

Doença Invasiva por *Haemophilus influenzae* na Criança: Estudo Multicêntrico Nacional 2010-2014

Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Children: National Multicentre Study 2010-2014

José Gonçalo Marques¹, Florbela Cunha², Célia Bettencourt³, Paula Lavado³, Grupo de estudo da doença invasiva a *Haemophilus influenzae* na criança

1. Unidade de Infecçiology, Serviço de Pediatria Médica, Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE, Lisboa, Portugal

2. Serviço de Pediatria, Hospital de Vila Franca de Xira, Vila Franca de Xira, Portugal

3. Laboratório Nacional de Referência de *Haemophilus influenzae*, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Acta Pediatr Port 2016;47:21-9

Resumo

Introdução: Uma parceria Sociedade de Infecçiology Pediátrica / Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge propôs-se avaliar a epidemiologia, fatores de risco, clínica, serotipos e suscetibilidade aos antibióticos da doença invasiva a *Haemophilus influenzae* nas crianças, em Portugal.

Métodos: Estudo prospetivo descritivo multicêntrico, entre 1 de janeiro de 2010 e 30 de junho de 2014 (54 meses). Cada estirpe foi enviada ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge acompanhada de inquérito clínico. Foi pesquisada produção de β -lactamase, resistência antibiótica, cápsula e serotipo.

Resultados: Foram analisadas 38 estirpes (18 hospitalares) isoladas em hemocultura (34), liquor (três) e líquido articular (uma). A incidência global foi 0,45/100000. Identificaram-se 25 (65,7%) *Haemophilus influenzae* não-capsulados, nove (23,7%) serotipo b (seis falências vacinais), duas (5,3%) serotipo a e duas (5,3%) serotipo f. As idades variaram entre 1 mês e 15 anos (lactentes 44,7%; 5 anos ou mais 26,3%); 23,7% tinham patologia prévia. As apresentações clínicas foram pneumonia (13), meningite (cinco), bacteriemia (cinco), infeção respiratória alta (quatro), bronquiolite (três) sépsis sem foco (três), artrite (duas), celulite periorbitária (uma), celulite (uma), epiglote (uma). A meningite foi manifestação de 33,3% das infeções por serotipo b e de 4% das devidas a *Haemophilus influenzae* não-capsulados ($p < 0,05$). As infeções respiratórias altas bacteriémicas predominaram acima dos 5 anos (30% vs 3,6%; $p < 0,05$). Registaram-se sequelas neurológicas num caso (2,6%) e um óbito (2,6%). Verificou-se produção de β -lactamase em 7,9% e resistência à cefuroxima em 18,4%. Sem resistências a amoxicilina / clavulanato, cefotaxima, rifampicina.

Discussão: A doença invasiva por *Haemophilus influenzae* atingiu diferentes grupos etários, predominando nos lactentes. As estirpes mais prevalentes foram de *Haemophilus influenzae* não-capsulados, causando maioritariamente bacteriemia e manifestações respiratórias. O serotipo b manteve-se em circulação sendo responsável por dois casos / ano.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae*/isolamento & purificação; *Haemophilus influenzae* tipo b; Infeções por *Haemophilus*; Criança

Abstract

Introduction: A partnership between the Society for Paediatric Infectious Diseases and the National Institute of Health aimed to assess invasive *Haemophilus influenzae* disease in Portuguese children, with regard to clinical presentation, risk factors, epidemiology, serotypes and antibiotic susceptibility.

Methods: In this prospective multicentre study from 1 January 2010 to 30 June 2014 (54 months), *H. influenzae* strains were sent to the National Institute of Health with a clinical report. β -lactamase production was determined with nitrocefin, antibiotic resistance was assessed by microdilution assay and serotyping was performed by polymerase chain reaction.

Results: Thirty-eight strains, from 18 hospitals, were isolated in blood (34), cerebrospinal fluid (three) and synovial fluid (one). The overall incidence was 0.45/100 000.

We identified 25 (65.7%) cases of non-encapsulated *Haemophilus influenzae*, nine (23.7%) serotype b (six vaccine failures), two (5.3%) serotype a, and two (5.3%) serotype f. The children's ages ranged from 1 month to 15 years (44.7% infants, 26.3% aged ≥ 5 years); 23.7% had previous disease. The clinical presentations were pneumonia (13), meningitis (five), occult bacteraemia (five), upper respiratory infection (four), bronchiolitis (three) sepsis (three), arthritis (two), periorbital cellulitis (one), cellulitis (one), and epiglottitis (one). Serotype b was more often associated with meningitis than non-encapsulated *H. influenzae* (33.3% vs 4%, $p < 0.05$). Upper respiratory infections predominated over the age of five (30% vs 3.6%; $p < 0.05$). One child had neurological sequelae (2.6%) and one died (2.6%). β -lactamase producers accounted for 7.9% of strains and 18.4% were resistant to cefuroxime. There was no resistance to amoxicillin/clavulanate, cefotaxime or rifampicin.

