

BACTÉRIAS DO GÊNERO *HAEMOPHILUS* ISOLADAS DE SANGUE E
IDENTIFICADAS NA SEÇÃO DE BACTERIOLOGIA, INSTITUTO ADOLFO LUTZ,
NO PERÍODO DE 1979 A 1991*

Maria de Fátima Paiva VIEIRA**
Braz MEZZACAPA NETO**
Ilka Maria LANDGRAF**
Sônia Shizue Okita BUSCHINELLI**
Maria Lucia Cecconi TONDELLA**
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE**
Vera Simonsen Dias VIEIRA**

RIALA6/767

VIEIRA, M.F.P.; MEZZACAPA NETO, B.; LANDGRAF, I.M.; BUSCHINELLI, S.S.O.;
TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. - Bactérias do
gênero *Haemophilus* isoladas de sangue, na Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo
Lutz no período de 1979 a 1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 88-92, 1994.

RESUMO: De culturas de sangue foram isoladas e identificadas 267 amostras bacterianas do gênero *Haemophilus*, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo no período de 1979 a 1991. *H. influenzae* correspondeu a 91,0% (243 cepas) da totalidade dos casos com a predominância do biotipo I (65,9%) seguido dos biotipos II (29,6%), III (2,1%), IV (0,8%) e V (1,6%). Na quase totalidade das cepas o sorotipo b prevaleceu (93,0%) e apenas uma amostra bacteriana foi caracterizada como sorotipo f. *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* ocorreu em 7,5% dos casos, tendo as 20 cepas isoladas apresentado as características fenotípicas e genotípicas do agente etiológico da Febre Purpúrica Brasileira. O *H. parainfluenzae* foi identificado em 4 amostras, 2 delas pertencendo ao biotipo I, outras aos biotipos II e V. Considerando o número de amostras de sangue de cada paciente, pôde-se observar que em 29,5% dos casos o agente etiológico não se desenvolveu na totalidade das mesmas, indicando a necessidade de amostras múltiplas de sangue para o diagnóstico de doenças invasivas.

DESCRIPTORIOS: *Haemophilus*; *H. influenzae*, biotipos e sorotipos; *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*; *H. parainfluenzae*; hemocultura.

INTRODUÇÃO

A hemocultura tem grande importância no diagnóstico laboratorial de doenças bacterianas invasivas como também no controle de infecções em ambientes hospitalares¹³. Nas infecções bacterêmicas simples as enterobactérias tem prevalecido em nosso meio, seguidas de cocos Gram-positivos, de bacilos Gram-negativos aeróbios estritos, de *Haemophilus* e de diplococos Gram-negativos².

O *Haemophilus influenzae*, principalmente o sorotipo b, tem sido apontado como uma das principais causas de doença invasiva em crianças com idade inferior a 5 anos¹⁸. É também o agente etiológico mais frequente em meningites bacterianas¹⁵, o que conduz à indicação da cultura de sangue para diagnóstico etiológico¹.

O *H. aegyptius*, agente responsável por conjuntivites purulentas vem, desde 1984, ocasionando uma

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

doença sistêmica em crianças menores de 10 anos, denominada Febre Purpúrica Brasileira (FPB), em várias regiões do País. Este microrganismo foi posteriormente caracterizado como *H.influenzae* biogrupo aegyptius⁴, sendo o sangue a fonte principal para o seu isolamento e diagnóstico laboratorial⁹. Desta forma a hemocultura constitui-se, até o momento, no único método de confirmação do diagnóstico clínico, assumindo importância particularmente relevante quando se propõe a esclarecer o agente etiológico da FPB.

Considerando que diferentes espécies do gênero *Haemophilus* também podem provocar infecções sistêmicas, foi feito um estudo retrospectivo das bactérias deste gênero que puderam ser isoladas de cultura de amostras de sangue na Seção de Bacteriologia ou recebidas de hemocultura processadas em outros laboratórios, no período de 1979 a 1991.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 267 cepas de *Haemophilus* sp originadas de cultura de sangue de pacientes internados com a febre a esclarecer em vários hospitais da Rede Pública do Estado de São Paulo e outros Estados. Os frascos de cultura semeados ou as cepas já isoladas, foram enviadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Os meios de cultura empregados para as hemoculturas consistiram de caldo triptose soja (TSB) ou caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), acrescidos de sulfato de polianetol sódico (SPS) a 0,05%².

