

FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA, VIRULÊNCIA EM MODELO ANIMAL DO *HAEMOPHILUS AEGYPTIUS* (*H. INFLUENZAE* BIOGRUPO AEGYPTIUS)

M.C.C. BRANDILEONE (1), R.C. ZANELLA (1), M.L.C. TONDELLA (1), L. GHEESLING (2), V.S.D. VIEIRA (1),
G.M. CARLONE (2) & GRUPO DE ESTUDO DA FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA (3)

RESUMO

Febre Purpúrica Brasileira (FPB) é causada por cepas invasoras de *Haemophilus aegyptius* (*H. influenzae* biogrupo aegyptius, Hae). Estas cepas invasoras foram diferenciadas de cepas de Hae associadas apenas a conjuntivites (cepas não invasoras) através de marcadores moleculares específicos. Modelo de ratos recém nascidos depletados de complemento foi aplicado ao estudo de cepas de Hae, associadas e não associadas a FPB, com o objetivo de se caracterizar seus potenciais de virulência. Com dose infectante de 10^5 células, as cepas invasoras causaram bacteriemia em 80-100% dos ratos inoculados, e a magnitude da bacteriemia variou de $10^{2,5 \pm 0,49}$ a $> 10^{4,69}$ ufc/ml de sangue. Usando a mesma dose infectante as cepas controles não causaram bacteriemia frequente (0 a 50%) e a magnitude variou de 0 a $10^{3,69 \pm 0,53}$ ufc/ml de sangue. As doses infectantes capazes de causar bacteriemia em 50% dos ratos inoculados (DB50%) para as cepas invasoras de Hae variaram de $< 10^3$ a $10^{4,2}$ bactérias, enquanto que para as cepas não invasoras, as DB50% variaram de $10^{6,2}$ a $> 10^{7,3}$ bactérias. Imunização passiva com antissoros produzidos com cepas invasoras demonstrou que os ratos foram protegidos das bacteriemias causadas pelas cepas homólogas, mas não da infecção causada pela cepa heteróloga. Comparando a bacteriemia causada pelas cepas de Hae com a bacteriemia causada pelo *H. influenzae b*, cepa Egan (Hib), foi demonstrado o maior potencial de invasibilidade de Hib. Este modelo animal demonstrou ser útil para esclarecer o maior potencial de virulência das cepas invasoras de Hae.

UNITERMOS: Febre Purpúrica Brasileira; *Haemophilus aegyptius*; *Haemophilus*; Virulência; Modelo animal.

INTRODUÇÃO

A Febre Purpúrica Brasileira (FPB) vem ocorrendo desde 1984 em diferentes Estados do Brasil^{4,5,6,15,16,31,33,40,41}, manifestando-se de forma epidêmica, ou em casos esporádicos, sempre com alta letalidade. É uma doença pediátrica infecciosa que se caracteriza clinicamente por início súbito, febre alta, vômitos e dor abdominal, que pode evoluir para invasão sistêmica e óbito^{15,16}.

O quadro sistêmico é precedido por conjuntivite purulenta, também de ocorrência geralmente epidêmica, causado por *Haemophilus aegyptius*¹⁸.

A etiologia da FPB foi estabelecida em 1986, com o isolamento de *H. aegyptius* (Hae) de culturas de sangue e ou liquor, de casos de doença^{5,18}.

Até a descrição da FPB, Hae sempre foi causador de conjuntivite purulenta, nunca associado a doença sistêmica^{13,14,21}.

(1) Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

(2) Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

(3) Membros do Grupo de Estudo da Febre Purpúrica Brasileira - Kinue Irino, Carmo Elias de Andrade Melles e Eliseu Alves Waldman (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo); Graziela Almeida da Silva (Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo); Lee H. Harrison, Bradley A. Perkins e Claire V. Broome (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA).

Endereço para correspondência: Maria Cristina de Cunto Brandileone, Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-000 São Paulo SP, Brasil.

Não se tem relatos da ocorrência de epidemias de FPB em outros países, apenas a descrição de dois casos isolados com quadro clínico compatível com a doença, ocorridos em 1986, na Austrália, dos quais foi isolado Hae de culturas de sangue^{20,43}.

Após o estabelecimento da etiologia da FPB, estudos laboratoriais utilizando diferentes métodos de marcação molecular puderam caracterizar as cepas de Hae associadas a FPB (cepas invasoras de Hae) diferenciando-as das cepas causadoras apenas de conjuntivite, (cepas não invasoras de Hae)^{7,17,19}.

Em Pradópolis^{7,9,19}, Estado de São Paulo, onde ocorreram casos não confirmados de FPB, foram isoladas cepas de pacientes com conjuntivite, que apresentaram apenas algumas das características moleculares que definem as cepas invasoras de Hae. Estas cepas foram chamadas de cepas com características intermediárias entre cepas invasoras e cepas não invasoras de Hae.

As duas cepas de Hae isoladas de culturas de sangue de dois casos esporádicos de FPB ocorridos na Austrália não possuem as características das cepas invasoras isoladas no Brasil^{19,39}.

TONDELLA et al.⁴², em 1991, isolaram o Hae de moscas dos gêneros *Hippelates* e *Liohippelates*, durante a epidemia de conjuntivite e FPB, no Estado de Mato Grosso. Portanto, é muito provável que estes insetos sejam importantes na transmissão da conjuntivite durante o curso de infecção ativa.

Apesar de muitos estudos estarem sendo realizados sobre a FPB, pouco ainda se sabe sobre a patogênese da doença e as características de virulência destas cepas invasoras^{2,8}. Para serem assim designadas, essas cepas especiais de Hae devem ser dotadas de mecanismos de virulência diferenciados, que juntamente com as qualidades do hospedeiro, possibilitem as manifestações clínicas da FPB. Não está claro até o momento, se o fenótipo das cepas invasoras de Hae possui estes determinantes de virulência únicos, que permitam causar a doença invasiva. Assim, o estabelecimento de um modelo animal adequado poderia evidenciar a maior capacidade invasora de Hae sob a ação dos fatores do hospedeiro, identificar outras cepas invasoras, como também, ajudar a elucidar aspectos relativos a patogenidade.