Discussion: Different age groups were affected, with predominance in infants. Non-encapsulated *H. influenzae* was responsible for most cases of invasive disease and respiratory symptoms were predominant. Serotype b remains in circulation and was responsible for two cases/year.

Keywords: *Haemophilus influenzae*/isolation & purification; *Haemophilus* infections; *Haemophilus influenzae* type b; Child

Introdução

Haemophilus influenzae (*H. influenzae*) é responsável por infeções invasivas como meningite, septicemia, celulite ou artrite séptica e por infeções não invasivas do trato respiratório, com maior repercussão em idade pediátrica.^{1,2}

Algumas estirpes de *H. influenzae* são capsuladas e podem ser divididas em seis serotipos (a-f) com base nos polissacáridos capsulares.³ A presença de cápsula, em especial o serotipo b (Hib), tem sido associada a uma maior virulência.^{1,2} Hib era responsável por mais de 90% da doença invasiva por *H. influenzae* antes da vacinação universal com a vacina conjugada, que tem elevada eficácia na redução da infeção e da colonização.⁴⁻⁶

Em Portugal, a vacina está disponível desde 1994, tendo sido incluída no Programa Nacional de Vacinação (PNV) em 2000. À semelhança do que sucedeu noutros países, as estirpes não-b, predominantemente as não capsuladas (HiNC), tornaram-se as principais responsáveis pela doença invasiva por *H. influenzae*.^{1,2,7,8}

Por outro lado, o número de indivíduos potencialmente suscetíveis a estas infeções tem vindo a aumentar, através do maior número de doentes sob terapêutica imunossupressora e do prolongamento da sobrevivência de pacientes com diversas formas de imunodeficiência.⁹

Tal como com outras espécies bacterianas, o aumento da resistência aos antibióticos das estirpes de *H. influenzae* constitui um problema preocupante em todo o mundo.⁸ O mecanismo mais comum de resistência à ampicilina é a produção da enzima β -lactamase tipo TEM-1, codificada por genes veiculados por plasmídeos.¹⁰ Contudo, têm sido isoladas com uma frequência crescente estirpes de *H. influenzae* resistentes à ampicilina sem produção de β -lactamase (BLNAR- β -lactamase negativa ampicilina resistente). O mecanismo envolvido é a alteração da proteína de ligação às penicilinas (PBP3), condicionada por mutações do gene *ftsI*.^{8,11,12} Estas estirpes apresentam também diminuição da suscetibilidade a outros antibióticos β -lactâmicos com alvos

semelhantes, como a amoxicilina / ácido clavulânico, cefaclor e cefuroxima, tendo-se observado valores de concentração inibitória mínima (CIM) mais elevados para algumas cefalosporinas de terceira geração.¹³⁻¹⁵

O presente estudo resulta de uma parceria entre a Sociedade de Infecçologia Pediátrica / Sociedade Portuguesa de Pediatria e o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Foi constituído um grupo de estudo, designado por GEDIHIC (Grupo de Estudo da Doença Invasiva por *Haemophilus influenzae* na Criança) que compreende uma equipa clínica de pediatras representantes dos serviços de pediatria dos hospitais do país que aderiram ao projeto; uma equipa laboratorial, constituída pelos representantes dos serviços de patologia clínica desses hospitais; uma equipa do laboratório de referência do departamento de doenças infecciosas do INSA – Laboratório Nacional de Referência de *H. influenzae*.

Constituíram objetivos deste projeto a avaliação da doença invasiva por *H. influenzae* em idade pediátrica, nomeadamente quanto a incidência, repercussão clínica, fatores de risco, serotipos infetantes e perfis de suscetibilidade aos antibióticos.

Métodos

Estudo prospetivo, descritivo, observacional, envolvendo o período entre 1 de janeiro de 2010 e 30 de junho de 2014 (54 meses).

Definição de caso

Considerou-se infeção invasiva sempre que foi isolado ou foram detetados ácidos nucleicos de *H. influenzae* num produto normalmente estéril, independentemente das manifestações clínicas associadas.¹⁶

Nos casos que cumpriam os critérios acima mencionados, e após obtenção do consentimento dos prestadores de cuidados, foi preenchido um inquérito clínico e epidemiológico pela equipa de pediatria assistente incluindo a idade, doses de vacina anti-Hib, antecedentes relevantes, manifestações clínicas (meningite, sépsis, bacteriemia oculta, pneumonia, artrite, outra) e evolução. As estirpes isoladas foram enviadas ao laboratório de referência. As técnicas laboratoriais que serviram de base a este projeto foram realizadas no INSA – Laboratório Nacional de Referência de *H. influenzae*.

