

DOENÇA INVASIVA CAUSADA POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* NÃO TIPO B: RELATO DE OITO CASOS

Invasive non-type b *Haemophilus influenzae* disease: report of eight cases

Mariana Tresoldi das Neves Romaneli^{a,*} , Antonia Teresinha Tresoldi^a ,
Ricardo Mendes Pereira^a , Márcia Teixeira Garcia^a ,
Christian Cruz Hofling^a , Mariângela Ribeiro Resende^a 

RESUMO

Objetivo: Descrever oito casos de doença invasiva por *Haemophilus influenzae* não tipo b em crianças internadas no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

Descrição dos casos: Em 2015, ocorreram oito casos de doença invasiva por *H. influenzae* não tipo b. Nas cepas identificadas, testou-se a sensibilidade à ampicilina e a produção de betalactamase, e realizou-se a genotipagem. A tipagem molecular foi feita por *Pulsed Field Gel Electrophoresis*. Em quatro pacientes, o diagnóstico foi de bacteremia; em dois casos, *H. influenzae* foi identificado em líquido pleural, e dois pacientes tiveram meningite. Comorbidades foram encontradas em 37,5% dos pacientes. Com exceção da cepa de um dos pacientes (que não foi enviada ao laboratório de referência), todas eram sensíveis à ampicilina e não produtoras de betalactamase. A genotipagem identificou quatro cepas não capsulares, uma cepa tipo c e duas cepas tipo a. A tipagem molecular descartou a transmissão intra-hospitalar, já que todos os sorotipos eram distintos quanto ao genótipo.

Comentários: O aumento dos casos de infecção invasiva por *H. influenzae* não tipo b foi real. Não houve transmissão intra-hospitalar e não foi encontrada justificativa para o aumento. Esses dados indicam a necessidade de vigilância para diagnosticar corretamente, monitorar e entender o espectro da doença causada por *H. influenzae* não tipo b.

Palavras-chave: Ampicilina; *Haemophilus influenzae*; Criança.

ABSTRACT

Objective: To describe eight cases of invasive non-type b *Haemophilus influenzae* disease in children admitted to Hospital de Clínicas of Universidade Estadual de Campinas.

Cases description: In 2015, there were eight cases of invasive non-type b *H. influenzae* disease. We tested the ampicillin sensitivity and beta-lactamase production of the strains identified and performed the genotyping. Molecular typing was determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Four patients were diagnosed with bacteremia; in two cases, *H. influenzae* was detected in the pleural fluid, and two patients had meningitis. Patients with comorbidities represented 37.5% of cases. Except for the strain of one patient – not sent to the reference laboratory –, all were ampicillin-sensitive and non-beta-lactamase-producing. Genotyping identified four non-capsular, one type c, and two type a strains. Molecular typing ruled out nosocomial transmission since all serotypes were distinct regarding genotype.

Comments: The rise in cases of invasive non-type b *H. influenzae* infection was real. There was no nosocomial transmission, and we found no justification for the increase. These data indicate the need for surveillance to correctly diagnose, monitor, and understand the spectrum of non-type b *H. influenzae* disease.

Keywords: Ampicillin; *Haemophilus influenzae*; Child.

*Autor correspondente. E-mail: matreneves@yahoo.com.br (M.T.N. Romaneli).

^aUniversidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Recebido em 04 de setembro de 2017; aprovado em 06 de dezembro de 2017; disponível on-line em 20 de dezembro de 2018.

INTRODUÇÃO

O *Haemophilus influenzae* (Hi) é um cocobacilo Gram negativo considerado como constituinte da flora normal do trato respiratório superior dos seres humanos.¹ É classificado de acordo com a presença de um entre seis polissacarídeos capsulares sorologicamente distintos, chamados sorotipos a, b, c, d, e e f, identificados pela aglutinação na presença de soro específico para cada sorotipo.² Já os *Haemophilus influenzae* não encapsulados são conhecidos como não tipáveis (HiNT), porque não podem ser sorotipados por aglutinação convencional com antissor específico.

A incidência de infecções graves por Hi declinou acentuadamente desde a introdução da vacina contra o sorotipo b.³ Embora todos os sorotipos possam causar doença, especialmente em lactentes e crianças, as cepas de HiNT têm sido frequentemente relatadas como causa de doenças invasivas.⁴

O objetivo deste trabalho foi descrever oito casos de doença invasiva por Hi não tipo b ocorridos em 2015 na unidade de internação pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp), São Paulo.

