

HAEMOPHILUS INFLUENZAE ISOLADOS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO — FREQUÊNCIA DOS BIOTIPOS E SOROTIPOS*

Iika Maria LANDGRAF**
Maria de Fátima Paiva VIEIRA**

RIALA6/715

LANDGRAF, L.M. & VIEIRA, M.F.P. — *Haemophilus influenzae* isolados de líquido cefalorraquidiano — Frequência dos biotipos e sorotipos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2):87-91, 1991.

RESUMO: *Haemophilus influenzae* causam várias doenças invasivas, das quais a meningite é a mais freqüente, e se constituem em uma grande ameaça à saúde em todo o mundo. Nos exames laboratoriais do líquido cefalorraquidiano (LCR) realizados na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Referência Nacional para meningites, São Paulo, SP, esta bactéria tem figurado como um dos agentes etiológicos predominantes das meningites. Foram estudadas 1.000 cepas de *H. influenzae* isoladas de LCR no período de 1977 a 1990. A caracterização da espécie *H. influenzae* e a definição dos biotipos foram obtidas através do estudo de propriedades bioquímicas, e também foram determinados os sorotipos através de reações de aglutinação com antíseros específicos. Dentre os biotipos, o mais freqüente foi o I (70,9%), seguido do II (27,5%). Com relação aos sorotipos o *b* foi o mais prevalente (99,3%), mas sorotipos *a* (0,6%) e *c* (0,1%) também foram encontrados.

DESCRITORES: *Haemophilus influenzae*; *H. influenzae*, biotipos e sorotipos; meningites por *H. influenzae*.

INTRODUÇÃO

Membros do gênero *Haemophilus* são parasitas obrigatórios integrantes da microbiota normal do trato respiratório, mais propriamente do orofaringe, do homem e de alguns animais. A espécie *H. influenzae* é responsável por uma variedade de doenças em humanos, que variam de uma simples faringite a doenças graves como a meningite.

Morfologicamente, *H. influenzae* são bacilos Gram negativos que podem se apresentar como co-co-bacilos e formas filamentosas caracterizando pleomorfismo. As colônias em agar chocolate são lisas, baixas, convexas, acinzentadas, translúcidas e atingem de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro. Não apresentam hemólise em ágar-sangue. Cepas isoladas de infecções invasivas são geralmente encapsuladas.

O crescimento destes bacilos em meio de cultu-

ra é caracterizado pela sua dependência do chamado fator V. Este fator está proximamente ligado ao processo de oxidação-redução do crescimento celular, sendo uma das duas co-dehidrogenases, NAD ou NADP, ou certos precursores indefinidos das mesmas. São também desprovidos da capacidade enzimática de converter o ácido delta-aminolevulínico à porfirina, exigindo, portanto hemina do sangue ou fator X.

A diferenciação das espécies de *Haemophilus*, no entanto, requer outras provas além da dependência dos fatores V e X. As reações de degradação de carboidratos e outras reações bioquímicas são dados importantes para a caracterização de espécie e de biotipos, como também é importante a determinação dos sorotipos através da pesquisa dos antígenos capsulares.

Considerando-se a importância da *H. influenzae* que entre nós tem sido agente freqüente de me-