Este trabalho procura verificar a possível aplicação do modelo de ratos recém nascidos

padronizado por SMITH et al.³⁸, em 1973, no estudo da virulência das diferentes cepas de Hae avaliada pela determinação de suas capacidades em produzir bacteriemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas Bacterianas. A descrição prévia das características fenotípicas e genotípicas de algumas cepas de *Haemophilus sp.* foi realizada por BRENNER et al.⁷. As cepas utilizadas foram:

- 4 cepas de Hae invasoras brasileiras, isoladas de culturas de sangue ou liquor cefalorraquidiano (LCR) de casos de FPB, números 218/86 (F-3029), 320/86 (F-3040), 144/89, 677/90,
- 1 cepa de Hae invasora brasileira, isolada de cultura de secreção conjuntival de um caso de conjuntivite, número 292/86 (F-3050),
- 1 cepa de Hae invasora australiana, isolada de cultura de sangue de caso de FPB, número 349,
- 1 cepa de Hae invasora brasileira, isolada de mosca do gênero *Hippelates* ou *Liohippelates* coletada dos olhos de criança com conjuntivite purulenta, durante a epidemia de FPB em Mato Grosso, em 1990, número 378/89,
- 5 cepas de Hae não invasoras, isoladas de secreções conjuntivais de casos com conjuntivite, ocorridas na mesma época e local das epidemias de FPB no Estado de São Paulo, números IGC (F-2065), 3GC (F-2066), 55/86 (F-3043), 272/86 (F-3117), 434/90,
- 1 cepa de Hae com características intermediárias entre cepas invasoras e não invasoras, isolada de caso de conjuntivite em Pradópolis, São Paulo, número 21/87 (F-4936),
- 1 cepa padrão ATCC 11116 de Hae, originalmente isolada da secreção conjuntival de paciente com conjuntivite,
- 1 cepa de *H. influenzae* tipo b (Hib), cepa Eagan, originalmente isolada de LCR de paciente com meningite, nos Estados Unidos da América.

Antes da realização dos ensaios experimentais, todas as cepas bacterianas foram inoculadas via intraperitoneal (IP) em ratos de 5-6 dias de idade, a fim de exaltar a sua virulência³⁷. Após passagem em animal, as cepas foram mantidas em sangue desfibrinado de coelho, e mantidas a -70°C.

Animais. Ratas albinas "out-bred", Sprague-Dawley, prenhas foram alimentadas "ad libitum". Os ratos recém nascidos com 3 a 4 dias de idade, crias procedentes de diferentes "mães" foram misturados e selecionados pelo peso (6-7 g), e redistribuídos ao acaso em grupos de 11 animais por "mãe", não necessariamente as mesmas. Estes animais foram utilizados nos sucessivos experimentos de bacteriemia e proteção, após atingirem 5-6 dias de idade (9-10 g).

Doses Bacterianas Infectantes. Culturas das cepas em caldo BHI suplementado com Dinucleotídio Adenina Nicotinamida (NAD) e Hemina (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) foram incubadas a 37°C com agitação a 100 rpm até a fase exponencial de crescimento. Os caldos foram centrifugados e o sedimento foi ressuspenso em 5 ml de tampão fosfato pH 7,2 acrescido de 1% de gelatina (Difco). A suspensão bacteriana foi ajustada para diluições de 10^8 até 10^4 células por ml. Um volume de 0,1 ml destas suspensões bacterianas foi inoculado em cada animal, correspondendo as respectivas doses infectantes de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 células por animal. Todo o preparo das suspensões bacterianas foi realizado em banho de gelo. Como controle das doses bacterianas infectantes, foram feitas sementeiras destas em placas de ágar BHI chocolate 10%. O número de colônias foi quantificado e calculado o número de unidades formadoras de colônias (ufc) de cada suspensão bacteriana.

Bacteriemia Experimental em Ratos Recém Nascidos. Os ensaios de bacteriemia experimental foram realizados segundo a metodologia de SMITH et al.³⁸. Os ratos recém nascidos com 5 a 6 dias de idade foram inoculados IP com 0,1 ml (300 unidades por quilograma de peso corpóreo) de fator veneno, purificado da cobra *Naja Naja* (CoVF, DiaMex, Miami, USA), no máximo 3 horas antes da inoculação da dose bacteriana infectante, para depleção do complemento¹¹. A inoculação da dose infectante foi feita via IP, sendo aplicado 0,1 ml da suspensão bacteriana. Para cada suspensão bacteriana, 10 ratos foram inoculados sendo mantido apenas 1 rato como controle da inocuidade do CoVF. A sangria dos animais foi feita em duplicata pela veia caudal, 24 horas após a inoculação da dose infectante sendo a cultura realizada em

placa de ágar chocolate. Após crescimento bacteriano, o número de colônias das placas de sangria foi contado e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias (ufc) por ml de sangue. Foi considerada bacteriemia a detecção de qualquer colônia de *Haemophilus sp.* nas placas. A intensidade da bacteriemia foi avaliada pela média geométrica da ufc por ml. (\log_{10} das ufc por ml de sangue) dos animais inoculados.

Antissoros. Foram utilizados soros hiperimunes anti-Hae, cepas 218/86 e 349, produzidos em coelhos, conforme a metodologia descrita^{1,3}. Os soros foram diluídos em tampão fosfato (PBS) e titulados pelo método de aglutinação em lâmina com as cepas homólogas e heterólogas determinando-se assim o título aglutinante.

Imunização Passiva Contra Bacteriemia. Soros hiperimunes e soro normal de coelho, em volume de 0,1 ml, inativados a 56°C por 30 minutos e diluídos em PBS, a 1:10, foram injetados via sub-cutânea (SC), no dorso dos ratos com 5 dias de idade (8-9 g), depletados de complemento, 4 a 6 horas antes da inoculação da dose bacteriana infectante. A dose infectante de 10^5 células foi escolhida por causar bacteriemia constante e por ser sub-letal para os animais. Os animais foram sangrados após 24 horas da inoculação da dose infectante.