DESCRIÇÃO DOS CASOS

A unidade de internação pediátrica é composta pela enfermaria de Pediatria (48 leitos) e pela Unidade de Terapia Intensiva (UTI) pediátrica (10 leitos), que atendem pacientes clínicos e cirúrgicos, e está inserida no HC-Unicamp, um hospital escola, terciário e geral. A média de internações mensais é de 170 pacientes na enfermaria e de 35 na UTI.

A vigilância epidemiológica identificou uma criança com doença invasiva por Hi em 2013 e, em 2014, foram diagnosticadas outras duas. Entretanto, entre março e agosto de 2015, foram diagnosticados oito casos de doença invasiva por Hi não tipo b em pacientes internados na unidade de internação pediátrica.

As cepas de Hi isoladas dos pacientes foram identificadas no Laboratório de Patologia Clínica do HC-Unicamp e, posteriormente, encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz Central, em São Paulo, onde foi feita a identificação, realizado o antibiograma por disco-difusão, os testes de sensibilidade por concentração inibitória mínima (CIM), pesquisa de betalactamase, pesquisa do tipo capsular, genotipagem por reação de polimerização (PCR) em tempo real e tipagem molecular por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) em seis cepas.

Em três pacientes (casos 2, 3 e 6), o diagnóstico foi de bacteremia sem foco, embora todos estivessem internados na UTI por quadro de bronquiolite viral aguda por mais de 10 dias. Em dois pacientes (casos 1 e 4), a bactéria foi isolada em amostra de líquido pleural presente na admissão. Em uma paciente (caso 5), internada para cirurgia de tumor de adrenal e que apresentava sintomas de infecção respiratória alta, a bactéria foi isolada

na hemocultura no primeiro dia de internação. Dois pacientes (casos 7 e 8) tiveram o diagnóstico de meningite, sendo o caso 7 com menos de 48 horas de internação e o caso 8, após 5 dias da admissão hospitalar (Tabela 1). Os dois pacientes com meningite tinham fator de risco predisponente: um deles com história de trauma de base de crânio (com múltiplas fraturas de órbita) e o outro com diagnóstico de pansinusite relacionada à linfangioma cervical gigante. Comorbidades foram encontradas em 37,5% dos pacientes, sendo asma (caso 1), tumor de adrenal (caso 5) e linfangioma cervical gigante (caso 7). Com exceção do caso 7, que evoluiu ao óbito, todos tiveram evolução favorável.

Todas as crianças haviam sido vacinadas contra Hi tipo b, tendo recebido a quantidade adequada de doses para a faixa etária em que se encontravam, com exceção das duas crianças com 1 mês de vida (casos 3 e 6), que não haviam atingido a idade mínima para receber a vacina. Em relação ao uso prévio de antibióticos, os casos 2, 3, 5, 6 e 8 não tinham história de antibioticoterapia durante o mês que antecedeu a internação, enquanto os casos 1, 4 e 7 tinham recebido, respectivamente, amoxicilina por via oral, penicilina cristalina endovenosa e amoxicilina com clavulanato por gastrostomia.

Passou-se a investigar como um possível surto de ocorrência hospitalar após o aparecimento do quinto caso, por isso a cepa isolada do paciente número 4, recuperada de amostra de líquido pleural, não foi encaminhada para o laboratório de referência. A possibilidade de transmissão intra-hospitalar existia, já que haviam sido notificados quatro casos no mesmo mês, embora eles tenham ocorrido em pacientes internados em áreas físicas distintas (UTI e enfermaria) e com equipes médicas e de enfermagem diferentes.

Para descartar a transmissão intra-hospitalar, o laboratório de referência também realizou a tipagem molecular por PFGE em cepas de seis crianças do surto e em outras cepas de duas crianças internadas em outro hospital da mesma cidade. Observa-se, na Figura 1, que as cepas do tipo a mostraram-se geneticamente correlacionadas por pertencerem ao mesmo tipo capsular, porém não eram idênticas. Já as cepas de HiNT mostraram grande variabilidade genética, não caracterizando a disseminação da bactéria entre os pacientes.

Durante a investigação, o Centro de Vigilância Epidemiológica orientou para uma vigilância ampliada, solicitando o envio de cepas isoladas em outros materiais estéreis, como líquido pleural. Foi realizada a revisão dos processos nas unidades de internação e também no laboratório de microbiologia. Não houve aumento da coleta de hemoculturas, comparando-se com três anos anteriores. Também não houve alteração no processamento das amostras no laboratório, nem no processo automatizado (hemoculturas) ou no processamento dos outros materiais. Da mesma forma, não houve aumento da incidência de doença invasiva por Hi no serviço de neonatologia que, embora esteja localizado

em outro prédio, tem as culturas realizadas no mesmo laboratório. Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (011/2017), homologado em 27 de junho de 2017.

