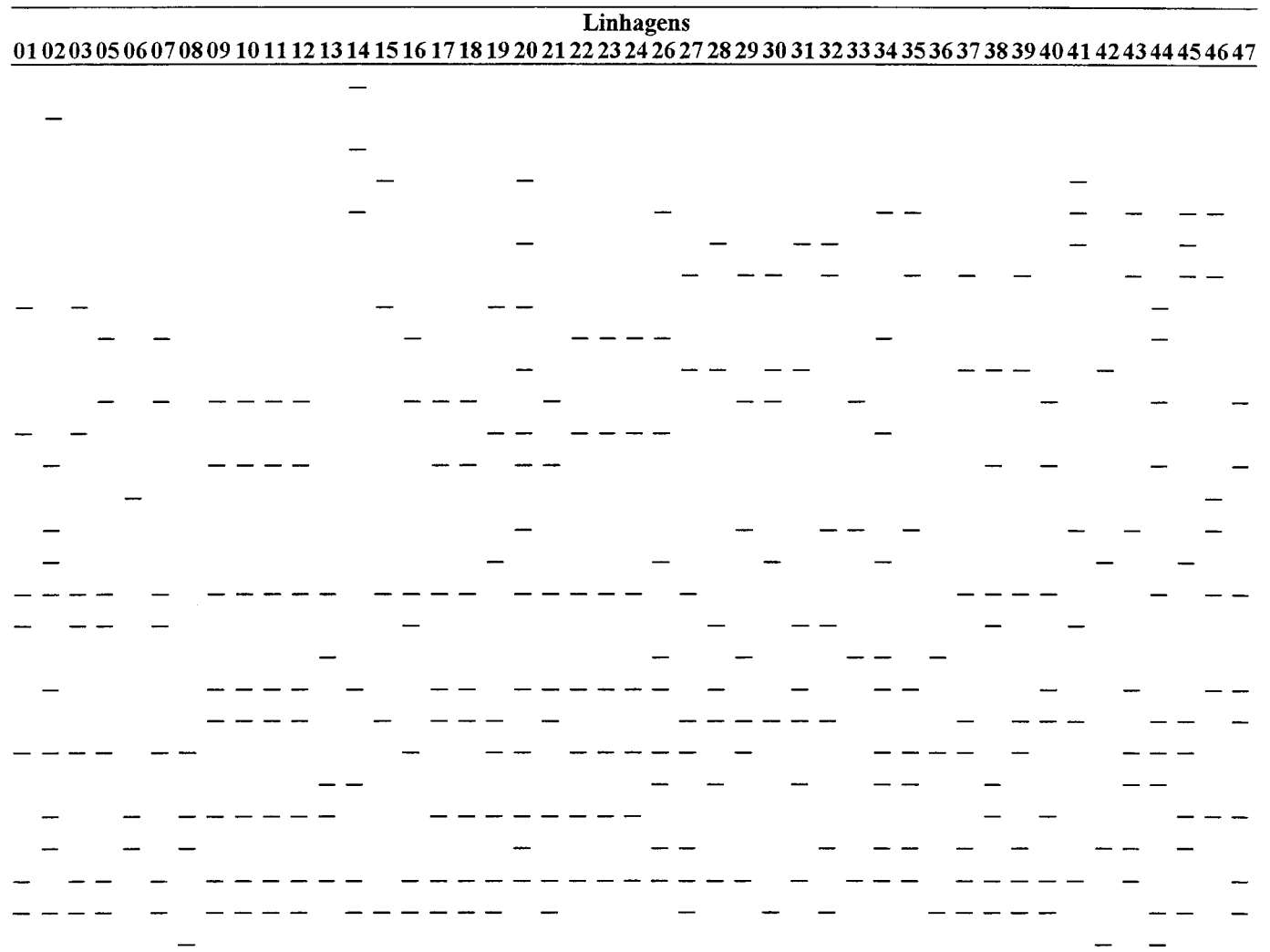
**Figura 11 - Ribotipagem com sonda 16S *rDNA* amplificada por PCR**

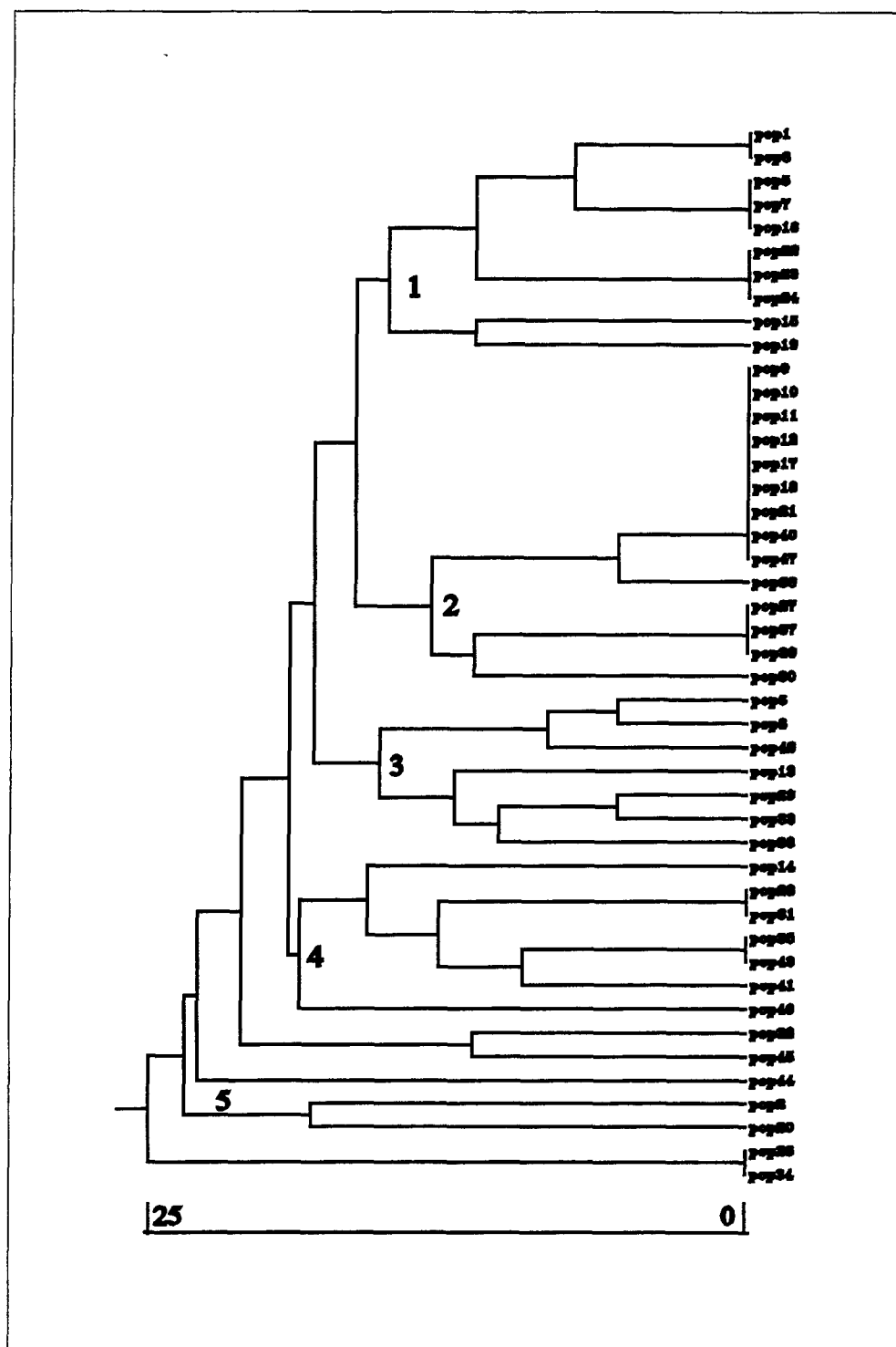


**Figura 11.1** - Ribotipagem usando sonda 16S *rDNA* obtido pela técnica de PCR a partir da linhagem 46 (esquerda para a direita): linhagem 38(sorotipo a), linhagem 46 (sorotipo b), linhagem ATCC 9007 (sorotipo c), linhagem NCTC10479 (sorotipo e), linhagem NCTC (sorotipo F), linhagem C2836 (não capsulada), linhagens 01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24.



**Figura 11.2** - Ribotipagem usando sonda 16S *rDNA* obtido pela técnica de PCR a partir da linhagem 46 (esquerda para a direita): linhagens 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47.





**Figura 13** - Dendrograma do Grau de Dissimilaridade do 16S *rDNA*, sonda obtida por reação de amplificação em cadeia (PCR), das Linhagens *Haemophilus influenzae* - Método de UPGMA mod. Neighbor, 1978 - programa Popgen 32.

Tabela IX – Distribuição das linhagens de *Haemophilus influenzae* na Ribotipagem com sonda obtida por Amplificação e Características Biológicas

Pop	Origem	Biotipo	Sorotipo	Plasmídios	Genes Detectados		HeL	Hep-	Adesão		Epit.	Vero
					<i>licI</i>	<i>hmv</i>			KB			
01	FC	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
03	FC	VIII	NT	-	-	+	-	A	B	B	-	
05	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	
07	FC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-	
16	FC	IV	NT	4	-	-	-	-	A	B	-	
22	AM	I	NT	7	-	-	-	A	A	B	A	
23	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
24	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
15	FC	VI	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
19	IF	IV	NT	3	-	-	-	A	A	B	-	
09	FC	IV	NT	-	-	-	B	A	A	B	C	
10	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	B	-	
11	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	
12	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	-	-	
17	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
18	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
21	AM	III	NT	5	-	-	-	A	A	-	-	
40	LCR	I	NT	-	-	+	-	-	A	B	C	
47	HM	IV	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
38	PN	I	a	-	+	-	-	-	A	-	A	
27	OC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-	
37	PN	I	NT	-	+	+	B	A	A	B	-	
39	LCR	IV	NT	-	-	-	-	A	A	-	-	
30	LS	VI	NT	-	-	-	B	-	B	-	-	
06	FC	IV	NT	-	-	+	-	A	A	B	-	
08	FC	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	
42	LCR	I	b	2	-	-	-	-	A	B	C	
13	FC	I	NT	2	+	+	B	-	A	B	-	
29	SP	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	
33	LB	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	
36	PN	I	NT	-	+	-	-	-	A	B	-	
14	FC	I	NT	2	-	-	-	-	A	B	-	
28	OC	I	NT	3	-	-	B	A	A	B	-	
31	SN	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	
35	ES	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	
43	LCR	IV	b	7	-	-	-	A	A	B	-	
41	LCR	I	NT	-	-	-	B	A	A	-	-	
46	HM	I	b	-	-	-	-	-	A	B	-	
32	LB	I	NT	-	+	+	-	-	A	-	-	
45	HM	V	b	-	-	-	-	-	A	B	-	
44	LP	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	C	
02	FC	I	NT	1	-	-	B	B	-	B	-	
20	IB	VI	NT	-	-	-	B	-	A	-	-	
26	OC	I	NT	-	-	-	B	B	A	B	-	
34	LB	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	A	

Abreviações: FC = fibrose cística; IF = infecção de faringe; IB = infecção brônquica; AM = amigdalite; BAL = lavado brônquio-alveolar; OC = secreção ocular; SP = sinusite; LS = líquido sinovial; SN = sinusite; LB = lavado brônquico; ES = escarro; PN = pneumonia; LCR = líquido céfalo-raquidiano (meningite); LP = líquido pleural; HM – hemocultura. Tipos de adesão : A - células bacterianas arranjadas em grumos distribuídos de maneira difusa; B – células bacterianas distribuídas de maneira difusa; C – células bacterianas distribuídas de maneira localizada.