Métodos Estatísticos. Para todas as cepas bacterianas estudadas foi calculada a dose infectante capaz de causar bacteriemia em 50% dos ratos inoculados (DB 50%). O cálculo foi realizado pelo método de REED & MUENCH³². As cepas invasoras e as cepas não invasoras foram comparadas através do teste de Mann-Whitney (comparação de 2 amostras, teste não paramétrico). A associação entre frequência de bacteriemia e proteção conferida pelos antissoros foi avaliada pelo teste X^2 para uma tabela de contingência 2x2. O nível de significância adotado nos testes foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Doses Bacterianas Infectantes. As doses bacterianas das cepas invasoras de Hae capazes de infectar ratos depletados de complemento foram de 10^2 a 10^7 células. Com 10^2 células poucos animais ficaram bacteriêmicos e com 10^8

células ocorreram mortes. Com as cepas não invasoras, a faixa de doses infectantes considerada foi de 10^4 a 10^7 células, porém, poucos animais ficaram bacteriêmicos mesmo com a inoculação de 10^7 células. Não foi possível observar bacteriemia em ratos não depletados de complemento, mesmo com doses infectantes de 10^5 a 10^7 células.

Bacteriemia Experimental. Nos ensaios de bacteriemia experimental comparamos a frequência de ratos bacteriêmicos inoculados com as diferentes cepas de *Haemophilus sp.*, em várias doses infectantes, conforme mostra a tabela 1.

O número de ratos bacteriêmicos inoculados com as cepas invasoras de Hae com as doses infectantes de 10^3 , 10^4 e 10^5 células foi semelhante para as diferentes cepas invasoras.

As cepas de Hae não invasoras não causaram bacteriemia marcante mesmo com as doses infectantes mais elevadas. Com a dose de 10^7 células, somente a cepa não invasora 272/86 causou bacteriemia frequente nos ratos inoculados.

A cepa invasora de Hae, 378/89, isolada de mosca, e a cepa 21/87, com características

intermediárias, causaram bacteriemia semelhante as outras cepas de Hae invasoras.

A cepa Hib causou bacteriemia em 100% dos ratos inoculados, mesmo com a menor dose infectante de 10^3 células.

A frequência relativa de bacteriemia das diferentes cepas na dose de 10^5 células demonstra que as cepas de Hae invasoras causaram bacteriemia em 80 a 100% dos ratos inoculados, em contraste com as cepas não invasoras cuja porcentagem de bacteriemia variou de 0 a 50% dos ratos inoculados, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0035$). A cepa isolada em Pradópolis, 21/87, causou 86% de bacteriemia (tabela 1).

Magnitude de Bacteriemia. O número de bactérias viáveis recuperadas do sangue dos animais inoculados com a dose infectante de 10^5 células, permitiu quantificar 4 níveis de bacteriemia distintos, para as diferentes cepas de *Haemophilus sp.* (tabela 2):

¹) Ratos bacteriêmicos cujo número de colônias recuperadas do sangue nas placas de

TABELA 1
Relação entre o nº de ratos bacteriêmicos e o nº total de ratos inoculados com diferentes cepas de *Haemophilus sp.*, em várias doses infectantes

Cepas Bacterianas	Dose Infectante (Nº de células)					
	10^2	10^3	10^4	10^5 (%)	10^6	10^7
Invasoras*						
218/86	ND***	6/10	8/10	10/10 (100)	ND	ND
320/86	ND	2/10	5/10	10/10 (100)	ND	ND
144/89	ND	7/10	8/10	9/9 (100)	8/10	8/10
349	ND	6/6	6/8	8/8 (100)	ND	ND
677/90	2/10	5/10	6/9	10/10 (100)	ND	ND
378/89	ND	3/10	7/10	8/10 (80)	ND	ND
Não Invasoras*						
1GC	ND	ND	ND	2/11 (18)	0/10	4/10
3GC	ND	ND	ND	0/10 (0)	1/9	0/8
55/86	ND	ND	ND	1/9 (11)	0/10	0/10
272/86	ND	ND	ND	5/10 (50)	9/19	9/10
434/90	ND	ND	1/9	1/9 (11)	1/8	4/10
ATCC 11116	ND	ND	ND	0/8 (0)	0/9	1/7
Intermediária*						
21/87	2/10	7/19	8/19	24/28 (86)	9/9	9/9
Hib** (cepa de Eagan)						
	ND	10/10	10/10	10/10 (100)	ND	ND

* *H. aegyptius*

** *H. influenzae* b

*** não identificado

TABELA 2
Nível de bacteriemia dos ratos inoculados com a dose infectante de 10^5 células causado pelas diferentes cepas de *Haemophilus sp.* estudadas

Cepas Bacterianas	Nível de Bacteriemia				Total de ratos
	Nº de ratos bacteriêmicos		morte	Nº de ratos não bacteriêmicos	
	log mag bact* > 4,69	log mag bact < 4,69			
Invasoras					
218/86	5	5 (3,63±1,19)**	0	0	10
320/86	7	2 (3,82±0,28)	1	0	10
144/89	6	3 (4,56±0,06)	0	0	9
349	0	6 (3,60±0,45)	2	0	8
677/90	1	9 (3,61±0,70)	0	0	10
378/89	0	8 (2,50±0,49)	0	2	10
Não Invasoras					
IGC	0	2 (2,19±0,27)	0	9	11
3GC	0	0 (0)	0	10	10
55/86	0	1 (2,47)	0	8	9
272/86	0	5 (3,69±0,53)	0	5	10
434/90	0	0 (0)	1	8	9
ATCC 11116	0	0 (0)	0	8	8
Intermediária					
21/87	2	21 (3,29±0,86)	1	4	28
Hib (cepa Eagan)					
	1	3 (3,76±0,86)	6	0	10

* Logarítmo da magnitude de bacteriemia calculado pela média geométrica (ufc/ml de sangue)

** média geométrica e desvio padrão das médias.

hemocultura foi acima do limite de detecção (500 colônias) resultando em uma magnitude de bacteriemia maior que $10^{4,69}$ ufc por ml,

2º) Ratos bacteriêmicos cuja magnitude de bacteriemia foi menor que $10^{4,69}$ ufc por ml de sangue,

3º) Ratos que morreram,

4º) Ratos não bacteriêmicos.

