

Artigo original

Evolução na vigilância laboratorial do *Haemophilus influenzae* nas meningites e pneumonias bacterianas, por PCR em tempo real, no Estado de São Paulo (2010-2019)

Maria Gisele Gonçalves^[1], Fábio Takenori Higa^[1], Lucila Okuyama Fukasawa^[1],
Layla Degaulle Alves Barros^[2], Maristela Marques Salgado^[1]

^[1]Centro de Imunologia | Instituto Adolfo Lutz | Coordenadoria de Controle de Doenças | Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo-SP, Brasil

^[2]Curso de Especialização *Lato Sensu* - CEFOR | Instituto Adolfo Lutz | Coordenadoria de Controle de Doenças | Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo-SP, Brasil

Autor para correspondência

Maria Gisele Gonçalves

E-mail: maria.goncalves@ial.sp.gov.br

Instituição: CI | IAL | CCD/SES-SP

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, nº 355. CEP: 01246-000. São Paulo-SP, Brasil

Evolução na vigilância laboratorial do *Haemophilus influenzae* nas meningites e pneumonias bacterianas, por PCR em tempo real, no Estado de São Paulo (2010-2019)

Gonçalves MG, Higa FT, Fukasawa LO, Barros LDA, Salgado MM

RESUMO

Haemophilus influenzae (Hi) é um importante patógeno causador de meningites (MB) e pneumonias bacterianas (PB), principalmente em países onde a imunoprevenção é precária ou inexistente. O Hi é classificado em tipáveis (sorotipos a, b, c, d, e, f) e não tipáveis (HiNt), de acordo com a presença ou ausência da cápsula polissacarídica, respectivamente. A cápsula é o principal fator de virulência dos Hi e o gene *bexA*, responsável pela sua expressão, é comumente empregado na detecção molecular e vigilância das MB e PB causadas por Hi. Em 2010, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) implantou a PCR em tempo real (qPCR) empregando esse alvo genético para a detecção de Hi. Entretanto, relatos de falha na detecção de alguns Hi encapsulados e HiNt motivaram a substituição do gene alvo para essa bactéria. Desta forma, em agosto de 2012, o IAL fez a substituição do *bexA* pelo alvo genético *hpd* no ensaio de qPCR, permitindo a detecção de Hi tipáveis e não tipáveis. Neste estudo, avaliamos o impacto da substituição do alvo genético na vigilância das MB e PB analisando o emprego do alvo genético *bexA*, no período de 2010 a julho de 2012, em comparação com o emprego do *hpd*, de agosto de 2012 a 2019. Esta substituição promoveu a melhoria na detecção de variantes não vacinais de Hi nas MB e PB em 37% e 23%, respectivamente, com predomínio de Hia e HiNt, contribuindo para o aprimoramento da vigilância laboratorial das doenças invasivas causadas por Hi.

PALAVRAS-CHAVE: *H. influenzae*, Meningites bacterianas, Pneumonias bacterianas, PCR em tempo real, Diagnóstico.

ABSTRACT

Haemophilus influenzae (Hi) is an important pathogen causing bacterial Meningitis (BM) and bacterial pneumonia (BP), especially in countries where immunoprevention is poor or absent. Hi is differentiated into encapsulated (serotypes a, b, c, d, e, f), and unencapsulated (HiNt), according to the presence or lack of the polysaccharide capsule, respectively. The capsule is the main Hi virulence factor; the *bexA* gene, responsible for its expression, has been largely used for molecular detection and surveillance of BM and BP. In 2010, the Adolfo Lutz Institute (ALI) implemented real-time PCR (qPCR) using the *bexA* gene for detecting Hi; but reports on its failing to detect some encapsulated Hi and HiNt caused IAL to replace *bexA* with *hpd* as the target gene in the qPCR assay, extending Hi detection to both encapsulated and unencapsulated Hi. In this study, we assessed the impact of replacing the target gene on BM and BP surveillance, by analyzing the use of *bexA* target gene, within the period from 2010 to July 2012, compared with the use of *hpd*, from

August 2012 to 2019. Adopting the *hpd* target gene in BM and BP surveillance improved the detection of non-vaccine Hi variants by 37% and 23%, respectively, predominantly Hia and HiNt; and it has contributed to improve laboratory surveillance of invasive Hi diseases.

KEYWORDS: *H. influenzae*, Bacterial Meningitis, Bacterial pneumonia, Real-time PCR, Diagnosis.

INTRODUÇÃO

Haemophilus influenzae (Hi) é um cocobacilo Gram-negativo, que continua sendo um importante patógeno causador de meningites (MB) e pneumonias bacterianas (PB), principalmente em países onde a imunoprevenção é precária ou inexistente. A nasofaringe é a principal via de entrada desta bactéria, podendo ou não causar doenças, sendo as crianças e bebês os seus principais reservatórios.¹

A transmissão ocorre de pessoa a pessoa, pelo contato direto com gotículas contaminadas expelidas por doentes ou portadores, que podem atingir a mucosa respiratória e disseminar-se pelo organismo causando doenças em indivíduos de diferentes grupos etários, preferencialmente em crianças suscetíveis.² Em neonatos, a transmissão pode ocorrer pelo contato com fluido amniótico ou secreção genital.¹ Alguns fatores favorecem a disseminação e a suscetibilidade à doença, tais como as estações climáticas mais secas, aglomerados de pessoas, poluição, nutrição deficiente, entre outros fatores.³

O Hi é classificado em tipáveis (sorotipos a, b, c, d, e, f) e não tipáveis (HiNt) pela presença ou ausência da cápsula polissacarídica, respectivamente.⁴ A cápsula é o principal fator de virulência do Hi, a qual confere resistência à atividade bactericida do sistema complemento do hospedeiro, favorecendo assim o estabelecimento de uma infecção.⁵