Definição de falência vacinal

Considerou-se falência vacinal sempre que ocorreu doença invasiva por Hib mais de uma semana após pelo menos duas doses de vacina conjugada, administrada

nos primeiros 12 meses de vida, ou mais de duas semanas após uma dose de vacina administrada após os 12 meses de vida.^{17,18}

Caracterização do serotipo capsular

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído pelo método de fervura. A caracterização do serotipo capsular foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* e as condições previamente descritas.¹⁹

Determinação da suscetibilidade aos antibióticos

A produção de β -lactamase foi pesquisada pelo método colorimétrico, utilizando nitrocefina como substrato. A determinação da CIM (mg/L) foi realizada pelo método de microdiluição em placa (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA) para 11 antibióticos (ampicilina, amoxicilina / ácido clavulânico, cefuroxima, ceftriaxone, cefepime, meropenem, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, trimetoprim / sulfametoxazol e ciprofloxacina). Para a análise dos resultados foram utilizados os *breakpoints* recentemente preconizados pelo EUCAST.²⁰ Os controlos utilizados foram as estirpes de referência ATCC49247 (BLNAR: β -lactamase negativa, ampicilina resistente), ATCC10211 (BLNAS: β -lactamase negativa, ampicilina suscetível) e NCTC11315 (BLPAR- β -lactamase positiva, ampicilina resistente).

Análise estatística

Os dados foram analisados em SPSS®, versão 20, para Windows. Foi aplicado o teste exato de Fisher, com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A incidência foi calculada com base no número estimado de residentes pelo Instituto Nacional de Estatística, em Portugal.²¹

Resultados

Entre 1 janeiro de 2010 e 30 de junho de 2014 identificaram-se 38 doentes com doença invasiva por *H. influenzae*, notificados por 18 hospitais, com a seguinte distribuição:

- Região norte: 13 (34,2%),
- Região centro: quatro (10,5%),
- Região sul: 18 (47,4%),
- Ilhas: três (7,9%).

Foram isoladas 34 (89,5%) estirpes no sangue, três (7,9%) no líquido cefalorraquidiano e uma (2,6%) no líquido articular.

Identificaram-se 25 (65,7%) estirpes HiNC, nove (23,7%) Hib, duas (5,3%) *H. influenzae* tipo a e duas (5,3%) *H. influenzae* tipo f.

Durante o período do estudo a incidência global da doença invasiva por *H. influenzae* em crianças abaixo dos 18 anos foi de 0,45/100000. Abaixo de 1 e de 5 anos de idade foi, respetivamente, 3,7/100000 e 1,24/100000. Em crianças com idade igual ou superior a cinco anos a incidência foi 0,2/100000 (Fig. 1).

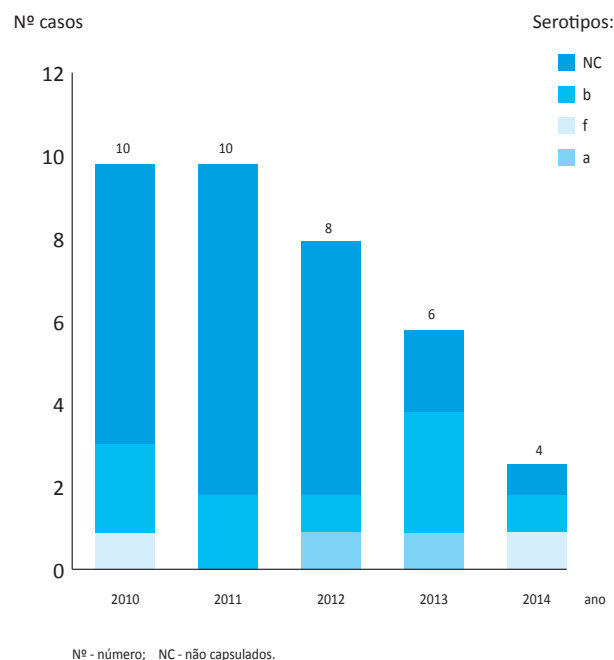


Figura 1. Distribuição por serotipo dos casos de doença invasiva por *H. influenzae* nos anos de 2010 a 2014 (n = 38).

Idade / sexo

As idades variaram entre 1 mês e 15 anos, com média de 3,2 anos e mediana de 16 meses.

Os lactentes corresponderam a 44,7% (17) da amostra, tendo sete menos de 6 meses de idade, dois dos quais com 1 mês; 26,3% (10) tinham idade igual ou superior a 5 anos (Fig. 2).

Os rapazes foram os mais atingidos (30; 79%).

Apresentação clínica

Os diagnósticos clínicos foram, por ordem decrescente, pneumonia (13; 34,2%), meningite (cinco; 13,2%), bacteriemia oculta (cinco, 13,2%), infecção respiratória alta (sinusite ou não especificada) (quatro; 10,5%), bronquiolite (três; 7,9%), sépsis sem foco (três; 7,9%), artrite (dois; 5,3%), celulite periorbitária (um; 2,6%), epiglote (um; 2,6%) e celulite no local de inserção de cateter venoso central (um; 2,6%). Todas as crianças com meningite, exceto uma, se apresentaram com quadro de sépsis.