As cepas invasoras de Hae causaram bacteriemia em 55 dos 57 ratos inoculados (tabela 2). Em 19 ratos bacteriêmicos, a magnitude de bacteriemia foi maior que $10^{4,69}$ ufc por ml de sangue; em 33 ratos, a magnitude de bacteriemia foi possível de ser calculada variando entre $10^{2,5±0,49}$ e $10^{4,56±0,06}$ ufc por ml de sangue; 3 ratos morreram (cepas 349 e 320/86); apenas 2 ratos não apresentaram bacteriemia (cepa 378/89).

Por outro lado, as cepas não invasoras de Hae causaram bacteriemia em apenas 9 dos 57

ratos inoculados (tabela 2). Em 8 ratos bacteriêmicos, a magnitude de bacteriemia variou entre $10^{2,19±0,27}$ e $10^{3,69±0,53}$ ufc por ml de sangue; 1 rato morreu (cepa 434/90); 48 ratos não apresentaram bacteriemia.

A análise estatística demonstrou haver uma diferença significativa entre as magnitudes de bacteriemia causada pelas cepas invasoras e as não invasoras ($p = 0,034$). Entretanto, não houve diferença significativa quanto ao número de mortes ($p = 0,6$).

Na tabela 2, podemos observar que a cepa 21/87, com características intermediárias entre cepas invasoras e não invasoras, causou bacteriemia em 24 dos 28 ratos inoculados, sendo que em 21 deles, o número de ufc por ml de sangue foi de $10^{3,29±0,86}$; em 2 ratos, a magnitude de bacteriemia foi maior que $10^{4,69}$ ufc por ml de sangue; 1 rato morreu; apenas 4 ratos não apresentaram bacteriemia.

A magnitude de bacteriemia causada pelo Hib foi possível de ser calculada em apenas 3

TABELA 3

Dose infectante das várias cepas de *H. aegyptius* e *H. influenzae* b de diferentes procedências capaz de causar bacteriemia em 50% dos ratos inoculados (DB 50%*)

Cepas Bacterianas	Material Biológico - Procedência	log DB 50%
Invasoras**		
218/86	Sangue - Ribeirão Preto, SP, BR	3,2
320/86	Sangue - Serrana, SP, BR	3,9
144/89	Sangue - Alto Taguari, MT, BR	3,4
349	Sangue - AUS	< 3
677/90	Líquor - Valparaíso, SP, BR	3,7
378/89	Mosca - MT, BR	4,2
Não Invasora**		
1GC	Conjuntiva - Garça, SP, BR	> 7,2
3CC	Conjuntiva - Garça, SP, BR	> 7
55/86	Conjuntiva - Guariba, SP, BR	> 7,3
272/86	Conjuntiva - Ribeirão Preto, SP, BR	6,2
434/90	Conjuntiva - Nova Mutum, MT, BR	7
ATCC 11116	Conjuntiva - Texas, USA	> 7
Intermediária**		
21/87	Conjuntiva - Pradópolis, SP, BR	4,2
Hib*** (cepa Eagan)	Líquor - USA	< 3

* DB 50% calculada pelo método de REED & MUENCH

** *H. aegyptius*

*** *H. influenzae* b

ratos dos 10 bacteriêmicos, sendo de $10^{3,76 \pm 0,86}$ ufc por ml. Em 1 rato, a magnitude de bacteriemia foi maior que $10^{4,69}$ ufc por ml; 6 ratos morreram (tabela 2).

Dose Infectante Bacteriêmica 50% (DB 50%).

As DB 50%, vide tabela 3, para as cepas invasoras variaram de $< 10^3$ a $10^{4,2}$ células enquanto que, para as cepas não invasoras, as DB 50% variaram de $10^{6,2}$ a $> 10^7$ células; para a cepa 21/87 isolada em Pradópolis a DB 50% foi $10^{4,2}$ células e para o Hib foi $< 10^3$ células. Segundo as DB 50%, as cepas invasoras e não invasoras demonstraram ser significativamente diferentes ($p = 0,005$).

Proteção Contra Bacteriemia pela Imunização Passiva.

Os títulos do soro hiperimune de Hae produzido com a cepa 218/86 e testado pela técnica de soroaglutinação em lâmina com as cepas homólogas 218/86 e 144/89 (cepas invasoras brasileiras) e a cepa heteróloga 349 (cepa invasora australiana) foram de 1:512, 1:256 e negativo respectivamente; o título do antissor produzido com a cepa 349 e testado com a cepa homóloga 349 foi de 1:256 e com as cepas heterólogas 218/86 e 144/89 foram negativos.

A proteção conferida pelos soros hiperimunes contra a invasão bacteriana foi avaliada pela frequência de bacteriemia e está ilustrada na tabela 4.

O soro hiperimune anti-218/86 protegeu os ratos inoculados com as cepas homólogas 218/86 e 144/89 (100% de proteção contra as duas cepas); porém, não protegeu totalmente os animais inoculados contra a infecção causada pela cepa 349 (22% de proteção).

O soro hiperimune anti-349 protegeu os animais contra a infecção produzida pela cepa homóloga (90% de proteção), não ocorrendo o mesmo com as cepas, 218/86 e 144/89 (10% e 28% de proteção, respectivamente).

Em nenhum dos ensaios em que se utilizou o soro normal de coelho ocorreu proteção eficaz contra bacteriemia pelas diferentes cepas estudadas.