A introdução da vacina contra o Hi do sorotipo b (Hib), nos anos 1980-1990,⁶ teve grande impacto na epidemiologia do Hi no mundo. Antes da vacina, o Hib era o principal patógeno nas MB e PB em crianças de países em desenvolvimento, respondendo por 20-60% e 30% desses agravos, respectivamente.⁷ Atualmente, limita-se a casos esporádicos em comunidades fechadas ou locais que não implementaram a vacina contra o Hib. Por outro lado, o HiNt, que antes do advento da vacina era mais comum em infecções inflamatórias de mucosas, como sinusite, otite e conjuntivite e no agravamento da doença pulmonar

obstrutiva crônica, tem sido frequente em infecções invasivas, especialmente em crianças e idosos.^{1,8,9}

Com a redução da prevalência do Hib, um aumento nas doenças associadas aos demais sorotipos não-b e HiNts tem sido relatado.^{7,9-11} Segundo o Relatório Epidemiológico Anual de 2018 sobre Doenças Transmissíveis na Europa https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_haemophilus_influenzae.pdf, o HiNt respondeu por 78% das doenças invasivas por Hi dentre as amostras submetidas à tipagem.

No Brasil, a vacina contra o Hib foi introduzida em 1999, resultando em uma redução expressiva nos casos de MB, em aproximadamente 90%^{2,10} e de PB em cerca de 31%¹² e na letalidade dos casos de MB e PB em menores de 5 anos de idade e em bebês abaixo de 18 meses de vida.² No Estado de São Paulo, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN, houve um declínio no coeficiente de incidência de MB por Hib, passando de 1,18/100.000 habitantes em 1998 para 0,13 em 2019.

Considerando a possibilidade de transmissão, doenças invasivas por Hi são de notificação imediata, segundo a Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública e portaria 264 de 17 de fevereiro de 2020, do Ministério da Saúde – Brasil. O diagnóstico clínico da infecção considera os sinais e sintomas, que podem ser inespecíficos, seguido da confirmação laboratorial. O tratamento desses agravos envolve administração de antibiótico a partir da suspeita clínica, principalmente na meningite, dada a gravidade e alta mortalidade desta doença.

Ao longo do histórico das MB no Brasil, o diagnóstico foi realizado por meio de diferentes exames: cultura bacteriana, aglutinação em látex, contraímunoeletroforese (CIE), quimiocitológico de líquido (LCR), bacterioscopia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).^{2,13} A cultura é a técnica padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas, porém a antibioticoterapia prévia à coleta da amostra biológica pode prejudicar a sensibilidade deste exame.¹³

A CIE é uma técnica imunológica que foi amplamente utilizada no Brasil para o diagnóstico das infecções por *Neisseria meningitidis* (Men) e Hi. Esta técnica foi introduzida na década de 70 e empregada por ser rápida, simples e de baixo custo, contemplando a detecção de antígenos bacterianos (Men-Sorogrupos A, B e C e Hib) para o diagnóstico das MB.¹⁴ Contudo, esse ensaio diagnóstico foi gradualmente descontinuado no país devido a relatos de reatividade cruzada entre *S. pneumoniae* (Spn) e Hib,¹⁵ comprovados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), que detectou 57% de resultados falso-positivos para Hib.¹⁶

Outra técnica amplamente utilizada, principalmente em hospitais, é a aglutinação em látex, cujas partículas sensibilizadas com anticorpos específicos para os sorogrupos/sorotipos promovem a formação de um precipitado visível aos olhos na presença de antígenos solúveis liberados pelas bactérias presentes em amostras biológicas. Essa estratégia contempla a detecção de Men (alguns sorogrupos), Spn e Hib, com sensibilidades de 80%, 94% e 90%, respectivamente e 97% de especificidade. No entanto, em 2018, um dos kits comerciais mais utilizados no Brasil comunicou a ocorrência de resultados falso-positivos para Spn, cujos resultados evidenciaram reatividade positiva em amostras de solução fisiológica (Carta ao cliente- FSCA 10-18 IDD-BioRad AC_003/2018). Solucionado este problema, a apresentação atual do kit de látex para MB restringe o seu emprego a amostras de LCR e sobrenadante de hemocultura, excluindo amostras de soro (Bula do kit – Pastorex™ Meningitis; Marnes-la-Coquette, França: Bio-Rad, 2017).

A técnica molecular de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi implantada por Sacchi e colaboradores na rotina diagnóstica do IAL em 2010¹³ e tem contribuído para o diagnóstico fidedigno de casos de MB no município de São Paulo. A diminuição do número de casos de MB indeterminadas foi de 50% desde sua implantação até o ano de 2015.¹⁷

O ensaio de qPCR identifica simultaneamente Men, Spn e Hi e sua introdução na rotina diagnóstica contribuiu para o aumento da detecção desses agentes em 85%, 52% e 20%, respectivamente, em relação à cultura.¹³ Neste ensaio, para a detecção de Hi foi proposto o emprego do alvo genético *bexA* direcionado aos seis tipos capsulares (a, b, c, d, e, f), tendo sido amplamente utilizado na detecção e vigilância de Hi invasivo.¹⁸⁻²¹

No entanto, apesar da alta sensibilidade e especificidade da qPCR para o Hi, Sam & Smith (2005) reportaram problemas com a utilização do alvo *bexA* para a detecção dos tipos Hie e Hif, devido à possível falha de reconhecimento da região I do *locus cap* do alvo genético *bexA* pela sonda.²² Ademais, Kroll e colaboradores observaram 16,5% de diferença entre nucleotídeos do gene *bexA* em cepas Hib de origens diferentes.²³ Em consequência, o emprego do alvo genético *bexA* implica em menor notificação de doenças por Hi devido à efetividade comprovada da vacina contra o Hib, que proporcionou a emergência dos outros tipos circulantes e HiNt.^{1,9-11,24,25}