## 09 - Ribotipagem com sonda *pRR64*

Como resultado da hibridização com a sonda *pRR64*, foram obtidos 56 fragmentos de DNA hibridizados, com pesos moleculares variáveis entre 800 e 15193pb, após o corte do DNA genômico com a enzima *EcoRI* (figura 14 e 15).

Ao se confrontar a distribuição das linhagens do dendrograma da figura 18 com os demais dados obtidos (tabela VIII), verificou-se uma discriminação nos ramos 2 a 8 de 61% das linhagens do biotipo I (14 linhagens das 23 pertencentes ao biotipo I) e 79% das linhagens do biotipo IV (11 das 14 linhagens pertencentes ao biotipo IV). Das 27 linhagens discriminadas nestes ramos, 25 (92%) são pertencentes aos biotipos I ou IV.

No ramo 1, houve a discriminação das 3 linhagens do biotipo VIII, entretanto, 9 linhagens desse ramo são pertencentes ao biotipo I, 3 pertencentes ao biotipo IV e 2 pertencentes ao biotipo VI. Isso mostra a formação de um ramo misto, assim como parte do ramo 2 e 3, ambos possuidores de linhagens pertencentes aos biotipo I, IV, V e VI.

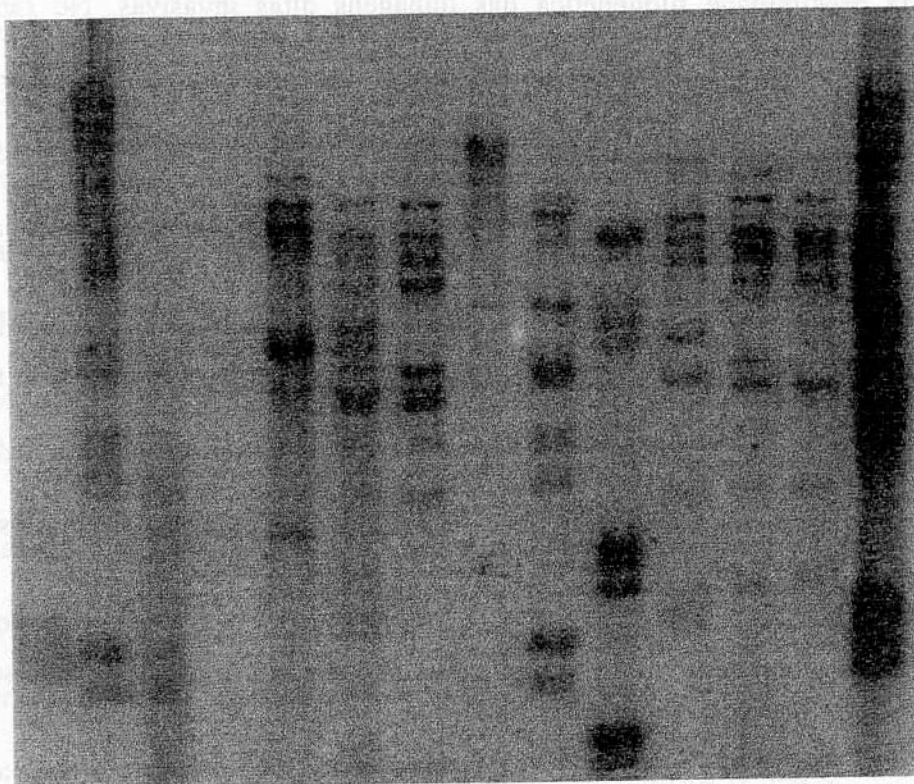
Esta metodologia demonstrou a falta de identidade entre as linhagens, já que não foi identificado nenhum perfil eletroforético igual entre as linhagens estudadas. Tal condição, ainda permite avaliar, através do perfil eletroforético obtido, que existem linhagens próximas filogeneticamente como por exemplo, no ramo 2 as linhagens 34, 39, 38 e 35, que pertencem ao mesmo biotipo ou biotipos semelhantes (biotipo I e IV) (Tabela X). O mesmo ocorre com as linhagens do ramo 7 (linhagens 41, 43, 46, 44 e 47) pertencentes aos biotipos I e IV, que diferem bioquimicamente quanto à produção de indol. Com as linhagens 11 e 12 no ramo 8 verifica-se a discriminação de linhagens pertencentes ao mesmo biotipo, assim como no ramo 6, entre as linhagens 14 e 28.

Quanto à relação entre a origem das linhagens e sua distribuição no dendrograma, verificou-se que, apesar de não existir identidade entre linhagens, aquelas provenientes do trato respiratório apresentaram certa proximidade filogenética das linhagens ditas invasivas. No ramo 1, podemos observar ao analisar-se as origens das linhagens 7, 20, 22, 23 (provenientes do trato respiratório) e 40 (líquor), o que também pode ser observado no ramo 2 entre as linhagens 35 (isolada de escarro) e 39 (líquor). Vê-se portanto o claro potencial invasivo e patogênico das linhagens isoladas de sítios dos quais são consideradas oportunistas ou de baixa patogenicidade.

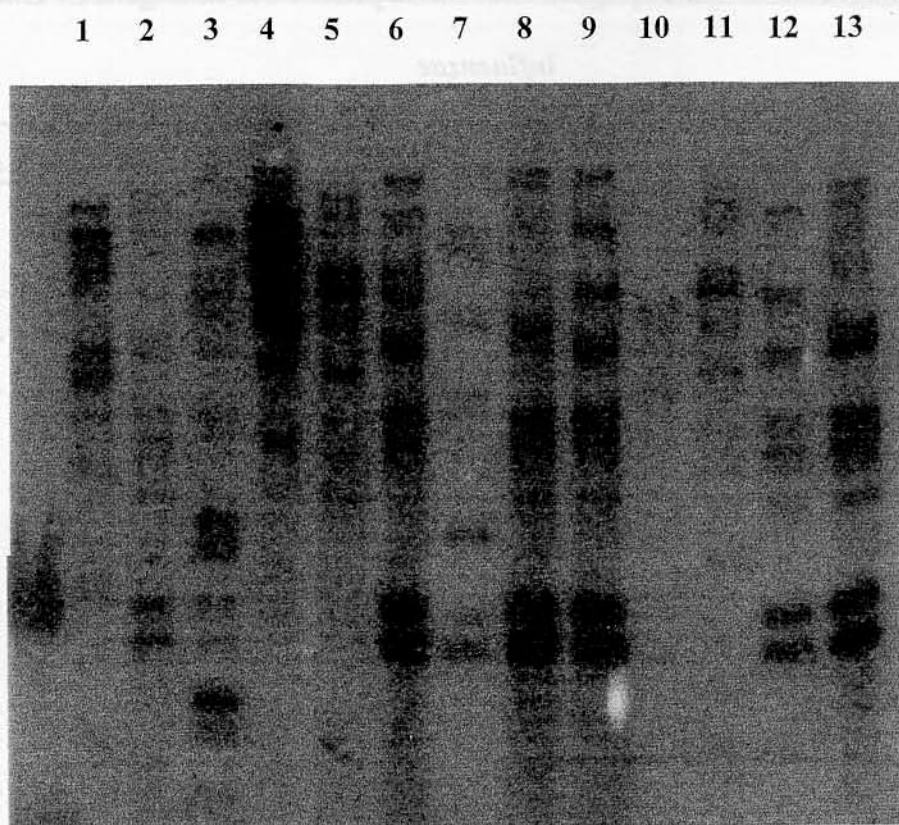
Todavia, não foram encontradas relações entre a distribuição das linhagens no dendrograma obtido por essa análise, com as demais características biológicas das linhagens estudadas (presença de genes *lic1* e *hmv*, adesão à células cultivadas *in vitro* e presença de plasmídios). Entretanto a ribotipagem com a sonda *pRR64*, permitiu uma maior discriminação entre as linhagens em comparação com as demais técnicas empregadas neste estudo, que utilizaram como região de análise filogenética o 16S *rDNA*.