A análise dos dados demonstrou que os perfis de proteção dos ratos, conferidos pelos soros hiperimunes 218/86 e 349 contra as bacteriemias causadas pelas cepas 218/86 e 144/89, foram similares, estatisticamente não significante ($p = 0,71$). No entanto, os perfis de proteção conferidos por estes mesmos soros contra as bacteriemias causadas pelas cepas

TABELA 4

Proteção adquirida pelos ratos através da imunização passiva contra bacteriemia causada pelo *H. aegyptius* invasor

Soros de Coelhos	Cepa Infectante		
	218/86* Nº/T*** (%)	144/89* Nº/T (%)	349** Nº/T (%)
Normal	1/10 (10)	4/ 9 (44,5)	1/10 (40)
Hiperimune contra: 218/86	10/10 (100)	10/10 (100)	2/ 9 (22,2)
349	1/10 (10)	2/ 7 (28,6)	9/10 (90)

* Cepa invasora brasileira

** Cepa invasora australiana

*** Nº de ratos não bacteriêmicos pelo número total de ratos inoculados

218/86 e 349 foram diferentes, estatisticamente significativa ($p = 0,003$).

DISCUSSÃO

O quadro bacteriêmico causado pelas cepas capsuladas e não capsuladas de H_i^{12} e a característica sistêmica da FPB orientaram a escolha do modelo de ratos recém nascidos para o estudo do Hae. Utilizando-se o modelo padronizado para o $H_i^{23,25,30,36}$, a virulência das diferentes cepas de Hae foi avaliada pela determinação de suas capacidades em produzir bacteriemia.

Em experimentos iniciais, nos quais não tratamos os ratos com o CoVF, não foi observada bacteriemia, devido a eliminação rápida da bactéria da corrente circulatória ou a ocorrência de uma bacteriemia de baixa intensidade, mesmo com a inoculação das doses infectantes mais elevadas. Ratos depletados de complemento pelo CoVF, após 3 h da inoculação, são marcadamente deficientes em C_3 e moderadamente em C_5 , por 4 a 5 dias¹¹, tornando os animais mais susceptíveis a disseminação bacteriana pela via hematogênica.

Pela análise dos resultados foi demonstrado que as cepas invasoras de Hae possuem uma virulência maior do que as outras cepas, não invasoras. Entretanto, o quadro bacteriêmico causado pelas cepas invasoras não se associou a qualquer sinal clínico semelhante a FPB. Raros casos fatais ocorreram nas primeiras 24 h, após a inoculação das doses infectantes mais elevadas, devido provavelmente, a endotoxina liberada²². Após este período, os animais se recuperaram prontamente, caracterizando uma bacteriemia temporária, o que contrasta com a alta letalidade observada na FPB em crianças.

Com relação às doses infectantes e as frequências de bacteriemia, observamos que as concentrações bacterianas entre 10^3 e 10^7 células são um referencial importante das cepas invasoras de Hae. Doses infectantes das cepas invasoras maiores que 10^5 bactérias provavelmente resultariam em morte dos animais. O mesmo não ocorreu com as cepas controles, que exigiam uma dose infectante maior para produzir bacteriemia. Com a inoculação de 10^5 células das cepas controles, a porcentagem de bacteriemia foi baixa; a inoculação de algumas cepas não invasoras não provocou bacteriemia, o que nos levou a crer que doses infectantes das cepas não invasoras menores que 10^5 células resultaria em uma frequência de bacteriemia muito baixa.

Frente a estes resultados, observamos que a dose infectante de 10^5 células foi crítica para este estudo, pois possibilitou a comparação das frequências de bacteriemia causadas pelas cepas invasoras e não invasoras do Hae, o que revelou ser estatisticamente significativa.

Diferenças significantes quanto a virulência das cepas estudadas também foram observadas analisando-se a magnitude de bacteriemia.

Em nossa metodologia de trabalho, o limite máximo de contagem do crescimento bacteriano foi de 500 colônias correspondente a $10^{4,69}$ ufc/ml de sangue, o que corresponde ao crescimento bacteriano confluyente, em meio de cultura sólido. Por outro lado, o nível mínimo de bacteriemia possível de ser quantificado pela metodologia utilizada foi de 10^2 ufc/ml de sangue, o que corresponde a 1 colônia na placa de cultura. Portanto, animais cujas magnitudes de bacteriemia foram menores que 100 bactérias por ml de sangue, ou seja, 10^2 ufc/ml, foram considerados não bacteriêmicos.

As cepas invasoras desenvolveram bacteriemia com alta contagem bacteriana sendo que com algumas cepas a magnitude foi maior que $10^{4,69}$ ufc/ml de sangue. Entretanto, as cepas não invasoras de Hae, na sua maioria, não apresentaram bacteriemia.

As DB 50% das cepas invasoras foram, em geral, 1000 vezes menores do que as DB 50% das cepas não invasoras de Hae, significando que seriam necessárias 1000 vezes mais bactérias das cepas controles para causar bacteriemia em 50% dos ratos inoculados.

RUBIN et al.^{34,35} estudando cepas de Hae no modelo de ratos recém nascidos, também verificaram a maior virulência das cepas invasoras de Hae. A semelhança dos resultados encontrados em nosso estudo e os achados pelos autores demonstra a reprodutibilidade dos ensaios de bacteriemia, confirmando a utilidade deste modelo experimental para o estudo das cepas de Hae.

A cepa invasora australiana, 349, apesar de não possuir as características genotípicas e fenotípicas das cepas invasoras brasileiras, demonstrou o mesmo potencial de virulência daquelas cepas, no modelo experimental. Assim sendo, as características que definem as cepas invasoras brasileiras de Hae podem não estar necessariamente relacionados com os seus determinantes de virulência. Entretanto, sabe-se que as cepas de Hae tem origens polifiléticas²⁹, o que poderia justificar a ocorrência de cepa invasora de Hae em outro continente, com características genotípicas e fenotípicas diferentes das cepas invasoras brasileiras.