Com o intuito de reverter as limitações do *bexA*, vários estudos foram desenvolvidos na busca por novos alvos genéticos, visando a melhoria no diagnóstico molecular de Hi.^{23,26-29} Wang e cols. (2011) documentaram o emprego do alvo genético *hpd* como uma alternativa promissora capaz de detectar todos os tipos de hemófilos, além dos HiNts.³⁰

Neste contexto, o IAL propôs alterar a composição da qPCR *triplex* (Men, Spn e Hi), com o intuito de ampliar a sensibilidade de detecção do componente Hi. A qPCR *triplex* com *hpd* foi avaliada e implementada na rotina diagnóstica do IAL em agosto de 2012.³¹

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar os genótipos circulantes de Hi no estado de São Paulo, tendo como base os resultados obtidos por qPCR pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular de Infecções Bacterianas do Centro de Imunologia do IAL (LDMIB-IAL) em amostras de casos suspeitos de MB e PB em um período de 10 anos. Para tanto, foram levantados dados secundários, armazenados em sistema digital, comparando-se o período antes (2010 a julho/2012) e após (agosto/2012 a 2019) a substituição do alvo genético responsável pela detecção de Hi na qPCR.

METODOLOGIA

Resultados de qPCR em amostras de LCR, ou soro de casos suspeitos de MB e de líquido pleural ou soro de casos suspeitos de PB, provenientes do Estado de São Paulo, foram extraídos do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH), no período de 2010 a 2019.

No sistema SIGH foram empregados filtros para separação dos resultados por ano, suspeita clínica e tipo de exame solicitado, a saber: PCR para meningites bacterianas (MENPCR), PCR para pneumonias bacterianas (PNEPCR) e genotipagem para Hi (HITIP).

Os dados coletados foram analisados em planilha Excel de maneira que refletissem o número de casos, ou seja, cada caso foi contabilizado independentemente do número de amostras analisadas.

A análise do impacto da substituição do alvo genético na detecção do Hi foi dividida em dois períodos. De 2010 a julho de 2012 empregou-se o alvo genético *bexA* e de agosto de 2012 a 2019 o alvo genético *hpd*.

Todas as amostras de DNA positivas para Hi pela qPCR foram submetidas à tipagem molecular (HITIP). No entanto, neste estudo, as amostras do período de 2010 a julho de 2012, que foram triadas para Hi pelo alvo genético *bexA* e mostraram resultado negativo no HITIP para os tipos a, b, c, d, e, f, foram denominadas “não definidas” (HiND), pois o alvo *bexA* pode ter falhado em detectar os tipos Hie e Hif nesta amostragem, uma vez que todas as amostras detectáveis por esse gene deveriam ser positivas para algum dos tipos capsulares. Da mesma forma, amostras triadas pelo alvo genético *hpd*, com resultado negativo no HITIP foram denominadas como HiNt.

Este estudo foi desenvolvido em consonância com as resoluções do Conselho Nacional de Saúde 441, de 12 de maio de 2011 e 466, de 12 de dezembro de 2012, removendo-se

identificadores pessoais que pudessem comprometer o anonimato dos pacientes, no intuito de assegurar a confidencialidade dos dados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAL e cadastrado na Plataforma Brasil com o protocolo CAAE: 10760812.6.0000.0059.

RESULTADOS

Entre 2010 e 2019 foram analisados 19.645 casos suspeitos de MB por Men, Spn ou Hi pelo LDMIB-IAL. Desses, 5.663 (28,8%) casos revelaram-se positivos para os agentes bacterianos pesquisados pela qPCR: 3.091 (15,7%) para Men, 2.267 (11,5%) para Spn e 305 (1,6%) para Hi. A estes 305 casos de MB por Hi do estado de São Paulo foram acrescidos 70 casos provenientes do interior do estado, perfazendo um total de 375 casos positivos para Hi que foram submetidos à genotipagem (HITIP). Desse total, 78 corresponderam ao período de 2010 a julho de 2012 (*bexA*) e 297 de agosto de 2012 a 2019 (*hpd*).

A frequência dos genótipos identificados nos 375 casos de MB por Hi, nos períodos avaliados, está detalhada na Tabela 1. É possível observar que os HiNts foram responsáveis por cerca de um terço dos casos de MB por hemófilos após a introdução do alvo genético *hpd*. Ademais, a troca do alvo genético para *hpd* possibilitou a identificação de Hie e Hif, devido à correção na falha da detecção desses genótipos, levando a um acréscimo de 3% na genotipagem.

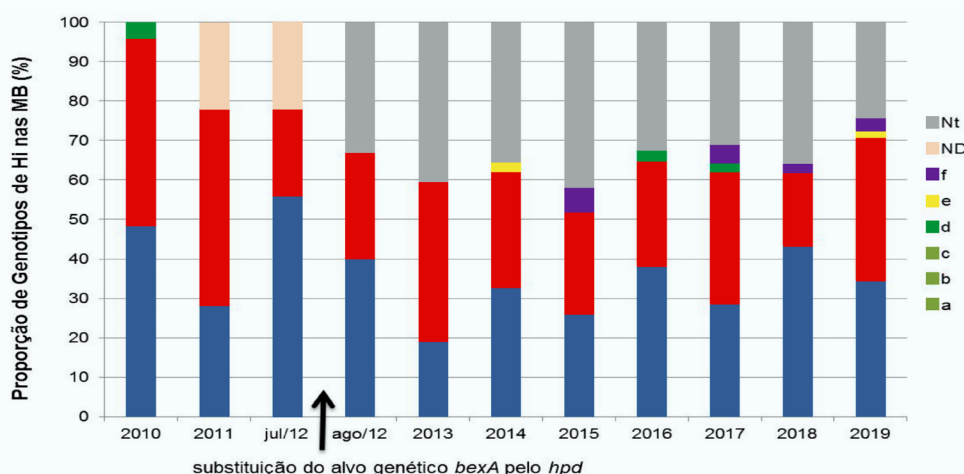
Tabela 1. Frequência de genótipos de *H. influenzae* detectados por qPCR em DNA de amostras de LCR ou soro de 375 casos suspeitos de meningite bacteriana, no período de 2010 a 2019, com divisão do ano de 2012 entre julho e agosto devido à substituição do alvo genético *bexA* pelo *hpd* na rotina do laboratório.