DISCUSSÃO

A transmissão intra-hospitalar de Hi é possível, já que a bactéria coloniza a via aérea superior. Essa colonização em crianças já era conhecida, mas com a introdução da vacina conjugada para o pneumococo, houve um aumento significativo da colonização por HiNT nas crianças vacinadas.⁵⁻⁷ Uma pesquisa de colonização de nasofaringe realizada em Goiânia com 1.192 crianças mostrou que 32,1% delas eram portadoras de Hi na nasofaringe, sendo que 23,3% eram não tipáveis.⁸ Outro estudo descreveu a transmissão intra-hospitalar de cepas de HiNT.⁹ Na presente casuística, essa era uma possibilidade não remota, uma vez que os casos ocorreram em número muito maior que o habitual e em curto espaço de tempo. No entanto, os exames realizados mostraram que as infecções foram causadas por Hi de dois sorotipos diferentes (a e c) e quatro delas por HiNT, e todos eles distintos do ponto de vista genotípico, o que afastou a possibilidade de transmissão intra-hospitalar.

O HiNT, em geral, causa doença de vias aéreas superiores nas crianças, como otites e sinusites.¹⁰ Entretanto, pode causar doenças invasivas, por exemplo, bacteremia, pneumonia

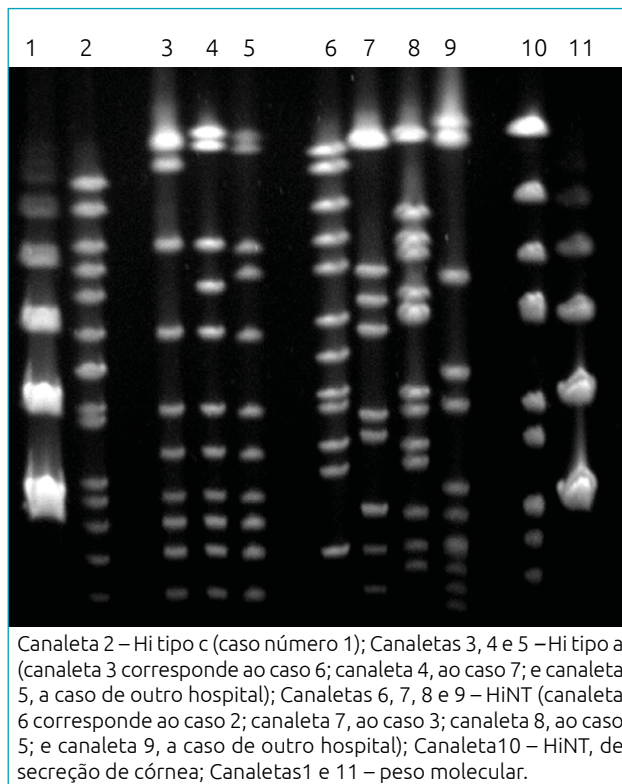


Figura 1 Perfil do DNA genômico de cepas de *H. influenzae* isoladas de seis pacientes obtido por *Pulsed Field Gel Electrophoresis*.

Tabela 1 Informações referentes aos pacientes e às cepas de *H. influenzae* isoladas de cada paciente.

Caso	Data	Idade/comorbidade	Diagnóstico de internação/local de isolamento/local de internação	Sensibilidade à ampicilina-antibiograma/CIM	Betalactamase	Genotipagem
1	11/04	8 anos/asma leve	Pneumonia com derrame pleural/sangue e líquido pleural/UTI	Sensível/1 µg/mL	Negativa	Tipo c
2	03/05	7 m/ausente	BVA em VM/sangue/UTI	Sensível/0,125 µg/mL	Negativa	Não capsular
3	10/05	1 m/ausente	BVA em VM/sangue/UTI	Sensível/0,5 µg/mL	Negativa	Não capsular
4	18/05	5 anos e 7 m/ausente	Pneumonia com derrame pleural/líquido pleural/E	Resistente/NR	NR	NR
5	28/05	1 ano e 9 m/carcinoma adrenal	Virose respiratória e pré-operatório/ sangue/E	Sensível/0,25 µg/mL	Negativa	Não capsular
6	14/07	1 m/ausente	BVA em VM/sangue/UTI	Sensível/0,5 µg/mL	Negativa	Tipo a
7	11/08	4 anos, linfangioma cervical gigante, traqueostomia e gastrostomia	Pansinusite, HIC e vasculite cerebral bilateral/liquor/UTI	Sensível/0,25 µg/mL	Negativa	Tipo a
8	21/08	6 anos/ausente	TCE e múltiplas fraturas de órbita/sangue e liquor/E	Sensível/0,125 µg/mL	Negativa	Não capsular