**Figura 14 - Ribotipagem com sonda *pRR64***

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

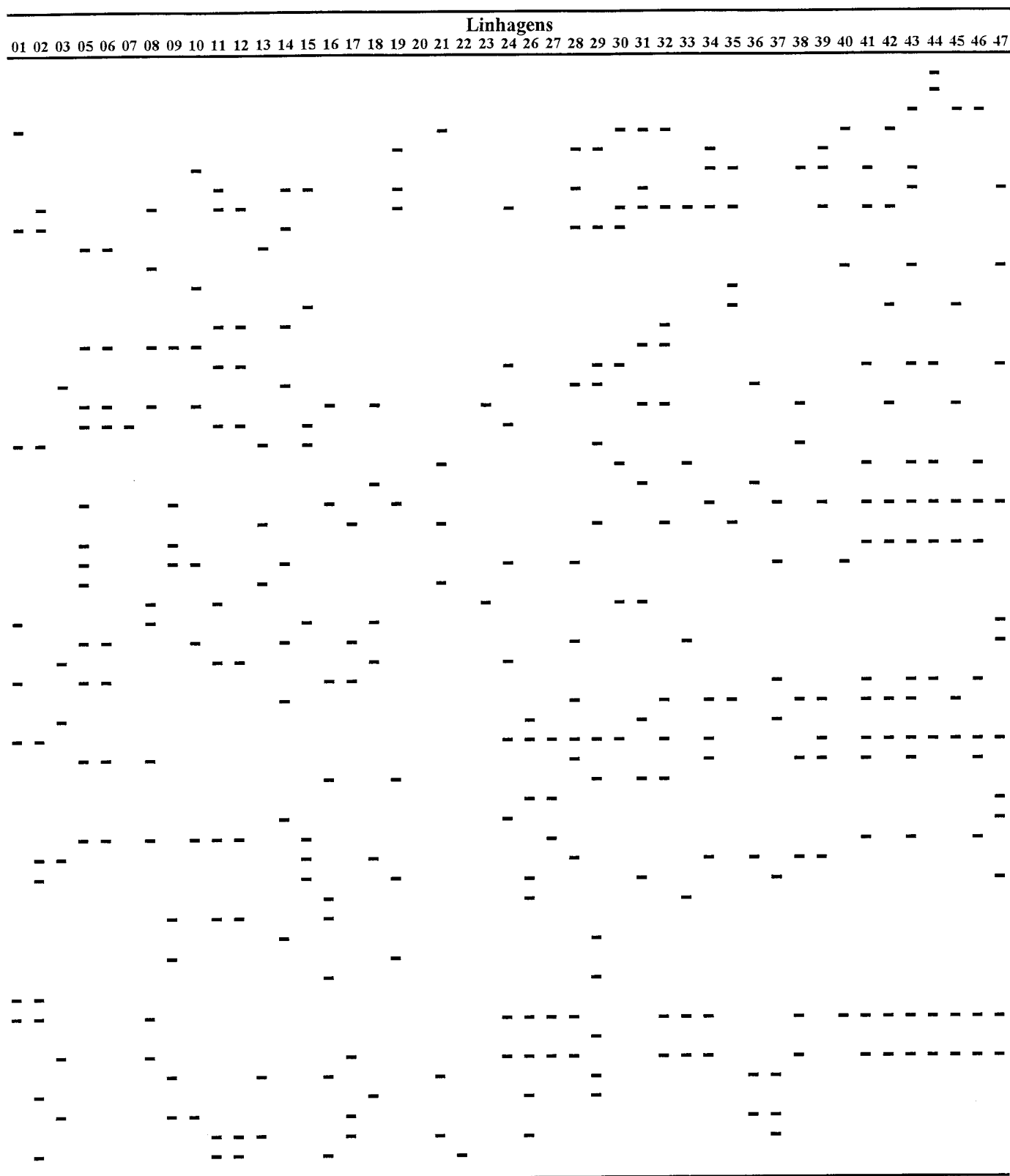


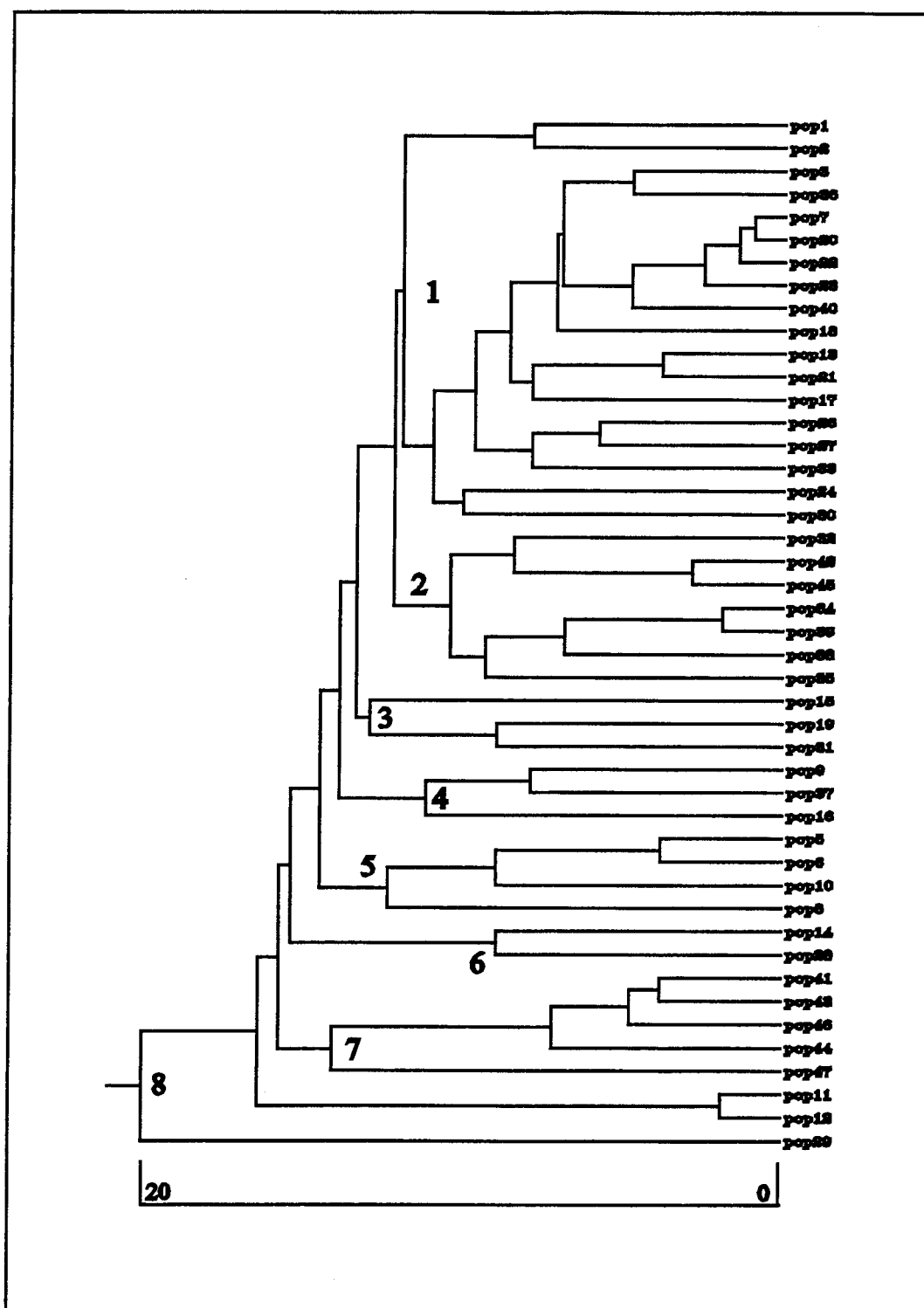
**Figura 14.1** – Auto-radiografia da Ribotipagem com sonda *pRR64* das linhagens, canaletas: **1** - Linhagem 01, **2** - Linhagem 02, **3** - Linhagem 03, **4** - Linhagem 04, **5** - Linhagem 05, **6** - Linhagem 06, **7** - Linhagem 07, **8** - Linhagem 08, **9** - Linhagem 09, **10** - Linhagem 10, **11** - Linhagem 11, **12** - Linhagem 12, **13** - Linhagem 13.



**Figura 14.2** – Auto-radiografia da Ribotipagem com sonda *pRR64* das linhagens canaletas: 1 - Linhagem 15, 2 - Linhagem 16, 3 - Linhagem 17, 4 - Linhagem 18, 5 - Linhagem 19, 6 - Linhagem 20, 7 - Linhagem 21, 8 - Linhagem 22, 9 - Linhagem 23, 10 - Linhagem 24, 11 - Linhagem 25, 12 - Linhagem 26, 13 - Linhagem 27.

**Figura 15 – Zimograma de Ribotipagem com sonda *pRR64* das linhagens de *Haemophilus influenzae***





**Figura 16** - Dendrograma do Grau de Dissimilaridade do *rDNA*, sonda *pRR64*, das Linhagens *Haemophilus influenzae* - Método de UPGMA mod. Neighbor, 1978 - programa Popgen 32.

Tabela X – Distribuição das linhagens de *Haemophilus influenzae* na Ribotipagem com sonda *pRR64* e Características Biológicas

Pop	Origem	Biotipo	Sorotipo	Plasmídios	Genes Detectados		HeLa	Adesão			
					<i>licl</i>	<i>hmw</i>		Hep-	KB	Epit.	Vero
01	FC	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
02	FC	I	NT	1	-	-	B	B	-	B	-
03	FC	VIII	NT	-	-	+	-	A	B	B	-
36	PN	I	NT	-	+	-	-	-	A	B	-
07	FC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-
20	IB	VI	NT	-	-	-	B	-	A	-	-
22	AM	I	NT	7	-	-	-	A	A	B	A
23	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
40	LCR	I	NT	-	-	+	-	-	-	B	A
18	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
13	FC	I	NT	2	+	+	B	-	A	B	-
21	AM	III	NT	5	-	-	-	A	A	-	-
17	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
26	OC	I	NT	-	-	-	B	B	A	B	-
27	OC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-
33	LB	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
24	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
30	LS	VI	NT	-	-	-	B	-	B	-	-
32	LB	I	NT	-	+	+	-	-	A	-	-
42	LCR	I	B	2	-	-	-	-	A	B	C
45	HM	V	B	-	-	-	-	-	A	B	-
34	LB	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	A
39	LCR	IV	NT	-	-	-	-	A	A	-	-
38	PN	I	A	-	+	-	-	-	A	-	A
35	ES	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
15	FC	VI	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
19	IF	IV	NT	3	-	-	-	A	A	B	-
31	SN	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
09	FC	IV	NT	-	-	-	B	A	A	B	C
37	PN	I	NT	-	+	+	B	A	A	B	-
16	FC	IV	NT	4	-	-	-	-	A	B	-
05	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
06	FC	IV	NT	-	-	+	-	A	A	B	-
10	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	B	-
08	FC	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
14	FC	I	NT	2	-	-	-	-	A	B	-
28	OC	I	NT	3	-	-	B	A	A	B	-
41	LCR	I	NT	-	-	-	B	A	A	-	-
43	LCR	IV	B	7	-	-	-	A	A	B	-
46	HM	I	B	-	-	-	-	-	A	B	-
44	LP	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	C
47	HM	IV	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
11	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
12	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	-	-
29	SP	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-

Abreviações: FC = fibrose cística; IF = infecção de faringe; IB = infecção brônquica; AM = amigdalite; BAL = lavado brônquio-alveolar; OC = secreção ocular; SP = sinusite; LS = líquido sinovial; SN = sinusite; LB = lavado brônquico; ES = escarro; PN = pneumonia; LCR = líquido céfalo-raquidiano (meningite); LP = líquido pleural, HM – hemocultura. Tipos de adesão : A - células bacterianas arranjadas em grumos distribuídos de maneira difusa; B - células bacterianas distribuídas de maneira difusa; C - células bacterianas distribuídas de maneira localizada.

## 10 - Eric PCR

A técnica de ERIC-PCR pôde demonstrar 25 diferentes fragmentos de DNA com pesos moleculares variáveis entre 120 a 3264pb (figuras 17 e 18).

Com a construção de um dendrograma observou-se a formação de 7 ramos de distribuição das linhagens (figura 19). Os ramos 1, 2, 3 e 4 apresentaram uma predominância de linhagens pertencentes aos biotipos I/IV, sendo que das 36 linhagens contidas nestes ramos, 20 (56%) são pertencentes ao biotipo I (83% das linhagens pertencentes a este biotipo) e 13 (36%) ao biotipo IV (tabela XI). Entretanto, no ramo 2, verifica-se a presença de linhagens do biotipo VIII e no ramo 3 linhagens do biotipo VI.

Observou-se também a formação de grupos de linhagens que apresentaram o mesmo perfil eletroforético com características biológicas em comum (tabela XI). Por exemplo, no ramo 1, linhagens dos biotipos I, IV e V que apresentaram o mesmo perfil eletroforético, e tem suas diferenças bioquímicas baseadas na produção do indol. O mesmo ocorreu entre as linhagens no ramo 2, com as linhagens 10, 36, 40, 41, 46, 47 e no ramo 3, com as linhagens 09 e 34, linhagens 23, 27, 37 e linhagens 42 e 43. Estas últimas, além de apresentarem o mesmo perfil eletroforético, também pertencem ao mesmo sorotipo sendo também portadoras de plasmídios.