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

ningites, foi estudada a caracterização dos biotipos e sorotipos de cepas isoladas de líquido cefalorraquidiano, na região de São Paulo, SP, Brasil, no período de 1977 a 1990.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *Haemophilus* sp, em um total de 1.000, foram isoladas de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) no laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Referência Nacional para meningites, São Paulo, SP. Recomendou-se a semeadura direta logo após a punção, de pelo menos 5 gotas do LCR em ágar chocolate a 5% (sangue de coelho), tendo como meio base o ágar Mueller Hinton. O meio de cultura semeado foi incubado o mais rápido possível a 35-37°C em ambiente de 5-10% de CO₂ e umidade¹. Havendo crescimento, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram modificado por Hucker⁵. A presença de bacilos Gram negativos, predominantemente de coco-bacilos, e com características de pleomorfismo, de culturas com colônias pequenas, translúcidas, acinzentadas, orientou para a realização da prova de satelitismo em placa de ágar-sangue de carneiro a 5%, base ágar comum¹², na qual também foi observada a presença ou ausência de hemólise. O inóculo para esta prova correspondeu a uma diluição a 1:100 de uma suspensão com turbidês equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Para o estudo das características bioquímicas e sorológicas foram realizadas subculturas em meio ágar chocolate a 10% (sangue de cavalo) base BHI (Brain Heart Infusion). A caracterização do gênero *Haemophilus* e espécie *influenzae* foi desenvolvida segundo metodologia atualizada empregada no Laboratório do Prof. Kilian, em Aarhus, Dinamarca (comunicação pessoal). Assim, foram realizadas provas de catalase e oxidase^{11,13,24} e determinada a habilidade ou não da biosíntese de porfirinas a partir do ácido delta-aminolevulínico (ALA) através do teste da Porfirina^{10,13,14}. A degradação de carboidratos foi observada em base PRB (Phenol Red Broth), Difco, esterilizada por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, à qual foram acrescentados os açúcares glicose, sacarose, lactose, xilose e manitol, esterilizados por filtração, na concentração final de 1%. A produção ou não de gás resultante da fermentação da glicose foi observada com o auxílio do tubo de Durhan colocado no tubo contendo este carboidrato^{11,14}. A estas bases foram acrescidos os fatores V e X produzidos no laboratório: o V a partir de levedo de pão e o X a partir de sangue coagulado, ambos na concentração final de 1%¹⁶. Comparativamente, na observação da fermentação

da sacarose, foi empregado NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) comercial Difco ou Sigma (fator V) em uma concentração final de 10ug/ml^{11,12,13,14}. As reações de fermentação, quando negativas em 24 h de incubação, foram observadas até cerca de 5 dias. A produção ou não de Beta-galactosidase — ONPG — foi desenvolvida segundo Bülow³, como descrita por Lee e colaboradores¹⁵. As provas de determinação das enzimas triptofanase, urease e ornitina descarboxilase foram realizadas segundo Kilian^{6,9,11,12,13,14,22,24}. Nos substratos para ornitina¹⁸, uréia e indol¹⁷, em quantidades de 0,5 ml em tubos de 12X120, foi emulsionada uma alça bem cheia do inóculo bacteriano de 24 a 48 h e a leitura realizada após incubação a 37°C por 4 a 24 h. Para a revelação de indol foi empregado o reativo de Kovacs^{12,13,14}. A identificação dos sorotipos, designados de *a* até *f*^{2,4,12,13,14,19,21} foi processada por soroaglutinação em lâmina, empregando-se antissoros Difco e os produzidos na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, segundo a metodologia do CDC⁷.

RESULTADOS

As cepas de *Haemophilus* estudadas se caracterizaram, por apresentarem uma morfologia de bacilos Gram negativos, curtos, porém ligeiramente pleomórficos. As colônias em ágar chocolate a 5%, base Mueller-Hinton, eram lisas, baixas, convexas, acinzentadas, translúcidas e pequenas. Não eram hemolíticas em ágar-sangue. Apresentaram prova de satelitismo positiva e prova do ALA negativa e não se desenvolveram em ágar comum. Todas as cepas foram catalase e oxidase positivas, embora em algumas a reação de oxidase tenha sido relativamente tardia. Definindo a espécie *H. influenzae*, houve fermentação dos carboidratos glicose, sem produção de gás, e xilose, com poucas exceções desta última. Confirmando a espécie, não houve fermentação da sacarose com o emprego do NAD comercial, no entanto, com o emprego do fator V produzido a partir de levedo de pão, ocorreram reações positivas falsas.⁸ Foram negativas também as reações de fermentação da lactose e de manitol (Quadro 1). A pesquisa das enzimas triptofanase (indol), urease e ornitina descarboxilase, que definem a subdivisão em biotipos, revelou que o biotipo I foi o mais prevalente nos 14 anos considerados (Tabela I) com a média total de 70,9%. Os sorotipos, determinados pelo polissacarídeo capsular, foram predominantemente o sorotipo *b* (99,3%), dos quais 99,4% pertenceram ao biotipo I, com a ocorrência também dos sorotipos *a* (0,6%) e *c* (0,1%). Algumas cepas não foram sorotipadas por ausência da cápsula (Tabela II).