CIM: concentração inibitória mínima – critérios CLSI do ano vigente: sensível (≤ 1 µg/mL); indeterminado ($= 2$ µg/mL); e resistente (≥ 4 µg/mL); m: meses; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; BVA: bronquiolite viral aguda; VM: ventilação pulmonar mecânica; E: enfermaria; HIC: hipertensão intracraniana; TCE: traumatismo cranioencefálico; NR: não realizado.

e meningite.^{2,11,12} Em relação aos sorotipos encapsulados não tipo b, alguns predominam em localidades geográficas distintas, como o tipo a no norte do Canadá e em Israel,^{11,13,14} enquanto que em outros sistemas de vigilância há predomínio do sorotipo e ou f.^{2,12,15} Infecções causadas pelos sorotipos c e d são raras e há pouca informação sobre elas, sendo escassos os relatos de casos sobre o assunto.¹¹ Sabe-se, contudo, que todos os sorotipos podem causar doença invasiva, como bacteremia, meningite, pneumonia e, mais raramente, artrite séptica.^{2,11,16,17}

Langereis et al. sugerem que esteja havendo um aumento real das doenças invasivas causadas pelo HiNT, relatando uma incidência seis vezes maior nas duas últimas décadas, na Holanda.⁴ Por outro lado, em neonatos, na Inglaterra, a incidência se mantém entre 2,1 e 4,8/100.000 nascidos vivos de 2000 a 2013.¹⁸ Ladhani et al. relatam um aumento lento das infecções invasivas pelos sorotipos e e f.¹⁵ No Brasil, foi detectado um discreto aumento dos encapsulados não tipo b na primeira década após a vacinação para o Hi tipo b.¹⁹ Van Eldere et al. sugerem que o aumento na incidência relatado por diversos autores possa ser uma combinação de fatores, como o reconhecimento do espectro da doença, a mudança na prática clínica (aumento na coleta de hemoculturas) e também o aumento na sensibilidade dos testes laboratoriais com a automação dos equipamentos.²⁰

No Canadá, um estudo epidemiológico realizado de 2004 a 2013 mostra um nítido aumento da incidência de HiNT principalmente nos extremos da vida, em menores de 1 ano e em maiores de 65 anos. Os autores sugerem que HiNT, Hi tipo a e Hi tipo f são patógenos emergentes e devem ser monitorados.²¹ A maior incidência das infecções por HiNT em pacientes portadores de comorbidades identificada na maioria dos referidos estudos pode estar associada à maior sobrevida desses pacientes. Em uma análise dos fatores de risco associados à doença invasiva em crianças, Livorsi et al. concluem que a doença invasiva por HiNT foi associada a maior tempo de internação e maior mortalidade, quando comparado à doença causada por Hi

encapsulados. No mesmo relato, 30,7% dos pacientes tinham comorbidades, sendo prematuridade, asma e imunossupressão as mais frequentes.²² Os casos aqui analisados são de bacteremia, pneumonia e meningite, semelhantes aos descritos na literatura. Entretanto, a elevada incidência de infecções invasivas por HiNT neste serviço nunca havia sido relatada anteriormente e não foi encontrada justificativa para esse aumento. Em relação aos fatores de risco, os pacientes não eram prematuros, tinham pouco tempo de internação e apenas três deles tinham comorbidades, diferenciando esta casuística dos casos encontrados na literatura.

Embora as cepas isoladas nos pacientes aqui relatados tenham se mostrado sensíveis à ampicilina *in vitro*, a resistência é conhecida desde a década de 1970 e, em geral, está em torno de 20-30%.² O principal mecanismo de resistência é a produção de betalactamase mediada por plasmídeos, sendo identificada a enzima TEM1 e, raramente, a ROB-1.²⁰ Cepas que produzem betalactamase são chamadas de betalactamase positivas e ampicilina resistentes (BLPAR), e sua frequência depende da região, chegando a 30% na Europa e nos Estados Unidos.²³⁻²⁵ Algumas cepas de Hi que não expressam betalactamase são resistentes à ampicilina e à amoxicilina por causa de alteração na sua estrutura (PBP3). Estudos recentes mostraram uma taxa de resistência maior de cepas betalactamase negativas e ampicilina resistentes (BLNAR), cuja frequência varia de 3,4 a 31%, mas estas não foram identificadas neste estudo.²³⁻²⁵

Em conclusão, o aumento de casos de infecção invasiva por Hi não tipo b foi real. Isso mostra a necessidade de se manter a vigilância para diagnosticar corretamente as infecções, monitorar e entender o espectro da doença.