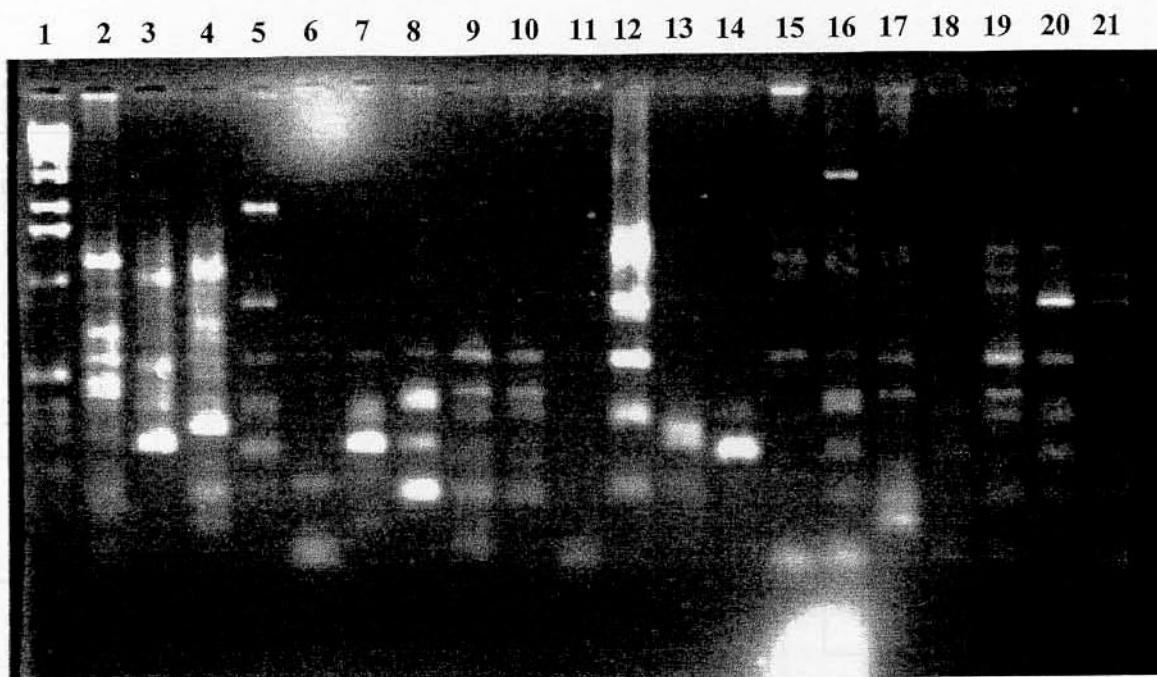
Todavia, houve também a formação de grupos que apresentaram linhagens pertencentes o mesmo biotipo e o mesmo perfil eletroforético como por exemplo, no ramo 3 com as linhagens 05, 07, 11, 12 e 33 (biotipo IV); no ramo 6 com as linhagens 20 e 30 (biotipo VI) e no ramo 7 com as linhagens 08 e 14 (biotipo I).

Além disso, uma discriminação ocorreu nestes mesmos ramos quanto à presença de plasmídios e dos genes *hmw* e *licI*. Verificou-se que 70% das linhagens portadoras de plasmídios

(excessão das linhagens 21 e 22), todas as linhagens em que o gene *lic1* foi detectado e 90% das linhagens em que foi detectado o gene *hmv* estão contidas dentre estes quatro ramos.

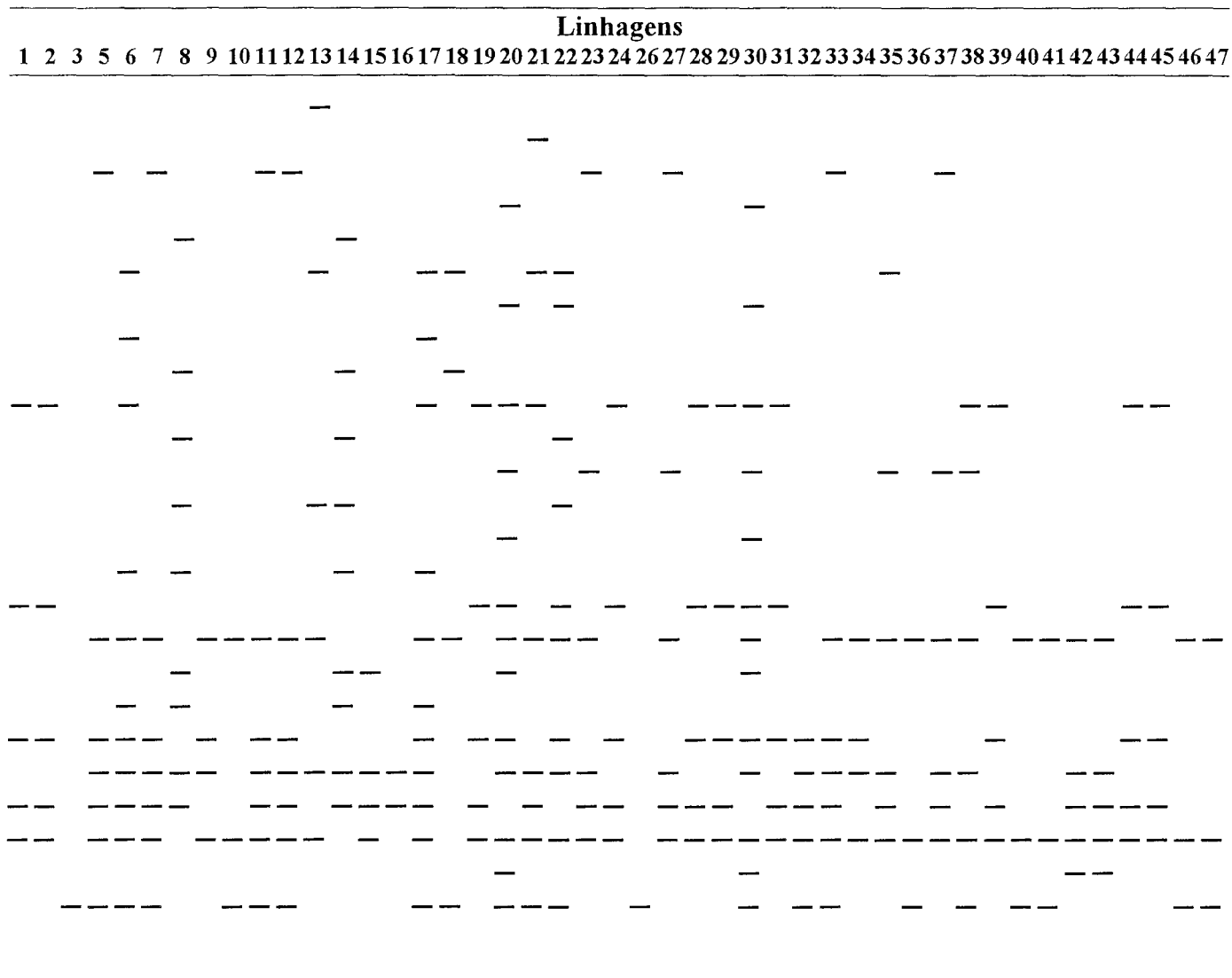
Com a análise dos fragmentos gerados pelo ERIC-PCR, constatou-se uma discriminação satisfatória das linhagens, mesmo havendo identidade entre algumas delas. Tal identidade, reflete nas características biológicas aqui analisadas, tornando a técnica de maior utilidade em caracterização filogenética neste estudo.

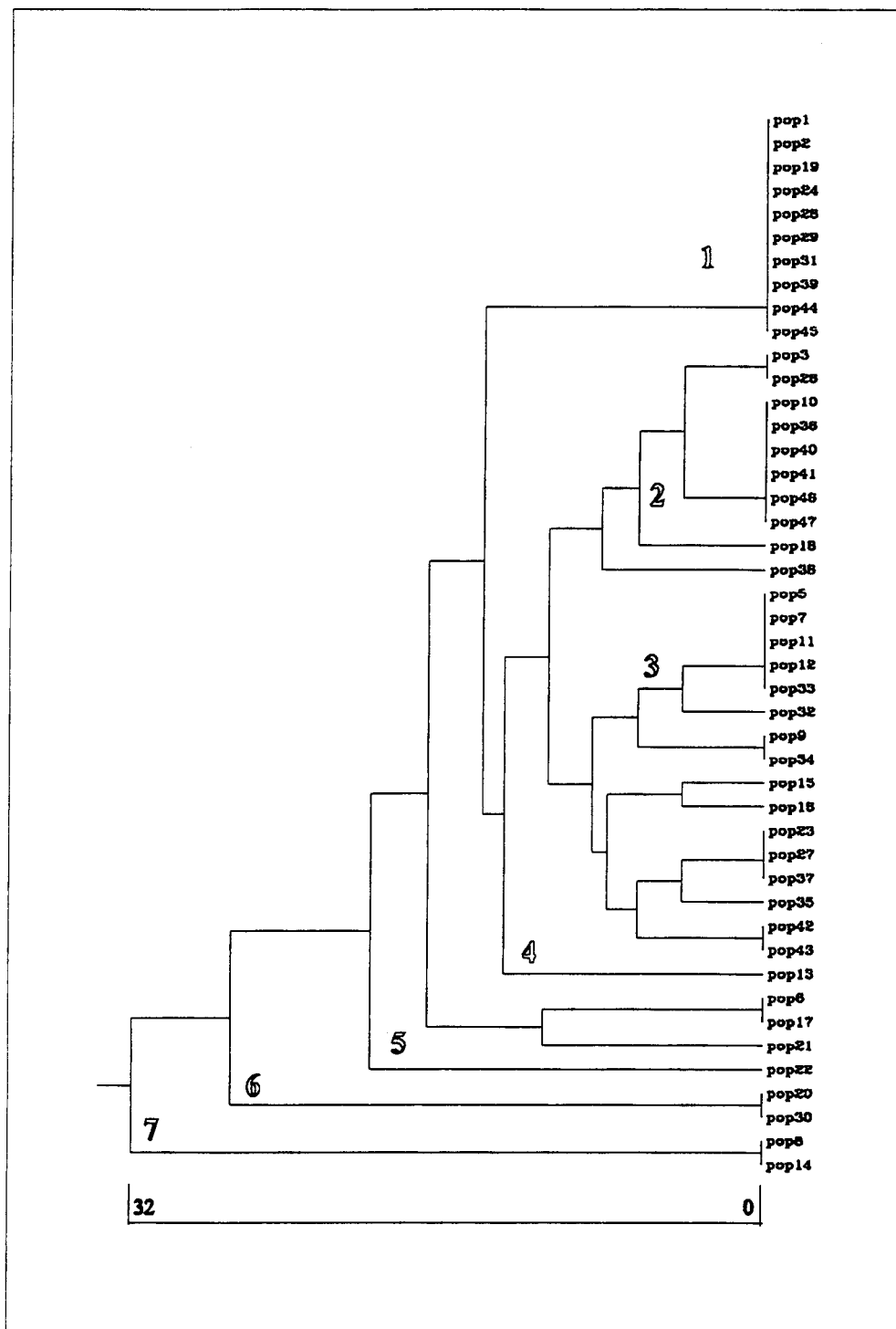
Contudo, ao se analisar a relação entre os sítios de origem das linhagens e sua distribuição no dendrograma, o mesmo quadro de identidade entre as linhagens de origem respiratória e isoladas de sítios que demonstram o poder invasivo das mesmas, foi claramente identificado. Nos ramos 1 (entre as linhagens 1, 2, 19, 24, 28,29, 31, 39, 44 e 45), 2 (linhagens 10, 38, 40, 41, 46 e 47) e 3 (linhagens 23, 27, 37, 35, 42 e 43), tal quadro de identidade entre linhagens de diferentes sítios fica evidente sugerindo potencial patogênico das linhagens isoladas do trato respiratório, devido à proximidade das linhagens invasivas.