Os frascos foram semeados no momento da punção sanguínea, na proporção de 10% do meio de cultura, ou seja, 10 ml de sangue para 50 ml do meio de cultura, e levados à incubação a 35-37°C. Estes frascos de cultura semeados foram examinados macroscopicamente, diariamente, durante 7 dias para se evidenciar turvação. Havendo tais alterações, foi recolhida uma alíquota de material, asépticamente, através de seringa ou colecut BCB VENT/SVB UNIT (Difco) e realizado esfregaço corado pelo Gram, modificado por Hucker⁸. Dos frascos que permaneceram inalterados foram feitos subcultivos após 2 e 5 dias de incubação, em tubos contendo ágar chocolate constituído de base BHI acrescida de 10% de sangue estéril de cavalo ou coelho. Os tubos foram mantidos em estufa a 37°C em atmosfera de 5 a 10% de CO₂, durante 24-48 h, para confirmação de resultados negativos.

A ocorrência de crescimento bacteriano com presença de bacilos Gram negativos pleomórficos com morfologia de colônias semelhantes às apresentadas pelo gênero *Haemophilus* orientou para a realização da prova de satelitismo. A comprovação da presença

de *Haemophilus* levou à caracterização bioquímica e sorológica da cepa, segundo metodologia previamente descrita^{3,6,7,11,12,14}.

RESULTADOS

Das 267 cepas de *Haemophilus* sp, isoladas de sangue no período de 1979 a 1991, 243 (91,0%) foram caracterizadas como *H.influenzae*. Entre as cepas de *H.influenzae* houve maior ocorrência do biotipo I (65,9%) e do sorotipo b (93,0%). Um total de 11 cepas não apresentaram capsula (NT) e em 5 cepas não pôde ser realizada a soroglutinação (Tabela 1). Nesse mesmo período foram isoladas 20 (7,5%) cepas de *H.influenzae* biogrupo aegyptius, de pacientes com suspeita clínica de FPB. Estas cepas apresentaram resultados de provas bioquímicas compatíveis com a espécie e demonstraram reação de soroglutinação positiva com o antissoro policlonal. Outras 4 (1,5%) cepas foram definidas como *H.parainfluenzae* (Tabela 2) que apresentaram a capacidade de sintetizar a porfirina (ALA), fermentar a glicose (com produção de gás), e a sacarose po-

TABELA 1

Sorotipos e biotipos de 243 cepas de *H. influenzae* isoladas de sangue

Sorotipo	Biotipo					
	I Nº %	II Nº %	III Nº %	IV Nº %	V Nº %	Total Nº %
b	146	71	4	2	3	226 93,0
f	1	-	-	-	-	1 0,4
NT	8	1	1	-	1	11 4,5
NR	5	-	-	-	-	5 2,1
Total	160(65,9)	72(29,6)	5(2,1)	2(0,8)	4(1,6)	243 (100,0)

NT = não tipável
NR = não realizado

TABELA 2

Provas diferenciais que caracterizaram os biotipos das 4 cepas de *H. parainfluenzae* isoladas de sangue

	Biotipos							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ornitina-D	+	+	-	+	-	+	-	-
Urease	-	+	+	+	-	-	+	-
Triptofanase (Indol)	-	-	-	+	-	+	+	+
Total	2	1	0	0	1	0	0	4

+ = reação positiva
- = reação negativa

TABELA 3

Distribuição do número de amostras de hemocultura positivas para *haemophilus* sp de cada paciente, em relação ao número de amostras de hemocultura enviadas

Amostras Positivas	Total	Pacientes
1 ^a /1 ^b		42,6%
2/2		24,0%
3/3		3,9%
1/2		13,9%
1/3		10,9%
2/3		4,7%

a = N° de amostras de hemocultura positivas

b = N° de amostras de hemocultura enviadas

rém não desdobraram a xilose, lactose e manita.

Relacionando o número de amostras de hemoculturas positivas com o número de amostras enviadas de cada caso suspeito, pôde-se observar que em 70,5% dos casos o número de amostras enviadas correspondeu ao número de culturas positivas, entretanto para 29,5% dos casos clínicos nem todas as amostras recebidas puderam revelar o agente etiológico.