O resultado do nosso estudo com a cepa isolada de mosca, 144/90, sugere que os fatores genotípicos e fenotípicos responsáveis pela virulência da bactéria não se alteram durante a sua transmissão por vetores mecânicos.

Neste estudo, a cepa 21/87, com características intermediárias, apresentou comportamento semelhante às cepas invasoras de Hae quanto a DB 50%, a frequência e a magnitude de bacteriemia. Entretanto, esta observação está relacionada com o estudo de 1 cepa apenas com estas características, enquanto 6 cepas invasoras e 6 cepas controles de Hae foram estudadas.

O perfil de virulência da cepa 21/87 mostra a importância das características encontradas nesta cepa que são comuns às cepas invasoras^{7,19}, tais como, o mesmo tipo de restrição do

gene rDNA, o mesmo tipo isoenzimático, e o mesmo perfil protéico em SDS-PAGE, o que questiona a interferência do plasmídeo de 24 Md e da proteína de 25 Kd, ausentes nesta cepa, para a virulência das cepas invasoras brasileiras.

A cepa com características intermediárias foi isolada de um caso de conjuntivite, na cidade de Pradópolis em 1987, onde ocorreram casos suspeitos de FPB. Posteriormente, em 1990, outras cepas com as mesmas características foram isoladas de sangue ou liquor hemorrágico de 3 casos de FPB, na cidade de Valparaíso, região de Araçatuba⁴⁰, também Estado de São Paulo. Atualmente, estas cepas com características intermediárias são consideradas invasoras, o que mostra a validade deste modelo animal para estudo do potencial de virulência das cepas de Hae.

O modelo de ratos recém nascidos foi adequado para o estudo dos efeitos protetores de anticorpos através da imunização passiva com soros hiperimunes, podendo auxiliar a definir antígenos que induzem anticorpos protetores.

Estes soros, produzidos com cepas invasoras de Hae, demonstraram possuir anticorpos protetores direcionados contra antígenos de superfície comuns, presentes nas cepas homólogas^{2,3}.

Em nosso estudo, a diluição do soro a 1:10, provocou grande redução no nível de bacteriemia. Algum efeito protetor, também, foi observado nos ratos tratados com soro normal de coelho, diluído também a 1:10. Certamente, o soro normal de coelho contém pequena quantidade de anticorpos contra antígenos de Hae ou, pode prover algum fator adicional inespecífico, mesmo após o aquecimento para inativação do complemento.

Como comparação do potencial de virulência das cepas de *Haemophilus*, utilizamos uma cepa de Hib, cepa Eagan, com características de patogenicidade conhecida^{24,26,38,44}.

A primazia de Hib como cepa virulenta pode ser demonstrada nas diferentes etapas de nosso estudo. Com a inoculação de menor dose infectante estudada, ou seja, 1000 bactérias, todos os animais inoculados ficaram bacteriêmicos. Os nossos achados estão concordantes com os encontrados por outros autores^{26,44}, utilizando as mesmas condições experimentais.

O maior potencial de virulência do Hib deve-se provavelmente a sua capacidade de eva-

são dos mecanismos de defesa do hospedeiro, devido a presença da cápsula polissacarídica, conseqüentemente, aumentando o seu número na corrente circulatória.

Pela técnica de multilocus enzimático tem sido demonstrado que a estrutura populacional de Hib é clonal^{27,28}, o que poderia conferir propriedades de virulência definidas para as diferentes cepas deste sorotipo. Da mesma forma que Hib, as cepas invasoras brasileiras de Hae, muito semelhantes geneticamente, apresentaram um mesmo perfil de bacteriemia no modelo de ratos recém nascidos, evidenciando a excepcionalidade de sua virulência.

Até o momento, os fatores de virulência das cepas de Hae invasoras não foram identificados, o que torna os modelos experimentais fundamentais para o esclarecimento da infectividade destas cepas invasoras.

CONCLUSÕES

O modelo de ratos recém nascidos:

1. demonstrou ser susceptível a infecção por Hae.
2. permitiu diferenciar cepas invasoras e cepas controles de Hae quanto aos seus potenciais de virulência.
3. permitiu identificar o potencial de invasibilidade da cepa com características intermediárias entre cepas invasoras e cepas não invasoras de Hae, definindo-a como cepa invasora.
4. demonstrou que a virulência da cepa invasora de Hae se mantém durante sua transmissão por vetores mecânicos.
5. permitiu observar a ação de anticorpos protetores contra a infecção, pela imunização passiva.
6. demonstrou que o potencial de invasibilidade das cepas invasoras de Hae é inferior ao do Hib (cepa Eagan).

SUMMARY

BRAZILIAN PURPURIC FEVER, VIRULENCE IN ANIMAL MODEL OF *HAEMOPHILUS AEGYPTIUS* (*H. INFLUENZAE* BIOGROUP *AEGYPTIUS*)

Brazilian purpuric fever (BPF) is caused by invasive strains of *Haemophilus aegyptius* (*H.*