Genótipos (n)	Meningite Bacteriana por <i>H. influenzae</i>			
	<i>bexA</i> (2010-julho/2012)		<i>hpd</i> (agosto/2012-2019)	
	Nº Casos	Frequência	Nº Casos	Frequência
a (128)	31	39,7%	97	32,7%
b (123)	35	44,9%	88	29,6%
c (0)	-	-	-	-
d (3)	1	1,3%	2	0,7%
e (2)	-	-	2	0,7%
f (7)	-	-	7	2,3%
ND (11)	11	14,1%	-	-
Nt (101)	-	-	101	34,0%
TOTAL (375)	78	100%	297	100%

Legenda: Hi: Haemophilus influenzae; ND= Hi não definidos; Nt= Hi não-tipáveis.

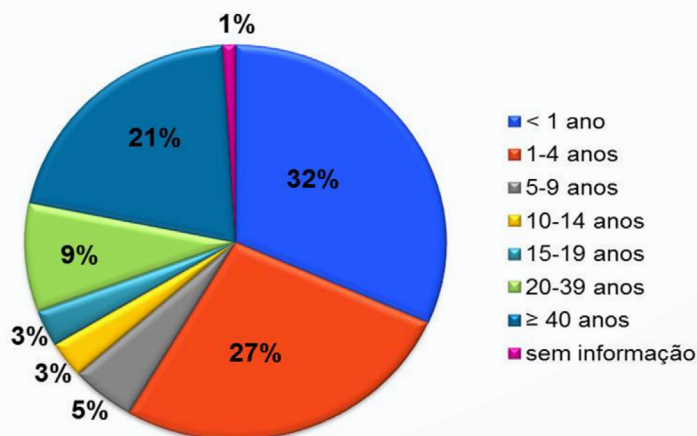
A distribuição dos genótipos de Hi estão representados na Figura 1, no qual se pode observar a redução na frequência do Hib e aumento de Hia, bem como a emergência de outros sorotipos no decorrer do período avaliado. A mudança no alvo genético *hpd* proporcionou, a partir de agosto de 2012, a detecção dos HiNts, Hie e Hif.

Figura 1. Proporção de genótipos de *H. influenzae* detectados em 375 casos de meningite bacteriana no período de 2010 a 2019, com divisão do ano de 2012 entre julho e agosto devido substituição do alvo genético *bexA* por *hpd* no ensaio de qPCR no LDMIB. Nt= hemófilos não-tipáveis; ND= hemófilos não definidos.



Em relação à faixa etária, a frequência de casos de MB por Hi estão distribuídos na Figura 2. Agrupando-se as idades, há maior frequência de MB por Hi entre os menores de cinco anos, que contabilizaram 59% dos casos. Ainda, na amostragem analisada, houve maior predomínio de Hia entre os menores de 5 anos (77,3%; 99/128) e de HiNt entre os maiores de 40 anos (46,0%; 52/113).

Figura 2. Distribuição, por faixa etária, nos 375 casos de MB por Hi provenientes do estado de São Paulo e identificados pela qPCR em amostras de DNA de LCR ou soro analisadas no LDMIB, 2010-2019.



Evolução na vigilância laboratorial do *Haemophilus influenzae* nas meningites e pneumonias bacterianas, por PCR em tempo real, no Estado de São Paulo (2010-2019)

Gonçalves MG, FT, Fukasawa LO, Barros LDA, Salgado MM

Ao contrário das MB, as PB não figuram no rol de doenças de notificação compulsória e a pesquisa do agente etiológico só é recomendada para pacientes com quadros graves ou mal respondedores à antibioticoterapia prévia.³² Esses fatos provavelmente influenciaram no menor número de amostras encaminhadas ao LDMIB-IAL para o diagnóstico deste agravo (2010-2019).

Com relação às PB, foram analisados 1.075 casos. Destes, 227 (21,1%) foram positivos, 843 (78,4%) negativos e 5 (0,5%) inconclusivos. Dos 227 casos positivos, 210 (19,5%) foram positivos para Spn e 17 (1,6%) para Hi (Tabela 2).

Tabela 2. Agentes bacterianos detectados por qPCR em DNA de amostras de soro ou líquido pleural e genotipagem de Hi nas suspeitas clínicas de pneumonias bacterianas analisadas pelo LDMIB-IAL, no período de 2010 a 2019, com divisão no ano de 2012 entre julho e agosto devido à substituição do alvo genético *bexA* pelo *hpd* na rotina do laboratório.

Ano	PNEPCR					Genotipagem de Hi			Total
	TOTAL	SPN	HI	NEG	INC	Hia	Hib	Nt	
2010	113	10	-	103					
2011	108	16	1	91		1			
Jan-Jul 2012	42	7	-	35					
Ago-Dez 2012	19	4	-	15					
2013	215	22	4	189		1		1	
2014	84	20	1	63					
2015	56	7	2	47				1	
2016	107	31	1	72	3		1		
2017	114	19	2	92	1	1		1	
2018	107	39	4	63	1	4			
2019	110	35	2	73	-	2			
Total	1.075	210	17	843	5	9	1	3	13

Treze das 17 amostras positivas para Hi foram submetidas à genotipagem, sendo que 9 (69%) foram identificadas como Hia, 1 (8%) Hib e 3 (23%) como HiNt.