DISCUSSÃO

Das 267 cepas do gênero *Haemophilus* estudadas, foram identificadas espécies diferentes e todas tiveram o teste de satelitismo positivo. Desta forma pôde-se demonstrar que esta prova não contribui para definir a espécie. Este trabalho demonstrou a importância da caracterização das espécies do gênero *Haemophilus*, através de provas bioquímicas e enzimáticas, que contribuíram para a verificação de que *H.influenzae* foi a espécie predominante entre as estudadas sendo esse microrganismo um dos agentes mais frequentes de meningites bacterianas.

Embora *H.influenzae* biotipo I e o sorotipo b sejam os biotipos e sorotipos mais frequentemente isolados de cepas invasivas de *H.influenzae*, neste estudo foi também identificada uma cepa de *H.influenzae* do sorotipo f. Este sorotipo já tem sido isolado do sangue por outros autores como McGow-

an et alii¹⁶ que identificaram duas cepas do sorotipo f, Kamme¹⁰ que relatou a ocorrência de uma cepa e Wallace¹⁷ de 3 cepas provenientes do sangue de três pacientes com pneumonia.

Irino e col⁹, estudando 15 casos de FPB, dos quais materiais biológicos como sangue, líquido cefalorraquidiano, secreção de conjuntiva e orofaringe foram examinados, observaram que a cultura de sangue foi positiva em 80% dos casos, o que elege esse exame para o diagnóstico laboratorial dessa infecção.

A ocorrência de cepas de *H.parainfluenzae* nas culturas de sangue, como também já relatado por Brunn et alii³, comprova a importância de se complementar, com provas bioquímicas e enzimáticas, a observação de um satelitismo positivo para a definição da espécie do gênero *Haemophilus*.

Segundo Bone¹, "A frequência com que sítios múltiplos de infecção piogênica estão associados à meningite por *Haemophilus* em crianças com menos de 2 meses de idade comprova que cultura de sangue não é apenas útil, mas também uma investigação adicional necessária".

Este estudo, embora direcionado para caracterização das espécies do gênero *Haemophilus*, demonstrou a importância da cultura de sangue, em vista da ocorrência de positividade desses exames laboratoriais em 5 pacientes que tiveram também o LCR examinado, mas com resultados negativos (dados não demonstrados). De outros 62 pacientes com culturas positivas de sangue e de LCR, os resultados nos dois exames foram compatíveis para o mesmo biotipo e sorotipo de *H.influenzae*.

Segundo Koneman¹³, a obtenção de uma amostra de sangue para cultura, imediatamente antes de um pico febril, é ideal porque este é o período de maior concentração de microrganismos circulantes. No entanto como este pico não pode ser previsto, recomenda-se, geralmente, que as hemoculturas de rotina sejam obtidas de diferentes locais de punção venosa com, no mínimo, uma hora de diferença. Neste trabalho foi comprovada a importância dessa recomendação, pois em cerca de 29,5% dos casos a positividade da cultura não ocorreu em todas as amostras enviadas. Esta observação reforça a importância da recomendação de serem enviadas várias amostras de sangue de cada paciente, principalmente nas bacteriemias com febres intermitentes, possibilitando assim a maior probabilidade de obtenção de cultura positiva.

RIALA6/767

VIEIRA, M.F.P.; MEZZACAPA NETO, B.; LANDGRAF, I.M.; BUSCHINELLI, S.S.O.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. - Bacteria of the genus *Haemophilus* isolated from blood in the Section of Bacteriology, Instituto Adolfo Lutz in the period of 1979 to 1991. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2): 88-92, 1994.

ABSTRACT: From blood cultures, 267 strains of the *Haemophilus* genus were isolated and identified in the Seção de Bacteriologia of the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, in the period 1979 to 1991 *H. influenzae* accounted for 91,0% (243 strains) of the total cases, with biotype I (65,9%) predominating, followed by biotypes II (29,6%), III (2,1%), IV (0,8%), and V (1,6%). In most cases serotype b was predominant (93,0%), and only one strain was characterized as serotype f. *H. influenzae* biovar aegyptius occurred in 7,5% of the cases, having all the 20 isolated strains shown the phenotype and genotype characteristics of the etiologic agent of the Brazilian Purpuric Fever. *H. parainfluenzae* was identified in 4 of the strains, being two of biovar I, and one each of biovar II and V. Concerning the number of blood samples of every patient, it was noteworthy that in 29,5% of the cases, the etiologic agent did not develop in all of the samples, showing the meaning of multiple blood samples for the diagnosis of invasive diseases.