Comparando o grupo de idade inferior com o de idade igual ou superior a 5 anos, os quadros de sépsis

e meningite ocorreram todos no primeiro e as infeções respiratórias altas bacteriémicas predominaram no segundo (3,6% vs 30%; $p < 0,05$). Não se encontrou relação significativa noutros diagnósticos.

Em 5/34 (15%) doentes foi necessário tratamento em cuidados intensivos, com uma duração média de nove dias (3-22), correspondendo aos diagnósticos de meningite (três, dois com sépsis), epiglote (um) e bronquiolite com insuficiência respiratória (um).

Verificou-se um óbito (2,6%) por epiglote e um caso com sequelas neurológicas (2,6%) de meningite com enfarte cerebral, ambos por Hib. As outras crianças evoluíram favoravelmente.

Em nove (23,7%) crianças havia história de patologia prévia, nomeadamente: drepanocitose (uma), doença pulmonar crónica / asma (duas) cardiopatia congénita (uma), hemofilia (uma), terapêutica imunossupressora (uma), ex-prematuro de 28 semanas (uma), atraso do desenvolvimento psicomotor (uma) e não especificado (uma). Não houve diferença significativa por serotipos.

Dez em 11 (91%) lactentes em que se obteve resposta a esta questão tiveram aleitamento materno.

Abaixo dos 5 anos de idade, três em 28 crianças tinham irmãos com idade inferior a 5 anos e 10 em 22 crianças frequentavam infantário.

Estirpes HiNC e capsuladas não-b

Os casos por estirpes HiNC foram 25 (65,7%), com uma mediana de idades de 18 meses (1-144). As principais patologias foram pneumonia (10; 40%), bacteriemia

oculta (quatro; 16%), bacteriemia associada a infeção respiratória alta (três; 12%) ou a bronquiolite (três; 12%), dos quais um coinfectado por vírus sincicial respiratório; sépsis (duas; 8%) e meningite (uma; 4%). Dois doentes (8%) necessitaram de cuidados intensivos.

Quatro infeções foram causadas por estirpes capsuladas não-b: duas artrites sépticas por *H. influenzae* serotipo a, uma meningite com sépsis e uma bacteriemia oculta por *H. influenzae* serotipo f.

Serotipo b

A doença invasiva por Hib atingiu 23,7% das crianças, com uma mediana de idade de 12 meses (3-180). As formas de apresentação clínica foram meningite (três), pneumonia (três) e um caso respetivamente de epiglote, sépsis sem foco e infeção respiratória alta. Três doentes necessitaram de cuidados intensivos (33,3%). Comparativamente com as estirpes HiNC houve uma diferença estatisticamente significativa apenas no diagnóstico de meningite (33,3% vs 4%; $p < 0,05$).

Só uma criança não tinha sido vacinada e duas tinham vacinação incompleta. Seis dos nove casos corresponderam a falência vacinal - cinco crianças previamente saudáveis e uma com atraso de desenvolvimento psicomotor. Dois doentes tinham quatro doses da vacina anti-Hib e quatro tinham três doses, respetivamente com 9 meses, 13 meses, 14 meses e 10 anos de idade (neste não era perceptível a data da última toma). As apresentações clínicas foram pneumonia (três), sépsis sem foco (uma), meningite (uma) e epiglote (uma). A mediana das idades foi 14 meses (9-180).

Na Tabela 1 encontram-se resumidos os dados clínicos por serotipo.

Suscetibilidade aos antibióticos e produção de β -lactamase

A determinação da suscetibilidade aos antibióticos foi realizada para todos os 38 isolados (Tabela 2). Observaram-se as seguintes resistências: 7,9% (três) a ampicilina, por produção de β -lactamase; 15,8% (seis) a cefuroxima (incluindo os de suscetibilidade intermédia, com CIM 2 mg/L); 2,6% (uma) a cefepima e 21,1% (oito) a trimetoprim / sulfametoxazol. Em três estirpes, não produtoras de β -lactamase, verificou-se uma CIM mais elevada para ampicilina (1 mg/L) e também para outros antibióticos β -lactâmicos. Não se observaram resistências à amoxicilina / ácido clavulânico, cefotaxima, meropenem, ciprofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol e rifampicina.

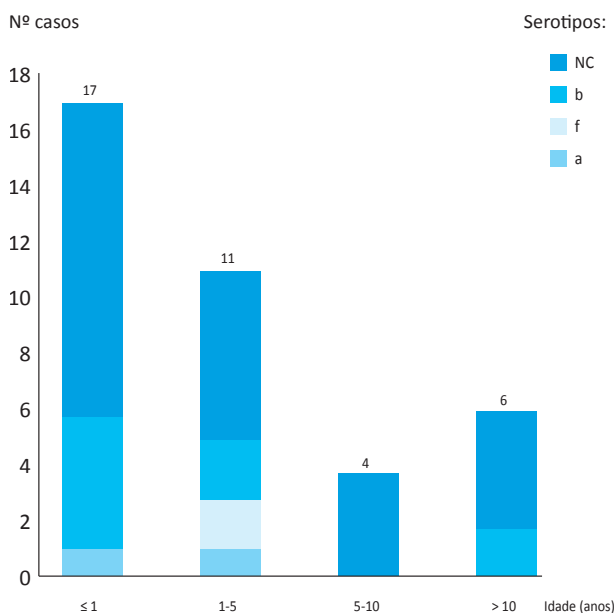


Figura 2. Distribuição por serotipo dos casos de doença invasiva por *H. influenzae* em cada escalão etário ($n = 38$).