influenzae biogrupo *aegyptius*, Hae). These strains were differentiated from Hae strains associated only with conjunctivitis (non-invasive Hae strains) through specific molecular markers. Complement-depleted infant rat model was used to study the invasive and non-invasive Hae strains to compare their virulence potential. Inoculating 10^5 bacteria in the rats, the invasive strains caused 80 to 100% bacteremia and the intensity of bacteremia was $10^{2,5\pm 0,49}$ to $> 10^{4,69}$ cfu/ml of blood. Using the same infectious dose, the non-invasive strains did not cause frequent bacteremia (0 to 50%) and the intensity was 0 to $10^{3,69\pm 0,53}$ cfu/ml of blood. The infectious doses able to cause 50% of bacteremia in the rats (BD 50%) varied from $< 10^3$ to $10^{4,2}$ bacteria for the invasive strains, whereas the BD 50% were $10^{6,2}$ to $> 10^{7,3}$ bacteria for non-invasive strains. Passive immunization using antisera to invasive strains protected rats against bacteremia caused by homologous strains, but not by heterologous strain. By comparing the bacteremia caused by Hae and bacteremia caused by *H. influenzae* b (Eagan strain, Hib), it was demonstrated that Hib had higher virulence potential. This animal model was useful to clarify the virulence potential of invasive Hae strains.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Augusto d'Escragno-le Taunay, Consultor Científico da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e ao Dr. Carmo Elias de Andrade Melles pelas inestimáveis sugestões para realização deste trabalho e a Cleide Rosana Duarte Prisco, do Serviço de Informática e Análise de Dados do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III) da USP pela análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANDILEONE, M.C.C.; AJELLO, G.W.; BIBB, W.F.; VIEIRA, V.S.D.; SOTTNEK, F.O.; SWAMINATHAN, B. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Development of diagnostic tests for *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*, the etiologic agent of Brazilian purpuric fever. *Pediat. infect. Dis.*, 8: 243-245, 1989.
2. BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D. & ROCHA, G.M. - Febre Purpúrica Brasileira, hoje: aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. *Ciênc. Cult.*, 42: 575-584, 1990.

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. S. Paulo, 31: 221-227, 1989.
4. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Brazilian purpuric fever: epidemic purpura fulminans associated with antecedent purulent conjunctivitis. Lancet, 2: 757-761, 1987.
5. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - *Haemophilus aegyptius* bacteraemia in Brazilian purpuric fever. Lancet, 2: 761-763, 1987.
6. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Brazilian Purpuric Fever identified in a new region of Brazil. J. infect. Dis., 165(suppl. 1): S16-S19, 1992.
7. BRENNER, D.J.; MAYER, L.W.; CARLONE, G.M.; HARRISON, L.H.; BIBB, W.G.; BRANDILEONE, M.C.C.; SOTTNEK, F.O.; IRINO, K.; REEVES, M.W.; SWENSON, J.M.; BIRKNESS, 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.; ARKO, R.J.; BROOME, C.V. & 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.
8. CARLONE, G.M.; GORELKIN, L.; GHEESLING, L.L.; ERWIN, A.L.; HOISETH, S.K.; MULKS, M.H.; O'CONNOR, S.P.; WEYANT, R.S.; MYRICK, J.; RUBIN, L.; MUNFORD III, R.S.; WHITE, E.H.; ARKO, R.J.; SWAMINATHAN, B.; GRAVES, L.M.; MAYER, L.W.; ROBINSON, M.K.; CAUDILL, S.P. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Potential virulence-associated factors in Brazilian purpuric fever. J. clin. Microbiol., 27: 609-614, 1989.
9. CHANDLER, C.A.; FOTHERGILL, L.D. & DINGLE, J.H. - Studies on *Haemophilus influenzae* II. A comparative study of the virulence of smooth, rough, and respiratory strains of *Haemophilus influenzae* as determined by infection of mice with mucin suspensions of the organism. J. exp. Med., 66: 789-799, 1937.
10. CINTRA, O.A.L.; SCHOR, P.; SCARPELINI, S.; ROCHA, G.M.; FERREZ, M.C.C. & CERQUEIRA, B.C.S. - *Haemophilus aegyptius*, agente etiológico da Febre Purpúrica Brasileira em surtos epidêmicos de conjuntivite na cidade de Pradópolis (SP), em 1989. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 15., Ribeirão Preto. 1989. Resumos. p.208.
11. CORRALL, C.J.; WINKELSTEIN, J.A. & MOXON, E.R. - Participation of complement in host defence against encapsulated *Haemophilus influenzae* types a, c, and d. Infect. Immun., 35: 759-763, 1982.
12. DAJANI, A.S.; ASMAR, B.I. & THIRUMOORTHY, M.C. - Systemic *Haemophilus influenzae* disease: an overview. J. Pediat., 94: 355-364, 1979.
13. DAVIS, D.J. & HINES, V.D. - Conjunctivitis in elementary schools. Publ. Hlth. Rep. (Wash.), 67: 145-149, 1952.
14. FISHER, M.C. - Conjunctivitis in children. Pediat. Clin. N. Amer., 34: 1447-1456, 1987.
15. HARRISON, L.H.; SILVA, G.A.; PITTMAN, M.; FLEMING, D.W.; VRANJAC, A.; BROOME, C.V. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Epidemiological and clinical spectrum of Brazilian purpuric fever. J. clin. Microbiol., 27: 599-604, 1989.
16. HARRISON, L.H.; SILVA, G.A.; VRANJAC, A.; BROOME, C.V. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Brazilian purpuric fever: an epidemiological and clinical summary. Pediat. infect. Dis., 8: 239-241, 1989.
17. IRINO, K.; GRIMONT, F.; CASIN, I.; GRIMONT, P.A.D. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - RNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* strains associated with Brazilian purpuric fever. J. clin. Microbiol., 26: 1535-1538, 1988.
18. IRINO, K.; LEE, I.M.L.; KAKU, M.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; LEVY, C.E.I.; BERKLEY, S.F.; FLEMING, D.W.; SILVA, G.A. & HARRISON, L.H. - Febre Purpúrica Brasileira: resultados preliminares da investigação etiológica. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 29: 174-177, 1987.
19. MAYER, L.W.; BIBB, W.F.; BIRKNESS, K.A.; IRINO, K.; WEYANT, R.S.; REEVES, M.W.; SWENSON, J.M. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Distinguishing clonal characteristics of the Brazilian purpuric fever producing strain. Pediat. infect. Dis., 8: 241-243, 1989.
20. MCINTYRE, P.; WHEATON, G. & ERLICH, J. - Brazilian purpuric fever in Central Australia. Lancet, 2: 112, 1987.
21. MONTEIRO SALLES, F.J. - Bacterioscopia das secreções conjuntivais. Rev. Med. Cirurg. S. Paulo, 1: 105-129, 1941.
22. MORRISON, D.D. - Bacterial endotoxins and pathogenesis. Rev. infect. Dis., 5: 5733-5747, 1983.
23. MOXON, E.R.; GLODE, M.P.; SUTTON, A. & ROBINS, J.B. - The infant rat as a model of bacterial meningitis. J. infect. Dis., 136: 5186-5190, 1977.
24. MOXON, E.R. & KROLL, J.S. - Type b capsular polysaccharide as a virulence factor of *Haemophilus influenzae*. Vaccine, 6: 113-115, 1988.