Nas amostras de PB, a substituição do alvo genético *bexA* por *hpd* resultou em acréscimo de 23% na detecção de Hi pela identificação de HiNts (3/13). Entre os genótipos detectados, houve predominância de Hia (69%) nos casos avaliados.

Com relação à distribuição por faixa etária, os menores de cinco anos concentraram 84,6% dos casos de PB causadas por Hi, distribuídos em 23,1% (3/13) nos menores de 1 ano e 61,5% (8/13) entre 1 e 4 anos, ao passo que os indivíduos com idades entre 5 e 14 anos perfizeram 15,4% do total de PB causadas por Hi.

DISCUSSÃO

A introdução da vacina contra o Hib permitiu a alteração do cenário epidemiológico do Hi, em escala mundial. Uma vez que a imunoprevenção é sorotipo-específica, seu efeito promoveu redução na incidência de doenças invasivas e na colonização da nasofaringe para o tipo b, sem interferir nas demais variantes de Hi.^{6,9,11,33} De fato, após a introdução da vacina no PNI do Brasil, em 1999, ocorreu um declínio de aproximadamente 40% no isolamento de cepas de Hib.¹⁰

A identificação correta dos sorotipos de Hi tem papel fundamental no monitoramento das variantes circulantes e também auxiliam na compreensão da epidemiologia desse agente, bem como nas ações de controle das doenças causadas pelo Hi. Nesse contexto, testes diagnósticos de alta sensibilidade, especificidade e rapidez atuam como a chave no sucesso das terapias e cuidados ao paciente, favorecendo ações imediatas de controle e de contenção de surtos e epidemias.

Ensaio moleculares voltados preferencialmente ao Hib precisaram ser reavaliados para melhorar o diagnóstico do Hi, empregando um alvo genético de amplo espectro, pois a emergência de variantes não-b e HiNTs era esperada.⁹

No estudo sentinela de MB realizado de 2006 a 2009, Sacchi e cols. (2011) propuseram no IAL o ensaio qPCR *triplex* baseado na utilização do alvo genético *bexA*.¹³ Este ensaio, capaz de detectar somente variantes encapsuladas, detectou apenas 3 casos positivos para Hi em 660 amostras analisadas, possivelmente pela limitação do componente *bexA* do ensaio qPCR *trípex*.¹³

Diante disso, o IAL (Laboratório de Referência Nacional para o Diagnóstico de MB-LRNM), baseado em estudos anteriores,^{30,34} propôs a melhoria na detecção do Hi promovendo a substituição do alvo genético *bexA* pelo *hpd* no ensaio de qPCR *triplex*, com a finalidade de melhorar a vigilância laboratorial deste agente. De fato, este ensaio qPCR *triplex hpd* modificado mostrou-se mais eficiente em aumentar a detecção de Hi em amostras clínicas no período estudado.³¹ Esse ensaio modificado foi introduzido na rotina diagnóstica do IAL a partir de 2012.

O presente estudo comparou a capacidade de detecção de Hi do ensaio qPCR *triplex* com *bexA* (2010 a julho/2012) versus *hpd* (agosto/2012 a 2019) em amostras clínicas de pacientes com suspeita de MB e PB.

Em um estudo brasileiro realizado por Zanella e cols. (2011) com 3.910 isolados de Hi causadores de meningites enviados ao LRNM para sorotipagem, reportou-se que o Hib

respondeu por 98% dos casos de meningite por Hi no período pré-vacinal (1990-1999), decaindo para 59% após a introdução da vacina (2000-2008). Na era pós-vacinal, os autores observaram aumento dos sorotipos não b (1% para 19%) e dos HiNTs (2% para 22%).¹⁰ No presente estudo, realizado no Estado de São Paulo na segunda década pós-vacinal (2010-2019), foi observado maior detecção dos sorotipos não b, bem como dos HiNTs nas MB e PB, em face do declínio do Hib promovido pela vacinação. Nas MB, o Hia representou 34% (128/375) e os HiNTs, 27% (101/375) dos casos analisados de 2010-2019. Nas PB, o Hia representou 69% (9/13) e os HiNTs, 23% (3/13) no mesmo período. McNeil e cols. (2021) chamam a atenção sobre o aumento de doenças invasivas causadas pelo Hia e HiNT, no período de 2011 a 2018, em população pediátrica nos Estados Unidos, sem aparente aumento dos demais Hi capsulados.³³

Com relação à faixa etária observamos maior vulnerabilidade às infecções invasivas por Hi entre os menores de cinco anos, perfazendo 59% dos acometidos nas suspeitas de MB e 85% nas PB, corroborando com as informações disponíveis no site da Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (Sinan/DDTR/CVE/CCD/SES-SP), que relatam 57% de prevalência de infecções por Hi, nesta faixa etária nos últimos dez anos.

Os demais sorotipos capsulares Hic, Hid, Hie e Hif, que esporadicamente causam infecções por Hi, corresponderam a 3,2% de todos os casos de MB e estiveram ausentes nas PB analisadas no presente estudo. Dentre esses, o Hif foi o mais comum neste estudo e em outras investigações reportadas na literatura.^{6,33,35} As frequências desses genótipos em nosso estudo assemelham-se às de cepas de Hi não a/b isoladas de casos de MB no Brasil no período pós-vacinal (2000-2008), como registrado por Zanella e cols. (2011),¹⁰ com 0,2% de Hic, 0,9% de Hid, 0,5% de Hie e 2,4% de Hif. Os resultados do presente estudo corroboram com registros de dez anos de vigilância laboratorial de Hi (2010-2019) em países latino-americanos, cujos resultados mostram menos de 1% de casos clínicos associados aos Hic, Hid ou Hie (registros de 2010-2012 disponíveis nos Informes epidemiológicos da Rede SIREVAII: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5536:2011-sireva-ii&Itemid=3966&lang=en e de 2013-2019, nos Boletins do IAL: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/boletim>). Estudo realizado em Israel por Bamberger e cols. (2014)³⁶ mostraram resultados similares aos acima apresentados, ou seja, baixas frequências de casos clínicos associados aos Hi não a/b.