Tabela 1. Caracterização clínica por serotipos de *H. influenzae* - 2010 a 2014 (n = 38)

Número de casos	Tipo b n = 9	Não capsulados n = 25	Capsulados não-b n = 4
Mediana da idade (min-máx) (meses)	12 (3-180)	18 (1-144)	21,5 (12-24)
Sexo masculino	8/9 (88,9%)	19/25 (76%)	3/4 (75%)
Diagnósticos			
Pneumonia	3/9 (33,3%)	10/25 (40%)	
Sépsis sem foco	1/9 (11,1%)	2/25 (8%)	
Meningite	3/9(33,3%)*	1/25 (4%)	1/4 (25%)
Bacteriemia		4/25 (16%)	1/4 (25%)
Artrite séptica			2/4 (50%)
Epiglotite	1/9 (11,1%)		
Celulite peri-orbitária		1/25 (4%)	
Sinusopatia / IRA	1/9 (11,1%)	3/25 (12%)	
Bronquiolite		3/25 (12%)	
Celulite CVC		1/25(4%)	
Sem doença prévia	6/9 (66,6%)	20/25(80%)	3/4 (75%)
Prognóstico			
Cura	7/9 (77,8%)	25/25(100%)	4/4 (100%)
Sequelas	1/9 (11,1%)	0/25 (0%)	0/4(0%)

CVC - Catéter venoso central; Hib - *Haemophilus influenzae* tipo b; HINC - *Haemophilus influenzae* não capsulados; IRA - infeções respiratórias altas; min - mínimo; max - máximo.

* Comparação de Hib com HINC, p < 0,05.

Tabela 2. Susceptibilidade aos antibióticos de 38 isolados invasivos de *H. influenzae*

Antibióticos	CIM (mg/L)			Classe de suscetibilidade*		
	CIM50	CIM90	Intervalo CIM	%S	%I	%R
Ampicilina	0,25	> 8	0,06 - > 8	92,1	-	7,9
Amoxicilina - ácido clavulânico	≤ 0,5	2	≤ 0,25-2	100	-	-
Cefuroxima	0,5	2	≤ 0,25-8	84,2%	13,2%	2,6%
Cefotaxima	≤ 0,03	0,06	≤ 0,03-0,12	100%	-	-
Cefepime	0,12	0,25	≤ 0,12-0,5	97,4%	-	2,6%
Meropenem	≤ 0,06	0,12	≤ 0,06-0,25	100%	-	-
Ciprofloxacina	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	100%	-	-
Cloranfenicol	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100%	-	-
Tetraciclina	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100%	-	-
Trimetoprim - Sulfametoxazole	≤ 0,25	2	≤ 0,25-2	78,9%	-	21,1%
Rifampicina	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	100%	-	-

CIM - concentração mínima inibitória; I - intermédia; R - resistente; S - suscetível.

*A classe de susceptibilidade foi determinada de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST.²⁰

Discussão

Os resultados obtidos em 54 meses do estudo confirmam a diminuição da incidência de doença invasiva por *H. influenzae* em idade pediátrica. Nos dados coligidos das Unidades de Infecçiologyia Pediátrica do Hospital Dona Estefânia e do Hospital de Santa Maria, num período de 15 anos anterior à introdução da vacina em Portugal (1980-1994), só na região de Lisboa registaram-se 304 casos de meningite por *H. influenzae* (Marques JG, comunicação pessoal, dados não publicados). Num estudo retrospectivo multicêntrico nacional referente a três anos (1992-1994) houve 200 casos de doença invasiva por *H. influenzae*, registando-se um óbito. A incidência calculada nas crianças de idade inferior a 5 anos foi 19,6/100000 e, abaixo dos 12 meses de idade, de 50,7/100000. A patologia mais frequente foi a meningite, com uma incidência de 14,01/100000 e 39,11/100000 respetivamente abaixo dos 5 e 1 anos de idade.²² Estes números ultrapassam largamente a realidade atual, graças à manutenção de uma elevada taxa de vacinação infantil anti-Hib há mais de uma década. No presente estudo, a doença invasiva por *H. influenzae* atingiu diferentes grupos etários pediátricos, mantendo-se o predomínio abaixo dos 5 anos de idade e a maior taxa de incidência nos primeiros 12 meses de vida. O predomínio do sexo masculino está de acordo com o que está descrito na literatura.²³

O aleitamento materno e a frequência de infantário não parecem ter influenciado a probabilidade de infeção, mas nem o desenho do estudo nem o número de casos permitem estabelecer a sua significância.