QUADRO 1

Características enzimáticas dos Haemophilus influenzae estudados. IAL. São Paulo. SP

Dependência de NAD (satelitismo)	+	100%
Síntese de porfirinas a partir do ácido delta-aminolevulínico (ALA)	—	100%
Hemólise	—	100%
Catalase	+	100%
Oxidase	+	100%
ONPG (Beta-galactosidase)	—	100%
Ácido de glicose	+	100%
Gás de glicose	—	100%
Ácido de sacarose	—	100%
Ácido de lactose	—	100%
Ácido de xilose	+	99,8%
Ácido de manitol	—	100%

TABELA I

Resultados numéricos e percentuais dos biotipos de H. influenzae isolados de LCR no período de 1977 a 1990. IAL. São Paulo. SP.

Ano	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	Total	
Biotipo																
I	Nº	4	31	24	31	29	43	53	57	108	84	65	69	80	31	709
	%	100	88,6	70,6	67,4	69,1	58,9	63,1	77,0	76,1	77,1	66,4	71,8	68,4	67,4	70,9
II	Nº		4	10	15	13	29	31	16	32	22	29	24	35	15	275
	%		11,4	29,4	32,6	30,9	39,7	36,9	21,6	22,5	20,2	29,6	25,0	29,9	32,6	27,5
outros (III,IV,V)	Nº					1		1	2	3	4	3	2		16	
	%					1,4		1,4	1,4	2,7	4,0	3,2	1,7		1,6	
TOTAL	nº	4	35	34	46	42	73	84	74	142	109	98	96	117	46	1000
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

TABELA II

Frequência dos sorotipos de H. influenzae estudados

ANO	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	Total	
Sorotipo																
a	Nº								2	1	2	1			6	
	%								1,4	0,9	2,1	1,1			0,6	
b	Nº	4	35	34	46	42	72	84	73	139	106	95	91	115	45	981
	%	100	100	100	100	100	98,6	100	100	98,6	99,1	97,9	98,9	100	100	99,3
c	Nº					1									1	
	%					1,4									0,1	
Total de cepas encapsuladas		4	35	34	46	42	73	84	73	141	107	97	92	115	45	988
NT	Nº							1	1	2	1	4	2	1	12	
Total de cepas estudadas		4	35	34	46	42	73	84	74	142	109	98	96	117	46	1000

NT = não tipável

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Haemophilus influenzae causa várias doenças invasivas, das quais a meningite é uma das mais graves, e se constitui em uma grande ameaça à saúde, em todo o mundo. Nos Estados Unidos, Finlândia e Suécia, *H. influenzae* tipo *b* tem sido o agente causal mais freqüente das meningites bacterianas^{20,23}. Dentre as amostras de LCR dos casos suspeitos de meningite bacteriana processadas nesta Seção de Bacteriologia, *H. influenzae* tem aparecido como o agente prevalente. Exceção foi observada quando da epidemia por *Neisseria meningitidis*, sorogrupo C e A, de 1972 a 1978, e mais recentemente, a partir de 1987, com prevalência maior de *N. meningitidis* sorogrupo B.

O gênero *Haemophilus* se caracterizou por apresentar morfologia de bacilos Gram negativos, geralmente pleomórficos, e por produzir prova de satelitismo positiva, não se desenvolvendo em meios de cultura simples, como o ágar comum. A prova de satelitismo é, no entanto, presuntiva e quando não é tecnicamente bem realizada pode levar a falsas interpretações. Isso ocorre quando o inóculo é muito carregado e há crescimento em toda a área semeada. Nos casos duvidosos, a prova foi repetida com inóculo diluído. Observamos que o melhor resultado é obtido com um inóculo correspondente a uma diluição a 1:100 partindo de uma suspensão com turbidês equivalente a 0,5 da escala de McFarland, e aplicada sempre em ágar-sangue de carneiro¹².