**Figura 17** - Gel de agarose (1,5%) mostrando o perfil eletroforético de ERIC-PCR gerado mediante amplificação com oligonucleotídeos específicos das linhagens de *Haemophilus influenzae*: 1-1kb DNA Ladder , Life Technologies; 2-linhagens pertencentes ao Grupo I ; 3 – Grupo II; 4-Grupo III; 5-Grupo IV; 6-Grupo V; 7-Grupo VI; 8-Grupo VII; 9-Grupo VIII; 10-Grupo IX ; 11-Grupo X; 12-linhagem 13; 13-15; 14-16; 15-18; 16-21; 17-31; 18-32; 19-22; 20-35; 21-38. São pertencentes ao grupos: Grupo I – linhagens 6 e 17; Grupo II – 8 e 14; Grupo III – 20 e 30; Grupo IV – 23, 27 e 37; Grupo V – 10, 36, 40, 41, 46 e 47; Grupo VI – 42 e 43; Grupo VII – 1, 2, 19, 24, 28, 29, 31, 39, 44, 45; Grupo VIII – 5, 7, 11, 12, 33; Grupo IX: 9 e 34; Grupo X: 3 e 26.

**Figura 18 - Zimograma ERIC-PCR das linhagens de *Haemophilus influenzae***





**Figura 19** - Dendrograma do Grau de Dissimilaridade de ERIC-PCR das Linhagens *Haemophilus influenzae* - Método de UPGMA mod. Neighbor, 1978 - programa Popgen 32.

Tabela XI – Distribuição das linhagens de *Haemophilus influenzae* no ERIC-PCR e Características Biológicas

Pop	Origem	Biotipo	Sorotipo	Plasmídios	Genes Detectados <i>licl</i>	<i>hmr</i>	HeL	Hep-	Adesão KB	Epit.	Vero
01	FC	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
02	FC	I	NT	1	-	-	A	B	-	B	-
19	IF	IV	NT	3	-	-	-	A	A	B	-
24	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
28	OC	I	NT	3	-	-	B	A	A	B	-
29	SP	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
31	SN	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
39	LCR	IV	NT	-	-	-	-	A	A	-	-
44	LP	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	C
45	HM	V	b	-	-	-	-	-	A	B	-
03	FC	VIII	NT	-	-	+	-	A	B	B	-
26	OC	I	NT	-	-	-	B	B	A	B	-
10	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	B	-
36	PN	I	NT	-	+	-	-	-	A	B	-
40	LCR	I	NT	-	-	+	-	-	-	B	C
41	LCR	I	NT	-	-	-	B	A	A	-	-
46	HM	I	b	-	-	-	-	-	A	B	-
47	HM	IV	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
18	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
38	PN	I	a	-	+	-	-	-	A	-	A
05	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
07	FC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-
11	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
12	FC	IV	NT	-	-	+	-	-	A	-	-
33	LB	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
32	LB	I	NT	-	+	+	-	-	A	-	-
09	FC	IV	NT	-	-	-	B	A	A	B	C
34	LB	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	A
15	FC	VI	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
16	FC	IV	NT	4	-	-	-	-	A	B	-
23	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
27	OC	IV	NT	-	-	+	B	-	A	B	-
37	PN	I	NT	-	+	+	B	A	A	B	-
35	ES	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
42	LCR	I	b	2	-	-	-	-	A	B	C
43	LCR	IV	b	7	-	-	-	A	A	B	-
13	FC	I	NT	2	+	+	B	-	A	B	-
06	FC	IV	NT	-	-	+	-	A	A	B	-
17	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-
21	AM	III	NT	5	-	-	-	A	A	-	-
22	AM	I	NT	7	-	-	-	A	A	B	A
20	IF	VI	NT	-	-	-	B	-	A	-	-
30	LP	VI	NT	-	-	-	B	-	B	-	-
08	FC	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-
14	FC	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-

Abreviações: FC = fibrose cística; IF = infecção de faringe; IB = infecção brônquica; AM = amigdalite; BAL = lavado brônquio-alveolar; OC = secreção ocular; SP = sinusite; LS = líquido sinovial; SN = sinusite; LB = lavado brônquico; ES = escarro; PN = pneumonia; LCR = líquido céfalo-raquidiano (meningite); LP = líquido pleural, HM – hemocultura. Tipos de adesão : A - células bacterianas arranjadas em grumos distribuídos de maneira difusa; B - células bacterianas distribuídas de maneira difusa; C - células bacterianas distribuídas de maneira localizada.

Tabela XII – Linhagens de *Haemophilus influenzae* e Características Biológicas Gerais

Linh.	Ori	Bio.	Sor.	PCR		Plasm	Adesão					Resistência Antibióticos
				licl	hmv		HeLa	Hep-2	KB	Epit.	Vero	
01	FC	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km
02	FC	I	NT	-	-	1	B	B	-	B	-	Amp, NA, Sm, Km
03	FC	VIII	NT	-	+	-	-	A	B	B	-	Amp, NA, Sm, Km
05	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm
06	FC	IV	NT	-	+	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm
07	FC	IV	NT	-	+	-	B	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Tc
08	FC	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Cm
09	FC	IV	NT	-	-	-	B	A	A	B	C	Amp, NA, Sm
10	FC	IV	NT	-	+	-	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm
11	FC	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, Sm, Km, Neo
12	FC	IV	NT	-	+	-	-	-	A	-	-	Amp, NA, Sm, Km
13	FC	I	NT	+	+	2	B	-	A	B	-	Amp, NA
14	FC	I	NT	-	-	2	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
15	FC	VI	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Nov
16	FC	IV	NT	-	-	4	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Tc, C
17	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Km
18	FC	VIII	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Tc, C
19	IF	IV	NT	-	-	3	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km
20	IB	VI	NT	-	-	-	B	-	A	-	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
21	AM	III	NT	-	-	5	-	A	A	-	-	Amp, NA, Sm, Km
22	AM	I	NT	-	-	7	-	A	A	B	A	Amp, NA, Sm, Km, Neo,
23	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
24	BAL	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
26	OC	I	NT	-	-	-	B	B	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Cm
27	OC	IV	NT	-	+	-	B	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
28	OC	I	NT	-	-	3	B	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Nov
29	SP	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Nov
30	LS	VI	NT	-	-	-	B	-	B	-	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
31	SN	I	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, Sm, Km, Neo, Nov
32	LB	I	NT	+	+	-	-	-	A	-	-	Amp, Km, Nov, Sm
33	LB	IV	NT	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
34	LB	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	A	Amp, NA, Sm, Km, Nov
35	ES	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	NA, Sm, Km, Neo, Nov
36	PN	I	NT	+	-	-	-	-	A	B	-	NA, Sm
37	PN	I	NT	+	+	-	B	A	A	B	-	NA, Sm, Km, Tc, Cm
38	PN	I	a	+	-	-	-	-	A	-	A	Amp, NA, Sm, Km, Neo
39	LCR	IV	NT	-	-	-	-	A	A	-	-	Amp, NA, Sm, Km, Cm
40	LCR	I	NT	-	+	-	-	-	-	B	C	Amp, NA, Sm, Km
41	LCR	I	NT	-	-	-	B	A	A	-	-	Amp, NA, Sm, Km, Nov
42	LCR	I	b	-	-	2	-	-	A	B	C	Amp, NA, Sm, Km
43	LCR	IV	b	-	-	7	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Cm
44	LP	I	NT	-	-	-	-	A	A	B	C	Amp, NA, Sm, Km, Neo,
45	HM	V	b	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm
46	HM	I	b	-	-	-	-	-	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Neo
47	HM	IV	NT	-	-	-	-	A	A	B	-	Amp, NA, Sm, Km, Nov

Abreviações: FC = fibrose cística; IF = infecção de faringe; IB = infecção brônquica; AM = amigdalite; BAL = lavado brônquio-alveolar; OC = secreção ocular; SP = sinusite; LS = líquido sinovial; SN = sinusite; LB = lavado brônquico; ES = escarro; PN = pneumonia; LCR = líquido céfalo-raquidiano (meningite); LP = líquido pleural; HM – hemocultura. Tipos de adesão : A - células bacterianas arranjadas em grumos distribuídos de maneira difusa; B – células bacterianas distribuídas de maneira difusa; C – células bacterianas distribuídas de maneira localizada.

## **DISCUSSÃO**

As 45 linhagens de *Haemophilus influenzae* isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – FCM, foram discriminadas quanto à sua origem e patologia. Verificou-se que a maioria das linhagens foram isoladas a partir de sítios do trato respiratório, sendo associadas a patologias como fibrose cística, infecção de faringe, infecção brônquica, amigdalite, sinusitopatias, pneumonia, ou ainda, isoladas a partir de líquidos e secreções provenientes desta mesma região corpórea, tais como: escarro, lavado brônquio-alveolar, lavado brônquico e líquido pleural. Entretanto, também foram isoladas linhagens de outras fontes como: de secreção ocular associada a casos de conjuntivite, de líquido sinovial, do sangue e do líquido céfalo-raquidiano estando associadas a casos de meningites.

Ao se determinar os biotipos das linhagens estudadas, verificou-se a incidência predominante de linhagens pertencentes ao biotipo I (51%), seguidas das pertencentes ao biotipo IV(31%), biotipos VI e VIII (7%) e biotipos III e V (2%) (figura 1). Não foram encontradas linhagens pertencentes aos biotipos II, VII e *aegyptius*. Como mencionado por Foxwell et al. (1998) e Saito et al. (1999) as linhagens de *H. influenzae* são geralmente pertencentes aos biotipos I, II, III ou IV.