Não se registaram casos de sépsis neonatal precoce, que têm sido descritos noutros países, sobretudo em prematuros e associados a estirpes HiNC.^{8,23,24}

Comparativamente com um período misto, que envolveu seis anos pré vacina anti-Hib e seis anos com vacinação por prescrição médica extra PNV, observou-se um decréscimo nas infeções invasivas por Hib, 23,7% (9/38) vs 65,6% (42/64), tornando-se as estirpes HiNC as principais responsáveis pelos casos de infeção invasiva (65,7% vs 34%).²⁵ Estes resultados estão em concordância com o que se passou noutros países que introduziram a vacinação anti-Hib.^{7,24,26,27}

A utilização de vacinas conjugadas anti-Hib e anti-pneumocócica está referida como possivelmente associada a um aumento da colonização da nasofaringe por HiNC, condicionando quadros de sinusopatia crónica e potenciais focos para doença invasiva.^{8,23}

Este estudo sugere a emergência de serotipos não-b (duas estirpes serotipo a e duas de serotipo f), que também têm sido descritos noutros países europeus como causa de doença invasiva.^{7,28,29} Em Portugal, a primeira

estirpe capsulada não b (serotipo f) foi isolada em 2001, num idoso.²⁵ Está igualmente descrito no nosso país um caso de meningite num latente por serotipo d.³⁰

As infeções por HiNC manifestaram-se predominantemente por pneumonia e bacteriemia sem foco ou associada a infeção respiratória alta, registando-se um predomínio estatisticamente significativo de meningite associada a Hib *versus* HiNC, em concordância com outras séries.^{7,23,24,31} Os quadros de infeção respiratória alta com bacteriemia foram significativamente mais frequentes no grupo com idade igual ou superior a 5 anos e, como esperado, as crianças mais novas foram as mais vulneráveis a quadros de meningite e sépsis. Os dois casos com infeção por serotipo a manifestaram-se com artrite séptica, mas não está descrita uma associação preferencial deste serotipo a infeções articulares.⁷

Na sua maioria, a doença invasiva surgiu em crianças previamente saudáveis, incluindo aquelas em que ocorreu falência vacinal. Não foi avaliada a investigação efetuada em cada centro para exclusão de eventual imunodeficiência. A falência vacinal é rara e está descrita noutros países que introduziram a vacinação universal, ocorrendo também maioritariamente em crianças sem fatores predisponentes conhecidos (imunodeficiência primária ou secundária, prematuridade, síndrome de Down ou outra).³¹⁻³⁵ A experiência do Reino Unido evidenciou a importância de um reforço vacinal após os 12 meses,^{17,18} mas em Portugal este reforço esteve sempre contemplado no PNV. Nos cinco casos ocorridos acima dos 12 meses de idade, dois tinham as quatro doses, dois ainda não tinham a idade estabelecida no PNV para o reforço vacinal e um tinha três doses, mas não se sabe se a terceira foi acima do ano de idade. As apresentações clínicas mais comuns nestes casos são a meningite e a epigloteite,³¹⁻³⁴ parecendo haver uma maior frequência de pneumonia relativamente a doentes não vacinados com doença invasiva por Hib.³¹ Na pequena série de seis falências vacinais ocorreram estas três manifestações, com predomínio da pneumonia.

A produção de β -lactamase foi observada em 7,9% (3/38) dos *H. influenzae* isolados, um valor significativamente mais baixo do que o observado entre 1989-2001 (19/64; 29,7%).¹⁵

A resistência a ampicilina não mediada por β -lactamases está descrita no nosso país desde 1992, normalmente associada a infeções respiratórias.^{36,37} Neste estudo, foram identificadas três (7,9%) estirpes com CIM para ampicilina de 1 mg/L, nas quais se deve considerar a possível presença de mutação genética associada a resistência por um mecanismo não enzimático (gBLNAR), nomeadamente por alteração da proteína de ligação PBP3.¹⁰ Estas mutações conferem também um aumento da CIM

para outros antibióticos β -lactâmicos, podendo atingir a resistência com tradução clínica. É provavelmente por este mecanismo, não investigado neste trabalho, que se estabelece a resistência a cefuroxima. A diminuição da suscetibilidade a cefuroxima também se verificou em Espanha, onde apenas 79,2% das estirpes eram suscetíveis, comparativamente a 84,2% deste estudo.³⁸ Com estes valores, até conhecimento do estudo de resistências não se deve considerar a cefuroxima na primeira linha de tratamento da doença invasiva.