A habilidade ou não de sintetizar porfirinas a partir do ácido delta-aminolevulínico (ALA) é um dado de grande importância. O emprego do ALA na determinação da dependência do fator X vem esclarecer a dúvida que surge quando o *Haemophilus influenzae* cresce em presença somente do fator V em meio base PRB. Demonstra-se assim a notória dificuldade de se produzir um meio de cultura livre de traços do fator X ou porção férrica do sangue, e também que, mesmo exercendo-se o preparo do inóculo com cuidados extremos, o fator X é freqüentemente carregado do ágar chocolate. Além da impureza dos meios de cultura, a condição parcial de anaerobiose que se forma em meio líquido como o PRB faz com que esta bactéria se torne menos exigente ou independente deste fator.

líquido como o PRB faz com que esta bactéria se torne menos exigente ou independente deste fator.

A importância de realizar provas bioquímicas para a caracterização das espécies do gênero *Haemophilus* foi salientada por Kilian¹¹, quando cita Hable, Logan & Washington (1971), que, trabalhando com líquido cefalorraquidiano, reportam o *H. parainfluenzae* como causa de meningite, porém seus resultados foram baseados somente na dependência dos fatores V e X. Estas provas são consideradas insuficientes para definir as espécies deste gênero.

A correlação entre biotipo e sorotipo foi discutida por Zinnemann²⁴ e Kilian¹⁴, tendo o primeiro relatado não haver associação, porém com base em um pequeno número de cepas dos biotipos III e IV não encapsuladas. O segundo refere-se a uma relação entre biotipo de *H. influenzae*, fonte de isolamento e sorotipo capsular.

Neste trabalho a maioria das cepas pertenceram ao biotipo I (70,9%) e ao sorotipo *b* (99,3%), concordando com diferentes autores^{14,22,23}. Das cepas do biotipo I, 99,4% apresentaram um antígeno capsular do sorotipo *b* (0,2% do sorotipo *a* e 0,4% não eram encapsuladas), verificação esta que parece indicar uma relação entre biotipos e sorotipos, conforme citado por Kilian¹⁴. Das cepas não tipáveis, 8 pertenceram aos biotipos II, III e IV (70%) e 4 ao biotipo I (30%) (Tabelas I e II). Estas cepas não encapsuladas foram isoladas, na sua maioria (58,3%) de amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes na faixa etária acima de 8 anos. Com relação à cepa do sorotipo *c*, foi isolada de LCR de um paciente com 17 anos de idade, e quanto às cepas do sorotipo *a*, estas foram isoladas de pacientes com idades que variaram de 2 meses a 12 anos. No entanto, nossos dados são insuficientes para relacionar os achados desses sorotipos menos freqüentes à idade do paciente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Augusto d'Escragnole Taunay pela inestimável orientação recebida na elaboração deste trabalho, e a Maria Cristina de Cunto Brandileone pelo fornecimento dos antissoros.

RIALA6/715

LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. — *Haemophilus influenzae* isolated from cerebrospinal fluid — Frequency of biotypes and serotypes, Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51(1/2),87-91, 1991.

ABSTRACT: *Haemophilus influenzae* are causal agents of human diseases, chiefly meningitis, all over the world. In the examinations of CSF in the laboratory of Bacteriology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, this bacterium was the one most frequently isolated, together with *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. For the characterization of *H. influenzae* species and biotypes definition, biochemical tests were performed, as well as serotyping of the capsulated strains. From 1977 to 1990, 1.000 strains of *H. influenzae* isolated from

CSF were studied. Among biotypes, the most frequent was I (70,9%) and the next one was II (27,5%). Concerning serotypes, *b* was the most prevalent (99,3%), but type *a* (0,6%) and *c* (0,1%) were also found.