Financiamento

O estudo não recebeu financiamento.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Barenkamp SJ. Haemophilus influenzae. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL, editors. Textbook of pediatric infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2009. p. 1734-56.
2. Gilsdorf JR. What pediatrician should know about non-typeable Haemophilus influenzae. J Infect. 2015;71:S10-4.
3. MacNeil JR, Cohn AC, Farley M, Mair R, Baumbach J, Bennett N, et al. Current epidemiology and trends in invasive Haemophilus influenzae disease – United States, 1989-2008. Clin Infect Dis. 2011;53:1230-6.
4. Langereis JD, Jonge MI. Invasive disease caused by nontypeable Haemophilus influenzae. Emerg Infect Dis. 2015;21:1711-8.
5. Kuklinska D, Kilian M. Relative proportions of Haemophilus species in the throat of healthy children and adults. Eur J Clin Microbiol. 1984;3:249-52.
6. Spijkerman J, Prevaes SM, van Gils EJ, Veenhoven RH, Bruin JP, Bogaert D, et al. Long-term effects of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of S. pneumoniae, S. aureus, H. influenzae and M. catarrhalis. PLoS One. 2012;7:e39730.

7. Brandileone MC, Zanella RC, Almeida SC, Brandao AP, Ribeiro AF, Carvalhanas TM, et al. Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among children in São Paulo, Brasil. *Vaccine*. 2016;34:5604-11.
8. De Carvalho CX, Kipnis A, Thörn L, de Andrade JG, Pimenta F, Brandileone MC, et al. Carriage of *Haemophilus influenzae* among Brazilian children attending day care centers in the era of widespread Hib vaccination. *Vaccine*. 2011;29:1438-42.
9. Goetz MB, O'Brien H, Musser JM, Ward JI. Nosocomial transmission of disease caused by nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *Am J Med*. 1994;96:342-7.
10. Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO, Kyd JM, Forsgren A, Campos J, et al. Non typeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:43-8.
11. Bamberger EE, Ben-Shimol S, Abu Raya B, Katz A, Givon-Lavi N, Dagan R, et al. Pediatric Invasive *Haemophilus influenzae* Infections in Israel in the Era of *Haemophilus influenzae* Type b Vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:477-81.
12. Ladhani S, Slack MP, Health PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:455-63.
13. Ulanova M, Tsang RSW. *Haemophilus influenzae* serotype A as a cause of serious invasive infections. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:70-82.
14. Boisvert AA, Moore D. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* type A in children in Canada's north: A priority for prevention. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2015;26:291-2.
15. Ladhani SN, Collins S, Vickers A, Litt DJ, Crawford C, Ramsay ME, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* serotype e and f Disease, England and Wales. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:725-32.
16. Ali RA, Kaplan SL, Rosenfeld SB. Polyarticular septic arthritis caused by *Haemophilus influenzae* serotype f in a 8-month-old immunocompetent infant: a case report and review of the literature. *Case Rep Orthop*. 2015;2015:163812.
17. Pavlik DF, Johnston JJ, Eldredge JD, Dehority W. Non-type b *Haemophilus influenzae* Septic Arthritis in children. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017;6:e134-9.
18. Collins S, Litt DJ, Flynn S, Ramsay ME, Slack MP, Ladhani SN. Neonatal invasive *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales: epidemiology, clinical characteristics and outcome. *Clin Infect Dis*. 2015;60:1786-92.
19. Almeida AE, Filippis I, Abreu AO, Ferreira DG, Geman AL, Marzochi KB. Occurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:777-81.
20. van Eldere J, Slack MP, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognized pathogen. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:1281-92.
21. Desai S, Jamieson FB, Patel SN, Seo CY, Dang V, Fediurek J, et al. The epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* non-serotype B disease in Ontario, Canada from 2014 to 2013. *PLoS One*. 2015;10:e0142179.
22. Livorsi DJ, Macneil JR, Cohn AC, Bareta J, Zansky S, Petit S, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* in the United States, 1999-2008: epidemiology and outcome. *J Infect*. 2012;65:496-504.
23. Resman F, Ristovski M, Forsgren A, Kaijser B, Kronvall G, Medstrand P, et al. Increase of beta-lactam-resistant invasive *Haemophilus influenzae* in Sweden, 1997 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4408-15.
24. Shuel M, Hoang L, Law DK, Tsang R. Invasive *Haemophilus influenzae* in British Columbia: non-Hib and non typeable strains causing disease in children and adults. *Int J Infect Dis*. 2011;14:205-12.
25. Dabernat H, Delmas C. Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001-2008: a retrospective database analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:2745-53.