Neste estudo, não houve uma predominância de linhagens sorotipo b, como demonstrado em estudos epidemiológicos de Moore et al. (1999), Saito et al. (1999) e Mitsuda et al. (1999), já que em sua maioria, não eram linhagens invasivas e sim isoladas de casos de fibrose cística e outras partes do trato respiratório.

Contudo, verificou-se que uma linhagem do sorotipo b era pertencente ao biotipo V (linhagem 45). Este dado é contrário ao observado por Kilian (1976), o qual afirma que as linhagens invasivas do sorotipo b são pertencentes aos biotipo I, II ou III.

Usualmente, o *H. influenzae* tipo b é descrito como sendo o maior causador de casos de meningites em crianças de até 5 anos (Moxon et al., 1984; Kroll et al., 1988; Saito et al., 1999; Moor et al., 1999). Neste estudo, porém, verificou-se a presença de linhagens NTHi associadas a quadros de meningites (linhagens 39, 40 e 41) e septicemia (linhagem 47).

Diferentemente do trabalho epidemiológico de Saito et al. (1999), não foram detectadas linhagens pertencentes aos sorotipos c, d, e, f, neste estudo.

Quanto à análise realizada com o uso de oligonucleotídeos específicos a cada sorotipo (Falla et al. 1994), verificou-se que esta é uma ferramenta a qual pode substituir a análise realizada através da sonda *pUO38* descrita por Kroll et al. (1989), e também a soroaglutinação em lâmina por antissoros tipo específico de uso corrente nos laboratórios.

Quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos, verificou-se uma resistência predominante ao ácido nalidíxico e à estreptomicina (96%), seguidos de resistência frente à ampicilina e canamicina (93% e 82%, respectivamente).

Considerando-se a ampicilina, um antibiótico de importância no tratamento das patologias causadas por *H. influenzae* (Powell et al., 1991; Dimopoulou et al., 1992, Jorgensen 1992; Anderson et al., 1994; Dimopoulou et al., 1997; Leaves et al., 2000), esperava-se encontrar um alto nível de resistência nas linhagens estudadas. Esta hipótese foi confirmada (93% das linhagens resistentes à ampicilina) sendo que, também, estas linhagens de *H. influenzae*, apresentaram um perfil de multiresistência combinado com pelo menos três das oito drogas antimicrobianas analisadas, sendo a maioria multiresistente a quatro (22%) ou cinco (24%) das drogas testadas.

Além disso, a presença de plasmídios detectado em 10 das linhagens de *H. influenzae*, pode estar relacionada a este perfil de resistência. A aquisição e/ou transmissão para outras linhagens através de processos de recombinação genética podendo ser preponderante no estabelecimento do aparecimento de resistência a antimicrobianos. A presença de plasmídios portadores de múltiplos genes para resistência a antimicrobianos nesta espécie bacteriana, já foi estabelecida e possuem tamanhos compreendidos entre 10kb e 30MDa (Leaves et al., 2000).

No presente estudo, verificou-se a presença de plasmídios com tamanhos compreendendo entre 1,58 e 48,6MDa. Portanto, há a possibilidade de que alguma(s) dessa(s) estrutura(s) plasmidial(ais) identificada(s), possa(m) estar(em) envolvida(s) no processo de resistência aos antibióticos estudados, sobretudo naquelas linhagens que apresentaram plasmídios de alto peso molecular

Além disso, outra característica de grande importância biológica em bactérias patogênicas é que as mesmas possuem a capacidade de aderir em células do hospedeiro, capacidade esta que pode possuir paralelo com a capacidade de adesão em células cultivadas *in vitro*.

Neste estudo, verificou-se a capacidade de adesão das diferentes linhagens em células HeLa (carcinoma uterino), HEp-2 (carcinoma laríngeo), KB (carcinoma do epitélio bucal), Vero (carcinoma renal de macaco verde africano) e células do epitélio bucal, sendo que três destes tipos celulares (HEp-2, KB e de epitélio bucal), são provenientes de regiões do hospedeiro das quais o *H. influenzae* pode ser isolado (St. Geme et al., 1996). Verificou-se uma adesão preferencial de uma grande parte das linhagens estudadas às células de epitélio bucal (82% das linhagens estudadas) e KB (96%), por consistirem de

células originalmente provenientes de sítios de entrada do microrganismo no corpo do hospedeiro, como a região oral e a mucosa do aparelho respiratório superior.

Células cuja origem não faz parte dos locais habitualmente colonizados por *H. influenzae* como é caso das células HeLa e Vero, apresentaram uma baixa adesão por este tipo bacteriano (22% em células HeLa e 16% em células Vero). Algumas espécies bacterianas, como *Escherichia coli*, apresentam padrões de adesão em linhagens celulares cultivadas *in vitro* (Scaletsky et al. 1984). Nestas linhagens, observaram-se tipos de adesão os quais foram agrupados em padrões descritos como sendo: padrão A, bactérias aderidas difusamente em grumos sobre a monocamada celular; padrão B, bactérias aderidas difusamente e isoladamente sobre a monocamada celular e o padrão C, adesão localizada sobre a monocamada celular. Tais tipos de adesão ainda não haviam sido descritos na literatura e sugere a possível existência de fatores de colonização presentes nesta bactéria.

Além disso, foram realizados experimentos buscando averiguar relações entre propriedades de adesão e a presença de genes fimbriais (*hmw* e *hif*) e responsáveis por certos mecanismos de patogenicidade (*lic1*). Como se tratavam em sua maioria de linhagens NTHi, foi dada ênfase no gene fimbrial *hmw* (St. Geme et al., 1993), já que o gene *hifA*, que também foi testado, não foi encontrado em nenhuma linhagem (Geluk et al., 1998).

A amplificação, por PCR, dos genes *hmw* e *lic1*, apresentaram fragmentos específicos de 569pb e 829 pb, respectivamente; sendo a frequência deles de 24% e 11% no total de linhagens analisadas.

Procurando elucidar as características biológicas e sua relação com a patogenicidade do *H. influenzae*, estudos de filogenia foram realizados, buscando o

entendimento dos mecanismos de patogenicidade e da epidemiologia deste microrganismo. Sendo assim, para os estudos de filogenia destas linhagens foram realizadas as seguintes metodologias de análise filogenética, todas voltadas à análise molecular: PCR-ribotipagem com a amplificação do 16S *rDNA* com o uso de oligonucleotídeos específicos desta espécie bacteriana (tabela II); ribotipagem com a sonda 16S *rDNA* específica de *H. influenzae* obtida a partir da amplificação por PCR deste fragmento; ribotipagem com a sonda *pRR64*, sonda não específica de *H. influenzae*, derivada de *Streptomyces violaceoruber*; e finalmente, análise de seqüências intergênicas repetidas – ERIC, através da simples amplificação destas seqüências, a partir de oligonucleotídeos específicos descritos por Versalovic et al. (1991).

Como descrito nos resultados, o primeiro experimento realizado através da análise de restrição da região do 16S *rDNA*, método conhecido como PCR-ribotipagem, demonstrou que as linhagens apresentaram pouca, ou nenhuma variabilidade genética. Conseqüentemente, verificou-se que tal metodologia não foi capaz de discriminar as linhagens estudadas não mostrando relações entre as características filogenéticas obtidas pelo método e as características biológicas analisadas. Tal resultado vem reforçar os obtidos por Mitsuda et al. (1999), que verificaram a ineficiência da técnica de PCR-ribotipagem para *H. influenzae*.

Contudo, ao confrontar-se a distribuição das linhagens ao longo do dendrograma com a origem das mesmas, verificou-se certa identidade entre linhagens de diferentes sítios de isolamento. Tais linhagens, sendo muitas isoladas de pacientes com fibrose cística, apresentam identidade com linhagens provenientes de outros sítios e

causadoras de outras patologias mais graves, tais como meningites, amigdalites e pneumonias.

Buscando melhorar a discriminação entre as linhagens, e também comparar os resultados obtidos através de ribotipagem com o uso de sondas distintas, a ribotipagem utilizou-se como sonda o fragmento 16S *rDNA* obtido por amplificação a partir de uma linhagem do estudo. Verificou-se que tal metodologia, ainda não descrita na literatura, além de discriminar melhor as linhagens, conseguiu relacionar as características filogenéticas das linhagens com algumas de suas características biológicas. Foi possível uma discriminação das linhagens pertencentes ao biotipo I, ou pertencente a um biotipo similar, cuja diferença se baseia na produção de indol, com o biotipo IV. Verificou-se que a maioria das linhagens apresentando os biotipos I/IV sofreram uma discriminação das demais.

À semelhança do quadro apresentado pela técnica de PCR-Ribotipagem, esta metodologia também foi capaz de mostrar similaridade genética entre linhagens provenientes de diferentes sítios de isolamento. Este fato sugere que linhagens consideradas oportunistas, sobretudo as isoladas de pacientes com fibrose cística, podem ser patogênicas.

A utilização da sonda *pRR64*, permitiu discriminar as linhagens pertencentes aos biotipos I e IV das demais linhagens deste estudo. Nos ramos de 2 a 8, 92% das linhagens são pertencentes a tais biotipos. Contudo, tal método demonstrou uma falta de identidade entre as linhagens, sendo que não houve linhagem que apresentasse o mesmo perfil eletroforético, verificou-se com isso um alto grau de diferenciação entre as linhagens, quando a sonda *pRR64* é utilizada na análise clonal de *H. influenzae*.

Assim, os resultados obtidos através da ribotipagem com a sonda *pRR64*, demonstraram concordância com aqueles observados através da ribotipagem, onde, mais uma vez ocorreu a discriminação das linhagens pertencentes aos biotipos I e IV. Nesta metodologia, as linhagens puderam ser subdivididas em grupos de igualdade e similaridade, o que não foi possível com a utilização da ribotipagem com a sonda *pRR64* onde não houve perfil eletroforético igual entre as linhagens.

Desta maneira, com a utilização das três diferentes técnicas de ribotipagem envolvendo como gene marcador a região 16S *rDNA*, não se pôde estabelecer correlações entre a distribuição clonal das linhagens e as características de sorotipo, presença de plasmídeo, adesão às células cultivadas *in vitro*, e presença dos genes *hmw* e *lic1*.

Finalmente, o último procedimento de análise filogenética, o ERIC-PCR, demonstrou a formação de 25 diferentes fragmentos. À semelhança com o que foi realizado com os dados de ribotipagem, os demais dados biológicos das linhagens e sua distribuição no dendrograma de ERIC-PCR (figura 19). No ramo 1, 2, 3 e 4 ocorreu um alto índice de linhagens pertencentes ao biotipo I ou IV, com exceção das linhagens 03, 18, 15 e 45 (pertencentes aos sorotipos VIII, VIII, VI e V, respectivamente), as demais linhagens contidas nesse ramo, demonstraram pertencer aos biotipos acima citados. Houve entre algumas destas linhagens, semelhanças entre o biotipos, além da identidade encontrada através do perfil de ERIC-PCR.