DESCRIPTORS: *Haemophilus influenzae*; *H. influenzae*, biotypes and serotypes; *H. influenzae meningitis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE AÇÕES BÁSICAS DE SAÚDE. DIVISÃO NACIONAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA — Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1986. 49 p. (Série A: Normas e Manuais Técnicos, 32).
- BUCK, L.L. & DOUGLAS, G.W. — Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type *e*. *J. clin. Microbiol.* 4:381, 1976.
- BÜLOW, P. — The ONPG Test in diagnostic bacteriology. I. Methodological investigations. *Acta. path. microbiol. scand.* 60: 376-386, 1964.
- DRAYNA, C.J. — *Haemophilus influenzae* type *c* meningitis with sepsis. *JAMA*, 244:1476, 1980.
- FINEGOLD, S.M. & MARTIN, W.J. — *Diagnostic microbiology*, 6th ed. St. Louis, Mosby, 1982. p. 655-656.
- GRATTEN, M. — *Haemophilus influenzae* biotype VII. *J. clin. Microbiol.* 18: 1015-1016, 1983.
- HARRELL, W.K.; ASHWORTH, H.; BRITT, L.E.; GEORGE, J.R.; GRAY Jr, S.B.; GREEN, J.H.; GROSS, H. & JOHNSON, J.E. — *Procedural manual of production of bacterial, fungal and parasitic reagents*. Atlanta, CDC, 1970. p. 18-20.
- HOLLIS, D.G.; SOTTNEK, F.O.; BROWN, W.J. & WEAVER, R.E. — Use of the rapid fermentation test in determining carbohydrate reactions of fastidious bacteria in clinical laboratories. *J. clin. Microbiol.*, 12: 620-623, 1980.
- KAMME, C. — Biotypes of capsulated and non-capsulated *Haemophilus influenzae*. Correlation between biotypes and β -lactamase production. *Acta. path. microbiol. scand.* Sect. B, 88:261-264, 1980.
- KILIAN, M. — A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. The porphyrin test. *Acta. path. microbiol. scand.*, Sect. B, 82:835-842, 1974.
- KILIAN, M. — A taxonomic study of the Genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. gen. Microbiol.*, 93:9-62, 1976.
- KILIAN, M. — The Genus *Haemophilus*, In: STARR, M.P.; SOLP, H.; TRÜPER, H.G.; HALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G., ed. — *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. New York. Springer-Verlag, 1981, vol. 2, p. 1371-1382.
- KILIAN, M. & BIBERSTEIN, E.L. — Genus II, *Haemophilus*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. — *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, c 1984, vol. 1, p. 558-569.
- KILIAN, M. — *Haemophilus*, In: BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; HERRMANN, K.L.; ISENBERG, H.D. & SHADOMY, H.J., ed. — *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. Washington, American Society for Microbiology, 1991. p. 463-470.
- LEE, I.M.L.; PESSÔA, G.V.A.; ESPER, M.R.N.R.; MELLE, C.E.A. & SIMONSEN, V. — Importância da pesquisa da Beta-galactosidase na caracterização laboratorial da *Neisseria lactamica*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):23-27, 1978.
- MARCHAL, N.; BOURDON, J.L. & RICHARD, C.L. — *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Paris, Doin., 1982. p. 295-299.
- MILIEUX ET RÉACTIFS DE LABORATOIRE PASTEUR. Paris, Institut Pasteur. 1978. p. 186-187.
- MÖLLER, V. — Simplified tests for some aminoacid decarboxylases and for the arginine dehydro-lases system. *Acta. path. microbiol. scand.* 36:158-172, 1955.
- PITTMAN, M. — Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J. Exper. Med.* 53:471-492, 1931.
- ROBBINS, J.B. et alii. — *Haemophilus influenzae* type *b* infections. In: GERMANIER, R., ed., — *Bacterial vaccines*. Orlando, Academic Press, 1984. p. 298-316.
- SHISHIDO, H. & MATSUMOTO, K. — Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type *e* biotype 4. *J. clin. Microbiol.* 10:926-927, 1979.
- SOTTNEK, F.O. & ALBRITTON, W.L. — *Haemophilus influenzae* biotype VIII. *J. clin. Microbiol.* 20:815-816, 1984.
- WENGER, J.D.; HIGHTOWER, W.L.; FACKLAM, R.R.; GAVENTA, S.; BROOME, C. V. & BACTERIAL MENINGITIS STUDY GROUP — Bacterial meningitis in the United States, 1986: Report of a multistate surveillance study. *J. Infect. Dis.*, 162:1316-1323, 1990.
- ZINNEMANN, K. — Newer knowledge in classification, taxonomy and pathogenicity of species in the Genus *Haemophilus*. A critical Review. *Zbl. Bakt. Hyg.*, I, Abt. Orig. A. 247: 248-258, 1980.

Recebido para publicação em 5 de abril de 1991.