Vale ressaltar que, embora os sorotipos “e” e “f” sejam pouco frequentes nas infecções invasivas por Hi, no presente estudo, a qPCR *triplex* com o alvo genético *hpd* foi capaz de detectar estes 2 sorotipos, promovendo um ganho de 3% na identificação de Hi nas MB.

A presença dos HiNts tem sido destaque na era pós-vacinal. Esse aumento já vinha sendo reportado em diferentes países da América Latina.³⁷ No presente estudo, os HiNts corresponderam a um terço dos casos de MB (34%) e a 23% dos casos de PB avaliados pelo ensaio de qPCR modificado, sendo estes dados equivalentes aos obtidos por Zanella e colaboradores, que identificaram 33% de HiNts entre 371 cepas isoladas no período pós-vacinal (2000-2008) no estado de São Paulo.¹⁰ Esses dados ratificam a importância da substituição do gene alvo do Hi no ensaio de qPCR *triplex*, que anteriormente não detectava essas estirpes.

Um estudo conduzido por King e cols. (2012) relatou que os HiNts são menos virulentos e raramente causam doenças invasivas, sendo considerados patógenos primários da mucosa.³⁸ Por outro lado, Slack (2015) descreveu que, nas infecções invasivas, o HiNt foi responsável por 37% de bacteremia sem causas aparentes, 27% de pneumonia e 12% de meningite.¹¹ Além disso, outros estudos reportaram aumento de colonização da nasofaringe por HiNt em população pediátrica que recebeu vacina conjugada contra Spn, indicando a participação cada vez mais expressiva do HiNt tanto nas doenças invasivas quanto na portação.^{39,40}

Um fator que poderia ter contribuído para o aumento de doenças invasivas por HiNts no período pós-vacinal foi a melhoria no diagnóstico, com emprego de alvos genéticos de amplo espectro em ensaios moleculares que promoveram a detecção de variantes encapsuladas ou não, bem como de ensaios de identificação dos vários genótipos de Hi que antes se voltavam apenas para o Hib.⁹

Neste cenário, faz-se necessário o aprimoramento contínuo dos testes diagnósticos, pois a confirmação laboratorial de casos de doenças causadas por Hi é fundamental para manutenção da vigilância ativa deste agente, permitindo avaliar possíveis falhas vacinais e/ou mudanças na média de idade de indivíduos acometidos para adoção de novas estratégias e políticas públicas de controle epidemiológico da doença.

CONCLUSÃO

A alteração do alvo genético *bexA* para *hpd* no ensaio molecular em formato *triplex* desenvolvido pelo LDMIB-IAL resultou em eficiência de 37% e 23% na detecção de casos de MB e PB causados por Hi, respectivamente, devido ao acréscimo na detecção de Hi e-f e HiNts. Essa observação possibilitou o aumento na detecção de variantes não vacinais (com predomínio de Hia, seguido do HiNt), além de auxiliar no monitoramento epidemiológico da emergência de outros sorotipos capsulares.

REFERÊNCIAS

1. Butler DF, Myers SA. Changing Epidemiology of Haemophilus influenzae in children. Infect Dis Clin North Am. 2018 Mar;32(1):119-28. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.10.005> . Epub 2017 Dec 9. PMID: 29233576.
2. Liphaut BL, Ferreira PM, Endo JAG, Silva MR, Carvalhanas TR. Meningite: o que precisamos saber?. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA). 2018: 23-32. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2018/edicao_178_-_outubro.pdf
3. Iser BP, Lima HC, Moraes C, Almeida RP, Watanabe LT, Alves SL, Lemos AP, Gorla MC, Gonçalves MG, Santos DA, Sobel J. Outbreak of Neisseria meningitidis C in workers at a large food-processing plant in Brazil: challenges of controlling disease spread to the larger community. Epidemiol Infect. 2012 May;140(5):906-15. <https://doi.org/10.1017/S0950268811001610> . Epub 2011 Aug 30. PMID: 21875453.
4. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species Haemophilus influenzae. J Exp Med. 1931 Mar 31;53(4):471-92. <https://doi.org/10.1084/jem.53.4.471> . PMID: 19869858; PMCID: PMC2131978.
5. Sutton A, Schneerson R, Kendall-Morris S, Robbins JB. Differential complement resistance mediates virulence of Haemophilus influenzae type b. Infect Immun. 1982 Jan;35(1):95-104. <https://doi.org/10.1128/iai.35.1.95-104.1982> . PMID: 6976328; PMCID: PMC351001.
6. Soeters HM, Oliver SE, Plumb ID, Blain AE, Zulz T, Simons BC, Barnes M, Farley MM, Harrison LH, Lynfield R, Massay S, McLaughlin J, Muse AG, Petit S, Schaffner W, Thomas A, Torres S, Watt J, Pondo T, Whaley MJ, Hu F, Wang X, Briere EC, Bruce MG. Epidemiology of Invasive Haemophilus influenzae Serotype a Disease-United States, 2008-2017. Clin Infect Dis. 2021 Jul 15;73(2):e371-e379. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa875> . PMID: 32589699.
7. Funkhouser A, Steinhoff MC, Ward J. Haemophilus influenzae disease and immunization in developing countries. Rev Infect Dis. 1991 May-Jun;13 Suppl 6: S542-54. https://doi.org/10.1093/clinids/13.Supplement_6.S542 . PMID: 1862284.
8. Van Eldere J, Slack MP, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable Haemophilus influenzae, an under-recognised pathogen. Lancet Infect Dis. 2014 Dec;14(12):1281-92. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70734-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70734-0) . Epub 2014 Jul 7. PMID: 25012226.
9. Langereis JD, Jonge MI. Invasive Disease Caused by Nontypeable Haemophilus influenzae. Emerg Infect Dis. 2015 Oct;21(10):1711-8. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150004> . PMID: 26407156; PMCID: PMC4593434.