DESCRIPTORS: *Haemophilus*; *H. influenzae*, biotypes and serotypes; *H. influenzae* biovar aegyptius; *H. parainfluenzae*; blood culture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BONE, F.J. - Meningitis due to an unusual type of *Haemophilus influenzae*. *Scot. Med. J.*, 20:19-21, 1975.
2. BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.; VIEIRA, V.S.D.; & PESSOA, G.V.A. - Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):115-123, 1984.
3. BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D.; TONDELLA, M.L.C.; SACCHI, C.T.; LANDGRAF, I.M.; ZANELLA, R.C.; BIBB, W.F.; IRINO, K. & GRUPO DE ESTUDO DA FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA - Febre Purpúrica Brasileira. Caracterização rápida das cepas invasoras de *Haemophilus aegyptius*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 31 (4):221-227, 1989.
4. BRENNER, D.J.; MAYER, L.W.; CARLONE, G.M.; HARRISON, L.H.; BIBB, W.F.; BRANDILEONE, M.C.C.; SOTTNEK, F.O.; IRINO, K.; REEVES, M.W.; SWENSON, J.M.; BERKNESS, K.A.; WEYANT, R.S.; BERKLEY, S.F.; WOODS, T.C.; STEIGERWALT, A.G.; GRIMONT, P.A.D.; MCKINNEY, R.M.; FLEMING, D.W.; GHEESLING, L.L.; COOKSEY, R.C.; ARKO, R.J.; BROOME, C.V. and The Brazilian Purpuric Fever Study Group - Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian Purpuric Fever. *J. Clin. Microbiol.*, 26:1524-1534, 1988.
5. BRUUN, B.; CHRISTENSEN, J.J. & KILIAN, M. - Bacteremia caused by a beta-lactamase producing *Haemophilus parainfluenzae* strain of a new biotype. *Acta. path. microbiol. immunol. scand.* Sect. B, 92:135-138, 1984.
6. CARLONE, G.M.; SOTTNEK, F.O. & PLIKAYTIS, B.D. - Comparison of outer membrane protein and biochemical profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* biotype III. *J. Clin. Microbiol.*, 22(5):708-713, 1985.
7. DAVIS, D.J.; PITTMAN, M.; & GRIFFITS, J.J. - Hemagglutination by Koch-Weeks Bacillus (*Haemophilus aegyptius*). *J. Bacteriol.*, 59:427-431, 1950.
8. FINEGOLD, S.M. & MARTIN, W.J. - *Diagnostic Microbiology*, 6th ed. St. Louis, Mosby, 1982. p.655-656.
9. IRINO, K.; LEE, I.M.L.; KAKU, M.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; LEVY, C.E.; BERKLEY, S.E.; FLEMING, D.W.; SILVA, G.A.; & HARRISON, L. - Febre Purpúrica Brasileira: resultados preliminares da investigação etiológica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 29(3):174-177, 1987.
10. KAMME, C. - Biotypes of capsulated and non-capsulated *Haemophilus influenzae*. Correlation between biotypes and B-lactamase production. *Acta. path. microbiol. scand.* Sect. B, 88:261-264, 1980.
11. KILIAN, M. - A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. The porphyrin test. *Acta. path. microbiol. scand.* Sect. B., 82:835-842, 1974.
12. 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.
13. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. *Diagnostic microbiology*. 4th ed. Filadelfia, J.B. Lippincott CO, 1992, p. 94-100.

14. LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. - *Haemophilus influenzae* isolados de líquido cefalorraquidiano - Frequência dos biotipos e sorotipos. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, **51**:87-91, 1991.
15. LANDGRAF, I.M.; VIEIRA, M.F.P. - Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* from patients with meningitis in the city of São Paulo, Brazil. *J.clin.Microbiol.* **31**:743-745, 1993.
16. MCGOWAN Jr, J.E.; KLEIN, J.O.; BRATTON, L.; BARNES, M.W.; & FINLAND, M. - Meningitis and bacteremia due to *Haemophilus influenzae*: occurrence and mortality at Boston City Hospital in 12 selected years 1935-1972. *The J.Infect.Disease*, **130**:119-123, 1974.
17. WALLACE Jr, R.J.; MUSCHER, D.M.; MARTIN, R.P.; *Haemophilus influenzae pneumoniae* in adults. *Am.J.Med.* **64**:87-92, 1978.
18. WARD, J. - Prevention of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: lesson from vaccine efficacy trials. *Vaccine*. **9**(Suppl.) S1-S48, 1991.

Recebido para publicação: 29.03.94