Relativamente a outros antibióticos e ao período 1989-2001, verificou-se um declínio na resistência à tetraciclina (0% vs 12,5%) e ao cloranfenicol (0% vs 4,7%),²⁵ que pode ser atribuído à menor incidência do serotipo b, dado que estas estirpes estavam associadas a um fenótipo de multirresistência, e ainda à atual inexistência de formulação oral de cloranfenicol e à restrição de prescrição de tetraciclinas abaixo dos 8 anos de idade. Em conclusão, embora a incidência de doença invasiva por *H. influenzae* tenha diminuído significativamente na idade pediátrica, não desapareceu com a introdução da vacina anti-Hib.

Atualmente as estirpes invasivas são sobretudo HiNC e as manifestações respiratórias são predominantes, correspondendo no global a 60% dos casos, o que realça a importância do pedido de hemocultura neste contexto. A utilização das cefalosporinas de terceira geração para as infeções do sistema nervoso central e a associação amoxicilina / clavulanato nas outras doenças invasivas, são uma boa opção em Portugal.

Por seu lado, o Hib continua a causar doença invasiva numa média de dois casos por ano, sendo responsável pelos dois quadros com pior evolução clínica. Este estudo alerta para o facto de o Hib se manter em circulação na população pediátrica, justificando a manutenção do esquema vacinal com início aos 2 meses de idade. Os dois casos ocorridos aos 13 e 14 meses com primovacinação completa são insuficientes para obrigar a uma antecipação do reforço vacinal, atualmente previsto para os 18 meses de idade, mas são um alerta a ser tido

em conta na vigilância epidemiológica futura.

A possibilidade de um recrudescimento da infeção invasiva por *H. influenzae*, por estirpes HiNC ou por outros serotipos, constitui uma verdadeira ameaça em saúde pública, pelo que deve ser monitorizada em termos clínicos, microbiológicos e de resistência aos antibióticos.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

Fontes de Financiamento

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Proteção de Pessoas e Animais

Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Confidencialidade dos Dados

Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. David Lito pelo apoio prestado na análise estatística e cálculo das incidências.

Apresentações e Prémios

Grande Prémio Sociedade Portuguesa de Pediatria 2014.

Correspondência

José Gonçalo Marques
jgmarques7@gmail.com

Recebido: 14/04/2015

Aceite: 06/08/2015

Apêndice

Grupo de Estudo da Doença Invasiva por *Haemophilus influenzae* na Criança

Coordenadores: José Gonçalo Marques, Florbela Cunha, Paula Lavado.

Célia Betencourt, Arminda Maria Jorge, Maria Conceição Faria, Carla Zilhão, Laura Marques, Conceição Casanova, Cristiana Pereira, Fernando Fonseca, Cláudia Monteiro, Mariana Bettencourt, Fernanda Rodrigues, Henrique Oliveira, Catarina Sousa, Graciete Pinheiro, Sara Diogo Santos, Adília Vicente, Conceição Neves, Graça Seves, Rosa Bento, Maria João Virtuoso, Rita Fonseca, Luís Lito, Carla Cruz, Adriana Coutinho, Paula Correia, Luísa Sancho, Cristina Freitas, Teresa Afonso,

O QUE ESTE ESTUDO TRAZ DE NOVO

- A doença invasiva por *H. influenzae* predomina abaixo dos 5 anos mas atinge todos os grupos etários pediátricos, na sua maioria crianças previamente saudáveis.
- Atualmente as estirpes invasivas predominantes são NC, mas Hib continua a causar cerca de 2 casos de doença invasiva por ano.
- As infeções respiratórias foram responsáveis por 60% dos casos, sendo o diagnóstico estabelecido pela hemocultura.
- A taxa de resistência a ampicilina é < 10% e mantém-se a susceptibilidade total a amoxicilina/clavulanato, cefotaxime e rifampicina.

Ana Filipa Nunes, Ana Maria Queiroz, José Diogo, Maria Manuel Flores, Paula Reis, Elmano Ramalheira, Maria Manuel Zarcos, Sofia Lima, Raquel Marta, Manuela Henriques, Ana Maria Jesus, Sofia Maia Aroso, Margarida Tavares, Bonito Vitor, Isabel Cunha, Alberta Faustino,

Álvaro Sousa, Margarida Rodrigues, Idalina Maciel, Sandra Vieira, Elisabete Santos, Alexandra Costa, Filomena Martins, Pedro Flores, Maria Favila Menezes, João Calado Nunes, Diana Moreira, Ana Neto.