10. Zanella RC, Bokermann S, Andrade AL, Flannery B, Brandileone MC. Changes in serotype distribution of *Haemophilus influenzae* meningitis isolates identified through laboratory-based surveillance following routine childhood vaccination against *H. influenzae* type b in Brazil. *Vaccine*. 2011 Nov 8;29(48):8937-42. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.053>. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21945960.
11. Slack MPE. A review of the role of *Haemophilus influenzae* in community-acquired pneumonia. *Pneumonia* (Nathan). 2015 Dec 1; 6:26-43. <https://doi.org/10.15172/pneu.2015.6/520>. PMID: 31641576; PMCID: PMC5922337.
12. Andrade AL, Andrade JG, Martelli CM, Silva SA, Oliveira RM, Costa MS, Laval CB, Ribeiro LH, Di Fabio JL. Effectiveness of *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccine on childhood pneumonia: a case-control study in Brazil. *Int J Epidemiol*. 2004 Feb;33(1):173-81. <https://doi.org/10.1093/ije/dyh025>. PMID: 15075166.
13. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, Ribeiro AF, Kemp B, Gorla MC, Albernaz RK, Marques EG, Cruciano A, Waldman EA, Brandileone MC, Harrison LH; São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(6): e20675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020675>. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21731621; PMCID: PMC3120771.
14. Fukasawa LO, Salgado MM, Marques EGL, Fernandes RMBP, Kemp B, Carvalhanas TR, et al. Validação da técnica de contraímunoeletroforese (CIE) para o diagnóstico laboratorial das meningites causadas por *Neisseria meningitidis* sorogrupos, A, B, C e W135. *Boletim Epidemiológico-BEPA*. 2012;9(102): 13-20. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2012/ses-28031/ses-28031-4710.pdf>
15. Ballard TL, Spangler A, Roe MH, Glode MP. Clinically significant cross-reactions with counterimmuno-electrophoresis between pneumococcus type 6 and *Haemophilus influenzae* type b. *J Clin Microbiol*. 1985 Nov;22(5):754-6. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.5.754-756.1985>. PMID: 3877075; PMCID: PMC268520.
16. Fukasawa LO, Salgado MM, Gonçalves MG, Custódio AV, Araújo TP, Carvalhanas TR, et al. Limitações no uso da técnica de contraímunoeletroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)*. 2010;7(76):4-12. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2010/ses-27936/ses-27936-4587.pdf>
17. Gonçalves MG, Higa FT, Salgado MM, Fukasawa LO, Fernandes RMBP, Fernandes A, et al. Contribuição da PCR em tempo real para o fechamento de casos de meningites bacterianas no município de São Paulo. In: X Encontro do Instituto Adolfo Lutz. 2015. CD-ROM.
18. Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 1994 Oct;32(10):2382-6. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.10.2382-2386.1994>. PMID: 7814470; PMCID: PMC264070.

19. Gonin P, Lorange M, Delage G. Performance of a multiplex PCR for the determination of Haemophilus influenzae capsular types in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 May;37(1):1-4. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(00\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(00)00116-4). PMID: 10794932.
20. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1553-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1553-1558.2001>. PMID: 11283086; PMCID: PMC87969.
21. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of Haemophilus influenzae. *J Clin Microbiol*. 2007 Jul;45(7):2305-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.00102-07>. Epub 2007 May 16. PMID: 17507524; PMCID: PMC1932976.
22. Sam IC, Smith M. Failure to detect capsule gene bexA in Haemophilus influenzae types e and f by real-time PCR due to sequence variation within probe binding sites. *J Med Microbiol*. 2005 May;54(Pt 5):453-5. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45836-0>. PMID: 15824422.
23. Kroll JS, Loynds B, Brophy LN, Moxon ER. The bex locus in encapsulated Haemophilus influenzae: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. *Mol Microbiol*. 1990 Nov;4(11):1853-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02034.x>. PMID: 2082145.
24. Cerquetti M, Giufrè M. Why we need a vaccine for non-typeable Haemophilus influenzae. *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Sep;12(9):2357-61. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1174354>. Epub 2016 May 12. PMID: 27171854; PMCID: PMC5027700.
25. Romaneli MTDN, Tresoldi AT, Pereira RM, Garcia MT, Hofling CC, Resende MR. Invasive non-type b Haemophilus influenzae disease: report of eight cases. *Rev Paul Pediatr*. 2019 Apr-Jun;37(2):156-160. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2019/37;2;00006>. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30624539; PMCID: PMC6651304.
26. Loeb MR, Smith DH. Outer membrane protein composition in disease isolates of Haemophilus influenzae: pathogenic and epidemiological implications. *Infect Immun*. 1980 Dec;30(3):709-17. <https://doi.org/10.1128/iai.30.3.709-717.1980>. PMID: 6971807; PMCID: PMC551373.
27. Nørskov-Lauritsen N. Detection of cryptic genospecies misidentified as Haemophilus influenzae in routine clinical samples by assessment of marker genes fucK, hap, and sodC. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug;47(8):2590-2. <https://doi.org/10.1128/JCM.00013-09>. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19535530; PMCID: PMC2725679.
28. McCrea KW, Xie J, LaCross N, Patel M, Mukundan D, Murphy TF, Marrs CF, Gilsdorf JR. Relationships of nontypeable Haemophilus influenzae strains to hemolytic and nonhemolytic Haemophilus haemolyticus strains. *J Clin Microbiol*. 2008 Feb;46(2):406-16. <https://doi.org/10.1128/JCM.01832-07>. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18039799; PMCID: PMC2238123.