Há discriminação das linhagens através do biótipo, e também de outras características biológicas, como presença de plasmídios e dos genes *hmw* e *lic1*, das linhagens contidas nos ramos 1, 2, 3 e 4. Verificou-se que além de estarem presentes todas as linhagens possuidoras de alguma estrutura plasmidial nestes ramos, também se

encontraram aquelas que apresentaram o gene *lic1* ou *hmv*, detectados por PCR. Isso mostra a diferenciação destas linhagens, pertencentes aos biotipos I/IV, quanto às suas características biológicas e de patogenicidade, o que não foi descrito na literatura e nem com as demais metodologias deste estudo.

Verificou-se pelo ERIC-PCR, que há entre as linhagens isoladas de sítios do sistema respiratório a mesma identidade com algumas linhagens sabidamente patogênicas, à semelhança dos quadros demonstrados pelas técnicas de ribotipagem. Tal identidade pode ser visto entre as linhagens 23, 7, 37 e as linhagens 42 e 43.

Sendo assim, verificou-se uma discriminação das linhagens pertencentes aos biotipos I e IV como descrito anteriormente por Kilian (1976) para *Haemophilus influenzae*. Esta discriminação torna-se evidente neste estudo. Foxweel et al. (1998) cita a separação desse subgrupo bacteriano de NTHi's, pertencentes aos biotipos I e IV, em grupos especiais de taxonomia distinta. Deixando evidente e reforçada a discriminação deste subgrupo de NTHi's dos demais *H. influenzae*.

Comparando-se, ainda, os resultados obtidos pelas ribotipagens e pelo ERIC-PCR, observou-se, claramente, que as linhagens pertencentes aos biotipos I e IV estão sofrendo um processo de discriminação filogenética, como já descrito por alguns autores (Foxwell et al., 1998; Musser et al., 1986; Killian 1976). Algumas destas linhagens as quais são provenientes do trato respiratório possuem identidade genética com linhagens provenientes de outros sítios como por exemplo líquido, sangue ou daqueles em que o microrganismo mostrou-se invasivo. Vê-se, portanto, que as linhagens isoladas do pulmão de pacientes com fibrose cística, amigdalites ou sinusites, podem ser consideradas

potencialmente patogênicas devido à proximidade filogenética existente entre as mesmas e aquelas usualmente consideradas patogênicas.

Entretanto, ao se analisar a ancestralidade das linhagens através de todos os métodos filogenéticos utilizados neste estudo verificou-se que a(s) linhagem(s) filogeneticamente distantes e, conseqüentemente, geradoras genéticas das demais são curiosamente linhagens pertencentes ao biotipo I/IV, sendo, também isoladas de sítios do trato respiratório. Isso mostra que tal espécie bacteriana, além de possuir com seus ancestrais filogenéticos as linhagens pertencentes aos biotipos I/IV, têm seu sítio de colonização inicialmente localizado no ambiente respiratório.

Sendo assim, a análise filogenética das linhagens de *H. influenzae*, deste estudo, nos leva a propor que a classificação em biotipos apresenta melhores resultados do que a classificação através de sorotipos. Tais resultados indicam que a profilaxia das doenças do trato respiratório, sanguíneo ou liquórico, causadas por *H. influenzae* devem levar em consideração todos os biótipos e sorotipos possíveis, visto o potencial patogênico dos mesmo e não apenas o sorotipo b.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos neste estudos levam as seguintes conclusões:

- A maioria das linhagens apresentaram-se como sendo dos biótipos I e IV;
- A maioria das linhagens apresentaram-se como sendo não tipadas, NTHi;
- As diferentes linhagens apresentaram capacidade de adesão em diferentes tipos celulares. Melhores estudos deverão ser realizados para que um possível padrão de adesão seja estabelecido;
- Linhagens normalmente consideradas como não causadoras de meningite foram responsáveis por este tipo de doença;
- Através das diferentes técnicas para o estabelecimento da estrutura clonal, das linhagens em estudo, verificou-se proximidade genética entre linhagens patogênicas e não patogênicas, indicando o potencial patogênico destas últimas;
- A técnica de ERIC – PCR foi capaz de demonstrar proximidade filogenética entre linhagens possuidoras de plasmídios e dos genes *hmw* e *lic1*;
- Entre todas as técnicas utilizadas para a análise da estrutura clonal, o ERIC-PCR foi a mais eficaz, seguida pela ribotipagem com a sonda *pRR64*, ribotipagem com a sonda 16S *rDNA* de *H. influenzae* e a de PCR-Ribotipagem, nesta ordem.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdel-Rahman, E.M., Ismael, N.A and Dixon, D.** 2000. Antibiotic resistance and prevalence of  $\beta$ -lactamase in *Haemophilus influenzae* isolates – a surveillance study of patients with respiratory infection in Saudi Arabia. *Diag. Mic. Infec. Dis* **36**: 203-208.
- Abman, S.H., Ogle, J.W., Harbeck, R.J., Butler-Simon, N., Hammond, K.B. and Accurso, F.J.** 1991. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. *J. Pediatrics* **119** (2): 211-217.
- Anderson , J.R., Smith, M.D., Kibbler, C.C., Holton, J. and Scott, G.M.** 1994. A nasocomial outbreak due to non-encapsulated *Haemophilus influenzae*: analysis of plasmids coding for antibiotic resistance. *J. Hosp. Infect* **27**(1): 17-27.
- Appuhamy, S., Coote, J.G., Low, J.C. and Parton, R.** 1998. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **36**(3):814-817.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Struhl, K., Moore, D.D., Smith, J.<sup>a</sup> & Seidman, J.G.F.** 1988. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, Brooklyn, N.Y.
- Bajanca-Lavado, M.P., Casin, I. and Vaz Pato, M.V.** 1996. Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal. The Multicentre Study Group. *J. Antimicrob. Chemother* **38**(4): 615-625.
- Barenkamp, S.J. and Bodor, F.F.** 1990. Development of serum bactericidal activity following nontypeable *Haemophilus influenzae* acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9** (5): 333-339.

**Barenkamp, S.J. and Leininger, E.** 1992. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **60**(4): 1302-1313.

**Barenkamp, S.J. and St. Geme, W.J.** 1994. Genes encoding High\_Molecular-Weight adhesion proteins of Nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect. Immun.* **62**(8): 3320-3328.

**Barenkamp, S.J. and St. Geme, W.J.** 1996. Identification of a Second Family of High-Molecular-Weight Adhesion Proteins Expressed by Non Typeable *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **19**(6):1215-1223.

**Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction produce for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**:1531-1532.

**Bishai, W.R., Howard, N.S., Winkelstein, J.A and Smith, H.O.** 1994. Characterizations and virulence analysis of catalase mutants of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **62**(11): 4855-4860.

**Casagrande, S.T., Vicente, E.J.m, Landgraf, I.M. and Kobata, AM.M.** 2000. Antimicrobial resistance patterns of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with meningitis in São Paulo, Brazil. *Bras.J. Med. Biol. Res.* **33**: 295-300.

**Dawid, S., Barenkamp, S. J., St. Geme, J.W.** 1999. Variation in expressin of the *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a procariotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1077-1082.

- Deguchi, K., Yokota, N., Koguchi, M., Suzuki, Y., Fukayama, S., Ishihara, R. and Oda, S.** 1993. Antimicrobial activities of sultamicillin against clinical isolates obtained from outpatients. *Jap. J. Antibiot.* **46**(9):781-793.
- Dimopoulou, I.D., Jordens, J.Z., Legakis, N.J. and Crook, D.W.M.** 1997. A molecular analysis of Greek and UK *Haemophilus influenzae* conjugative resistance plasmids. *J. Antimicrob. Chemoth.* **39**: 303-307.
- Dimopoulou, I.D., Kraak, W.A., Anderson, E.C., Nichols, W.W., Slack M.P. and Crook, D.W.** 1992. Molecular epidemiology of unrelated clusters of multiresistant strains of *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis* **165**(6): 1069-1075.
- Ely, S., Tippet, J. and Moxon, E.R.** 1989. Identification and characterization of a serotype d-specific segment of the *Haemophilus influenzae* genome. *Infect. Immun.* **57**(9): 2926-2928.
- Esposito, D. and Scozza, J. J.** 1994. Identification of na HP1 phage protein required for site-specific excision. *Mol. Microbiol.* **13**(4): 685-695.
- Falla, T.J., D.W. M. Crook, L.N. Brophy, D. Maskell, J. S. Kroll, and E. R. Moxon.** 1994. PCR capsular Typing of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2382-2386.
- Fantinatti, F.; Silveira, W. D. and Pestana de Castro, A. F.** (1994). Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemias *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* **41**:75-86.

- Forsgren, J., Samuelson, A, Ahlin, A, Jonasson, J., Rynnel-Dagöo and Lindberg, A .** 1994. *Haemophilus influenzae* resides and multiples intracellularly in human Adenoid tissue as demonstrated by *in situ* hibridization and bacterial viability assay. *Infect. Immun.* **62**: 673-679.
- Foxwell, A R., Kyd, J.M. and Cripps, A W.** 1998. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and Prevention. *Mol. Biol. Rev.* **62**: 294-308.
- Gazagne, L., Delmas, C., Bingen, E. and Dabernat, H.** 1998. Molecular epidemiology of Ampicilin-resitant Non- $\beta$ -Lactamase- Producing *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **36** (12): 3629-3635.
- Geluk, F., Eijk, P.P., Marieke van Ham, S., Jansen, H.M. and van Alphen , L.** 1998. The fimbria gene cluster of nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **66**(2): 406-417.
- Gray-Owen, S.D., Loosmire, S. and Schryvers, AB.** 1995. Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**(4): 1201-1210.
- Gomez-De-Leon, P., Santos, J.I., Caballero, J., Gomez, D., Espinosa, L.E., Moreno, I., Piñero, D., and Cravioto, A .** 2000. Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from mexican children determined by using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2504-2511.
- Gonin, P., Lorange, M. and Delage, G.** 2000. Performance of a multiplex PCR for the determination of *Haemophilus influenzae* capsular types in the clinical microbiology laboratory. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **37**: 1-4.

- Hashira, S., Tajima, T., Meguro, H., Abe, T. and Fujii, R.** 1990. Clinical and pharmacokinetic studies on aztreonam in neonates. *Jap. J. Antibiot.* **43** (3): 396-404.
- Hauser, M.A and Scocca, J.J.** 1992. Site-specific integration of the *Haemophilus influenzae* bacteriophage HP1: Identification of the points of recombinational exchange and limits of the host attachment site. *J. Biol. Chemistry* **267**(10): 6859-6864.
- Hendolin, P.H., Markkanen, A, Ylikoski, J. and Wahlfors.** 1997. Use of Multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusion. *J.Clin. Microbiol.* **35**: 2854-2858.
- Hoiseth, S.K., Moxon, E.R. and Silver, R.P.** 1986. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are part of a 18-kilobase tandem duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1106-1110.
- Holland, J., Parsons, T.R., Hasan, AA, Cook, S.M., Stevenson, P., Griffiths E. and Williams P.** 1996. Conservations and antigenic cross-reactivity of the transferrin-binding proteins of *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Neisseria meningitidis*. *Microbiol.* **142**: 3505-3513.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T.** 1994. Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods, p.175-290. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hoshing, S.L., Craig, J.E. and High, N.J.** 1999. Phase variation of *lic1A*, *lic2A* and *lic3A*, in colonization of nasopharynx, bloodstream and cerebrospinal fluid by *Haemophilus influenzae* type b. *Microbiol.* **145**: 3005-3011.

- Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St. Geme, J.W. and Normark, S.** 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* **73** (5): 887-901.
- Iwai, N., Nakamura, H., Taneda, Y., Maki, T., Ozaki, T., Matsui, S, Tauchi, N. and Ichinawa, T.** 1990. Pharmacokinetic, bacteriological and clinical studies on aztreonam in neonates. *Jap. Journal of Antibiotics* **43**(3): 455-478.
- Jarosik, G.P., Sanders, J.D., Cope, L.D., Muller-Eberhard, U. and Hansen, E.J.** 1994. A functional *tonB* gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **62**(6):2470-2477.
- Jorgensen, J.H.** 1992. Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin. Infect. Dis.* **14**(5): 1119-1123.
- Kauc, L., Skowronek, K. and Goodgal, S.H.** 1991. The identification of the bacteriophage HP1c1 and S2 integratation sites in *Haemophilus influenzae* Rd by field-inversion gel electrophoresis of large DNA fragments. *Acta Micob. Polonia* **40** (1-2): 11-26.
- Kilian, M.** 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 9-62.
- Kroll, J.S., Ely, S. and Moxon, E. R.** 1991. Capsular typing of *Haemophilus influenzae* with a DNA probe. *Mol. Cell. Probes* **5**: 375-379

- Kroll, J.S., Hopkins, I. and Moxon, E.R.** 1988. Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. *Cell* **53**: 347-356.
- Kroll, J.S., Langford, P.R. and Loynds, B.M.** 1991. Copper-zinc Superoxide Dismutase of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Bacteriol.* **173**(23): 7449-7457.
- Kroll, J.S., Zamze, S., Loynds, B. and Moxon, E. R.** 1989. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol* **171** (6): 3343-3347.
- Leaves, N.I., Dimopoulou, I., Hayes, I., Kerridge, S., Falla, T., Secka, O., Adegbola, R.A, Slack, M.P.E., Peto, T.E.A and Crook D.W.M.** 2000. Epidemiological of large resistance plasmids in *Haemophilus*. *J. Antimic. Chemoth.* **45**: 599-604.
- Leaves, N.I., Sisson, P.R., Freeman,R., Jardens, J.Z.** 1997. Pyrolysis mass spectrometry in epidemiological and population genetic studies of *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.* **46**(3): 204-207.
- Lee, J.J., Smith, H.O, and Redfield, R.** 1989. Organization of the *Haemophilus influenzae* Rd Genome. *J. Bacteriol.* **171**(6): 3016-3024.
- Loos, B.G., Bernstein, J.M., Dryja, D.M., Murphy, T.F. and Dickinson, D.** 1989. Determination of epidemiology and transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae* in children with otitis media by comparison of total genomic DNA restriction fingerprints. *Infect. Immun.* **57**(9): 2751-2757.

- Mc Crea, K.W., Watson, W.J., Gilsdorf, J.R. and Marrs, C.F. 1994. Identification of *hifD* and *hifE* in the pilus gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b strain Eagan. *Infect. Immun.* **62**(11): 4922-4928.
- Mendonça, S., Seixas, C.S., Nogueira, P.A, Fantinatti, F., Oliveira, U.M. and Silveira, W.D. 1996. Pathogenicity characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Braz. J. Genetics* **19**(1): 9-16.
- Mhlanga-Mutangadura, T., Morlin, G., Smith, A.L., Eisenstark, A and Golomb, M. 1998. Evolution of the major pilus gene cluster of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **180**(17): 4693-4703.
- Mitsuda, T., Kuroki, H., Ishikawa, N., Imagawa, T., Ito, S., Miyamae, T., Mori, M., Uehara, S. and Yokota, S. 1999. Molecular Epidemiological Study of *Haemophilus influenzae* serotype b strains obtained from children with meningitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **37** (8): 2548-2552.
- Möller, L.V.M., Grasselie, H., Dankert, J. and van Alphen, L. 1996. Variation in metabolic enzyme activity of persistent *Haemophilus influenzae* in respiratory tracts of patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **34** (8): 1926-1929.
- Moor, P.E., Collignon, P.C., Gilbert, G.L. 1999. Pulsed-field gel electrophoresis used to investigate genetic diversity of *Haemophilus influenzae* type b isolates in Australia shows differences between Aboriginal na Non-aboriginal isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**(5): 1524-1531.

- Moxon, E.R., Deich, R.A and Connelly, C.** 1984. Cloning of chromosomal DNA of *Haemophilus influenzae*. Its use for studying the expression of type b capsule and virulence. *J. Clin. Invest.* **73**: 298-306.
- Moxon, E.R. and Vaughn, K.A** 1981. The type b capsular polysaccharide as a virulence determinant of *Haemophilus influenzae*: studies using clinical isolates and laboratory transformants. *J. Infect. Dis.* **143**: 517-524.
- Mühlemann, K., Balz, M., Aebi, S. and Schopper, K.** 1996. Molecular characteristics of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease during the period of vaccination in Switzerland: Analysis of strains isolated between 1986 and 1993. *J. Clin. Microbiol.* **34**(3): 560-563.
- Musser, J.M., Barenkamp, S.J., Granoff, D.M. and Selander, R.K.** 1985. Genetic Relationships of Serologically Nontypeable and Serotype b Strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **52**(1): 183-191.
- Quentin, R.; Goudeau, A.; Wallace, R. J.; Smith, A. L.; Selander, R. K. and Musser, J. M.** (1990). Urogenital, maternal and neonatal isolates of *Haemophilus influenzae*: identification of unusually virulent serologically non-typeable clone families and evidence for a new *Haemophilus* species. *J. Genet. Microbiol.* **136**: 1203-1209.
- Reich, K.A, Chovan, L. and Hessler, P.** 1999. Genome Scanning in *Haemophilus influenzae* for identification of essential genes. *J. Bacteriol.* **181**(16): 4961-4968.
- Saito, M., Umeda, A and Yoshida, S.** 1999. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **37**(7): 2142-2147.

- Sanders, J.D., Cope, L.D. and Hansen, E.J.** 1994. Identification of a Locus Involved in the Utilization of Iron by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **62**(10): 4515-4525.
- Salyers, A.A. & Whitt, D.D.** 1994. *Haemophilus influenzae*, p. 42-43,91,120. Bacterial Pathogenesis - A Molecular Approach, 1st edition. American Society for Microbiology, Washington,DC.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Scalettsky, I.A.C, Silva, M.L.M and Trabulsi, L.R.** 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **45**: 534-536.
- Silveira, W.D., Fantinatti, F. and Pestana de Castro, A.F.** 1994. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in avian colispticaemic *Escherichia coli* strains. *Bras. J. Genet.* **17**:9-14.
- St Geme, J.W., Falkow, S. and Barenkamp, S.J.** 1993. High-Molecular-Weight of Nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2875-2879.
- St.Geme, J.W, 3rd and Cutter, D.** 1995. Evidence that surface fibrils expressed by *Haemophilus influenzae* type b promote attachment to human epithelial cells. *Mol.Microbiol.* **15**(1): 77-85.
- St.Geme, J.W, 3rd and Cutter, D.** 1996. Influence of Pili, Fibrils and Capsule on *in vitro* Adherence by *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **21**(1): 21-31.

- Tremblay, L.D., L'Ecuyer, J., Provencher, P., Bergeron, M.G. and Canadian Study Group.** 1990. Susceptibility of *Haemophilus influenzae* to antimicrobial agents used in Canada. *Can. Med. Assoc. Journal* **143**(9): 895-899.
- Turk, D.C.** 1982. Clinical importance of *Haemophilus influenzae*, p.3-9. In S.H> Sell and P.F. Wright (ed.), *Haemophilus influenzae: epidemiology, immunology and prevention of disease*. Elsevier/North-Holland Publishing Co., New York.
- Van Elder, J., Brophy, L., Loynds, B., Celis, P., Hancock, I., Carman, S., Kroll, J.S. and Moxon, E.R.** 1995. Region II of the *Haemophilus influenzae* type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. *Mol. Microbiol.* **15** (1): 107-118.
- Van Ham, S.M., van Alphen, L., Mooi, F.R. and van Putten, J.P.M.** 1993. Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell* **73**: 1187-1196.
- Van Ham, S.M., van Alphen, L., Mooi, F.R. and van Putten, J.P.M.** 1994. The fimbrial gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b. *Mol. Microbiol.* **6**: 277-282.
- Van Ham, S.M., van Alphen, L., Mooi, F.R. and van Putten, J.P.M.** 1995. Contribution of the major and minor subunits to fimbria-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells and erythrocytes. *Infec. Immun.* **63**(12): 4883-4889.

- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nuc. Acid Reserch* **19**(24): 6823-6831
- Wallace, R.J., Jr., Musher, D.M., Septimus, E.J., Mc Gowan, J.E., Jr., Quinones, F.J., Wiss, K., Vance, P.H. and Trier, P.A .** 1981. *Haemophilus influenzae* infections in adults: characterization of strains by serotypes, biotypes and  $\beta$ -lactamase productions. *J. Infect. Dis.* **144**: 101-106.
- Watson, W.J., Gilsdorf, J.R., Tucci, M.A., Mc Crea, K.W., Forney, L.J. and Marrs, C.F.** 1994. Identifications of a gene essential for piliation in *Haemophilus influenzae* type b with homology to the pilus assembly platform genes of gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* **62**(2):468-475.
- Webb, D.C. and Cripps, AW.** 1999. Immunization with recombinat transferrin binding protein B enhances clearance of Nontypeable *Haemophilus influenzae* from the rat lung. *Infect. Immun.* **67**(5): 2138-2144.
- Weber, A, Harris, K., Lohrke, S., Forney, L. and Smith, AL.** 1994. Inability to express fimbriae results in impaired ability of *Haemophilus influenzae* type b to colonize the nasopharynx. *Infect. Immun.* **59**: 4724-4728.
- Weiser, J.N., Love, J.M. and Moxon, E.R.** 1989. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell* **59**: 657-665.
- Wong, J.C.Y., Holland, J., Parsons, T., Smith, A and Williams, P.** 1994. Identification and characterization of a iron-regulated hemopexin receptor in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **62**(1): 48-59.

**Zarko-Postawka, M., Hunderuk, M., Mordaski, M. and Zakrzewska-Czerwinska, J.**

1996. Organization and nucleotide sequence analysis of the ribosomal gene set (*rrnB*) from *Streptomyces lividans*. *Gene* **185**: 231-237.