Referências

1. Watt J, Wolfson L, O'Brien K, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: Global estimates. *Lancet* 2009;374:903-11.
2. Rubach M, Bender J, Mottice S, Hanson K, Weng HY, Korgenski K, et al. Increasing incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, Utah, USA. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1645-50.
3. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med* 1931;53:471-92.
4. Peltola H. *Haemophilus influenzae* in the post-vaccination era. *Lancet* 1993;341: 864-5.
5. Booy R, Hodgson S, Carpenter L, Mayon-White R, Slack M, MacFarlane JA, et al. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine PRP-T. *Lancet* 1994;344:362-6.
6. Madore DV. Impact of immunization on *Haemophilus influenzae* type b disease. *Infect Agents Dis* 1996;5:8-20.
7. Ladhani S, Slack MP, Heath PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME. Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis* 2010;16:455-63.
8. Van Eldere J, Slack M, Ladhani S, Cripps A. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *Lancet Infect Dis* 2014;14:1281-92.
9. Kristensen K. *Haemophilus influenzae* type b. Epidemiology of invasive diseases: Antimicrobial resistance of clinical isolates, and response to a conjugate vaccine in selected risk groups. *Dan Med Bull* 1999;46:303-12.
10. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:368-89.
11. Clairoux N, Picard M, Brochu A, Rousseau N, Gourde P, Beauchamp, et al. Molecular basis of the non-beta-lactamase-mediated resistance to beta-lactamase antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1504-13.
12. Bajanca-Lavado MP, Simões AS, Betencourt CR, Sá-Leão R. Characteristics of *Haemophilus influenzae* invasive isolates from Portugal following routine childhood vaccination against *H. influenzae* serotype b (2002-2010). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:603-10.
13. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1693-9.
14. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2208-18.
15. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* 2003;9:39-46.
16. Decisão de Execução da Comissão L262/1. Jornal Oficial da União Europeia, 27 de setembro de 2012. Altera a Decisão 2002/253/CE que estabelece definições de casos para a notificação de doenças transmissíveis à rede comunitária ao abrigo da Decisão n.o 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.
17. Heath P, Booy R, Griffiths H, Clutterbuck E, Azzopardi H, Slack MP, et al. Clinical and immunological risk factors associated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine failure in childhood. *Clin Infect Dis* 2000;31:973-80.
18. Ladhani S, Heath PT, Slack MP, McIntyre PB, Diez-Domingo J, Campos J, et al. *Haemophilus influenzae* serotype b conjugate vaccine failure in twelve countries with established national childhood immunization programmes. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:948-54.
19. Falla T, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2382-6.
20. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0 [consultado em 22 de março de 2015]. Disponível em: <http://www.eucast.org>
21. Instituto Nacional de Estatística. Estimativas de população residente em Portugal (1993-2013) [consultado em 22 de março de 2015]. Disponível em: <http://www.ine.pt/>
22. Dias PG. Vacinas anti-hepatite B e anti-*Haemophilus influenzae* tipo b. *Acta Med Port* 1997;10:129-38.
23. St. Geme III JW. *Haemophilus influenzae*. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, editors. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.p.899-905.
24. Livorsi D, Macneil JR, Cohn AC, Bareta J, Zansky S, Petit S, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* in the United States, 1999-2008: Epidemiology and outcomes. *J Infect* 2012;65:496-504.
25. Bajanca P, Caniça M. Emergence of noncapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). *J Clin Microbiol* 2004;42:807-10.
26. Giufrè M, Cardines R, Caporali MG, Accogli M, D'Ancona F, Cerquetti M. Ten years of Hib vaccination in Italy: Prevalence of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* among invasive isolates and the possible impact on antibiotic resistance. *Vaccine* 2011;29:3857-62.

27. Kastrin T, Paragi M, Kolman J, Cizman M, Kraigher A, Gubina M. Characterisation of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Slovenia, 1993-2008. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:661-8.
28. Campos J, Hernando M, Román F, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J, et al. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J Clin Microbiol* 2004;42:524-9.
29. Ulanova M, Tsang SW. *Haemophilus influenzae* serotype a as a cause of serious invasive infections. *Lancet Infect Dis* 2014;14:70-82.
30. Calado R, Betencourt C, Gonçalves H, Cristino N, Calhau P, Bajanca-Lavado MP. Complicated meningitis caused by a rare serotype of *Haemophilus influenzae* in Portugal. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;69:111-3.
31. 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: A nationwide prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 2014;33:477-81.
32. Heath P, McVernon J. The UK Hib vaccine experience. *Arch Dis Child* 2002; 86:396-9.
33. Chandler D, Connor M, Breen D. Hib epiglottitis despite fully vaccinated status. *Br J Gen Pract* 2009;59:597-8.
34. Ulanova M, Tsang RS. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: Changing epidemiology and host-parasite interactions in the 21st century. *Infect Genet Evol* 2009;9:594-605.
35. Kalies H, Siedler A, Gröndahl B, Grote V, Milde-Busch A, von Kries R. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany: Impact of non-type b serotypes in the post-vaccine era. *BMC Infect Dis* 2009;9:45.
36. Melo-Cristino J, Fernandes ML, Serrano N. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microb Drug Resist* 2001;7:33-8.
37. Bajanca-Lavado MP, Casin I, Vaz Pato M. Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal. The Multicentre study group. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:615-25.
38. García-Cobos S, Arroyo M, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Lara N, Oteo J, et al. Isolates of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* causing invasive infections in Spain remain susceptible to cefotaxime and imipenem. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:111-6.