29. Smith-Vaughan H, Byun R, Nadkarni M, Jacques NA, Hunter N, Halpin S, Morris PS, Leach AJ. Measuring nasal bacterial load and its association with otitis media. *BMC Ear Nose Throat Disord*. 2006 May 10; 6:10. <https://doi.org/10.1186/1472-6815-6-10> . PMID: 16686940; PMCID: PMC1479363.
30. Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, Harcourt BH, Carvalho Mda G, Pimenta F, Nymadawa P, Altantsetseg D, Kirsch M, Satola SW, Cohn A, Messonnier NE, Mayer LW. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *Int J Med Microbiol*. 2011 Apr;301(4):303-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.11.004> . Epub 2011 Jan 26. PMID: 21276750.
31. Salgado MM, Higa FT, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Liphhaus BL, Oliveira PL, *et al*. Nova versão do ensaio da PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica das meningites bacterianas. *Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)*. 2012; 9(103): 16-20. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2012/ses-28039/ses-28039-4714.pdf>
32. Corrêa RA, Costa AN, Lundgren F, Michelin L, Figueiredo MR, Holanda M, Gomes M, Teixeira PJZ, Martins R, Silva R, Athanzio RA, Silva RMD, Pereira MC. 2018 recommendations for the management of community acquired pneumonia. *J Bras Pneumol*. 2018 Sep-Oct;44(5):405-23. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562018000000130> . Erratum in: *J Bras Pneumol*. 2018 Nov-Dec;44(6):532. Erratum in: *J Bras Pneumol*. 2019 May 13;45(2): e20180130. PMID: 30517341; PMCID: PMC6467584.
33. McNeil JC, Sommer LM, Dunn JJ, Hulten KG, Kaplan SL, Vallejo JG. Molecular Epidemiology of Contemporary Invasive *Haemophilus influenzae* Isolates in Texas Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2021 Sep 1;40(9):852-5. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003188> . PMID: 34260499.
34. Binks MJ, Temple B, Kirkham LA, Wiertsema SP, Dunne EM, Richmond PC, Marsh RL, Leach AJ, Smith-Vaughan HC. Molecular surveillance of true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays. *PLoS One*. 2012;7(3): e34083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034083> . Epub 2012 Mar 28. PMID: 22470516; PMCID: PMC3314702.
35. Ladhani S, Slack MP, Heath PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME; European Union Invasive Bacterial Infection Surveillance participants. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis*. 2010 Mar;16(3):455-63. <https://doi.org/10.3201/eid1603.090290> . PMID: 20202421; PMCID: PMC3322004.
36. Bamberger EE, Ben-Shimol S, Abu Raya B, Katz A, Givon-Lavi N, Dagan R, Srugo I; Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. Pediatric invasive *Haemophilus influenzae* infections in Israel in the era of *Haemophilus influenzae* type b vaccine: a nationwide prospective study. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 May;33(5):477-81. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000193> . PMID: 24445822.
37. Gabastou JM, Agudelo CI, Brandileone MCC, Castañeda E, Lemos APS, Di Fabio JL, *et al*. Caracterización de aislamientos invasivos de *S.pneumoniae*, *H.influenzae* y *N.meningitidis*

- em America Latina y el Caribe: SIREVA II, 2000-2005. Rev Panam Salud Publica. 2008; 24(1): 1-15. 1-15,jul. 2008. Retrieved From: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892008000700001
38. King P. Haemophilus influenzae and the lung (Haemophilus and the lung). Clin Transl Med. 2012 Jun 14;1(1):10. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-1-10> . PMID: 23369277; PMCID: PMC3567431.
39. Brandileone MC, Zanella RC, Almeida SCG, Brandao AP, Ribeiro AF, Carvalhanas TMP, Sato H, Andrade AL, Verani JR; Pneumococcal Carriage Study Group. Effect of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae among children in São Paulo, Brazil. Vaccine. 2016 Nov 4;34(46):5604-5611. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.027>. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27692770.
40. Cleary DW, Devine VT, Morris DE, Osman KL, Gladstone RA, Bentley SD, Faust SN, Clarke SC. Pneumococcal vaccine impacts on the population genomics of non-typeable Haemophilus influenzae. Microb Genom. 2018 Sep;4(9): e000209. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000209> . Epub 2018 Aug 6. Erratum in: Microb Genom. 2021 May;7(5): Cleary, David [corrected to Cleary, David W]; Devine, Vanessa [corrected to Devine, Vanessa T]; Morris, Denise [corrected to Morris, Denise E]; Osman, Karen [corrected to Osman, Karen L]; Gladstone, Rebecca [corrected to Gladstone, Rebecca A]; Bentley, Ste. PMID: 30080135; PMCID: PMC6202451.
-

Histórico

Recebimento

19/11/2021

Aprovação

17/01/2022

Publicação

31/01/2022

Como citar

Gisele Gonçalves M, Takenori Higa F, Takenori Higa F, Okuyama Fukasawa L, Degaulle Alves Barros L, Marques Salgado M. Evolução na vigilância laboratorial do Haemophilus influenzae nas meningites e pneumonias bacterianas, por PCR em tempo real, no Estado de São Paulo (2010-2019). Bepa [Internet]. 31º de janeiro de 2022 [citado 4º de janeiro de 2023];19:1-16. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/37293>

Acesso aberto



Evolução na vigilância laboratorial do Haemophilus influenzae nas meningites e pneumonias bacterianas, por PCR em tempo real, no Estado de São Paulo (2010-2019)

Gonçalves MG, FT, Fukasawa LO, Barros LDA, Salgado MM