25. MOXON, E.R.; SMITH, A.L.; AVERILL, D.R. & SMITH, D.H. - *Haemophilus influenzae* meningitis in infant rats after intranasal inoculation. *J. infect. Dis.*, 129: 154-162, 1974.
26. MOXON, E.R. & VAUGHN, K.A. - The type b capsular polysaccharide as a virulence determinant of *Haemophilus influenzae*: studies using clinical isolates and laboratory transformants. *J. infect. Dis.*, 143: 516-524, 1981.
27. MUSSER, J.M.; GRANOFF, D.M.; PATTISON, P.E. & SELANDER, R.K. - A population genetic framework for the study of invasive diseases caused by serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 82: 5078-5082, 1985.
28. MUSSER, J.M.; KROLL, J.S.; MOXON, E.R. & SELANDER, R.K. - Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.*, 56: 1837-1845, 1988.
29. MUSSER, J.M. & SELANDER, R.K. - Brazilian purpuric fever: evolutionary genetic relationships of the case clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* to encapsulated strains of *Haemophilus influenzae*. *J. infect. Dis.*, 161: 130-133, 1990.
30. OSTROW, P.T.; MOXON, E.R.; VERNON, N. & KAPKO, R. - Pathogenesis of bacterial meningitis. Studies on the route of meningeal invasion following *Haemophilus influenzae* inoculation of infant rats. *Lab. Invest.*, 40: 678-685, 1979.
31. PONTES, L.R.S.K.; RUFFINO NETO, A.; GERMANO NETO, J. & ROCHA, G.M. - Febre Purpúrica Brasileira: associação com conjuntivites e efeito "cluster" da aglomeração. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 20: 127, 1987.
32. REED, L.J. & MUENCH, H. - A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-497, 1938.
33. ROCHA, G.M.; ISAAC, M.L.I.; LIMA, M. & RAMOS, P.M.R. - Febre Purpúrica do Brasil. *J. Pediatr.*, 64: 473-478, 1988.
34. RUBIN, L.G.; CARLONE, G.M. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - An infant rat model of bacteremia with Brazilian purpuric fever isolates of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* (*Haemophilus aegyptius*). *Pediatr. infect. Dis.*, 8: 247-248, 1989.
35. RUBIN, L.G.; GLOSTER, E.S.; CARLONE, G.M. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - An infant rat model of bacteremia with Brazilian Purpuric Fever isolates of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*. *J. infect. Dis.*, 160: 476-482, 1989.
36. RUBIN, L.G. & MOXON, E.R. - Pathogenesis of bloodstream invasion with *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.*, 41: 280-284, 1983.
37. SMITH, H. - The use of bacteria grown in vivo for studies on the basis of their pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.*, 12: 77-102, 1958.
38. SMITH, A.L.; SMITH, D.H.; AVERILL Jr., D.R.; MARINO, J. & MOXON, E.R. - Production of *Haemophilus influenzae* b meningitis in infant rats by intraperitoneal inoculation. *Infect. Immun.*, 8: 278-290, 1973.
39. SWAMINATHAN, B.; MAYER, L.W.; BIBB, W.F.; AJELLO, C.W.; IRINO, K.; BIRKNESS, K.A.; GARON, C.F.; REEVES, M.W.; BRANDILEONE, M.C.C.; SOTTNEK, F.O.; BRENNER, D.J.; STEIGERWALT, A.G. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Microbiology of Brazilian purpuric fever and diagnostic tests. *J. clin. Microbiol.*, 27: 605-608, 1989.
40. TONDELLA, M.L.C.; KIMURA, R.S.; IRINO, K.; MEZZACAPA NETO, B.; NEVES, B.C. & VIEIRA, V.S.D. - Caracterização do clone invasor de *Haemophilus aegyptius* (Hae), responsável pela Febre Purpúrica Brasileira (FPB) na região de Araçatuba, Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16., Santos, 1991. Resumos. MB-29. (*Rev. Microbiol.*, 22(supl. 1): 157, 1991).
41. TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; VIEIRA, V.S.D.; ZANELLA, R.C. & TAUNAY, A.E. - Atuação do Instituto Adolfo Lutz na investigação laboratorial da Febre Purpúrica Brasileira. In: ANTUNES, J.L.F.; NASCIMENTO, C.B.; NASSI, L.C. & PREGNOLATTO, N.P., org. Instituto Adolfo Lutz: 100 anos do laboratório de Saúde Pública. São Paulo, Letras & Letras, 1992. p.255-271.
42. TONDELLA, M.L.C.; PAGANELLI, C.H.; BORTOLOTTO, I.M.; TAKANO, O.A.; PERKINS, B.A.; SILVA, C.A.; IRINO, K.; MEZZACAPA NETO, B.; SANTOS, A.S.; CHILARDI, A.C.R. & GRUPO DE ESTUDO DA FPB - Isolamento da clone invasor de *Haemophilus aegyptius* (Hae), responsável pela Febre Purpúrica Brasileira (FPB), de cloropídeos (Diptera) dos gêneros *Hippelates* e *Liohippелates*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16., Santos, 1991. Resumos. MB-30. (*Rev. Microbiol.*, 22(supl. 1): 157, 1991).
43. WILD, B.E.; PEARMAN, J.W.; CAMPBELL, P.B.; SWAN, P.K. & GURRY, D.L. - Brazilian Purpuric Fever in Western Australia. *Med. J. Aust.*, 150: 344-345, 1989.
44. ZWAHLEN, A.; WINKELSTEIN, J.A. & MOXON, E.R. - Surface determinants of *Haemophilus influenzae* pathogenicity: comparative virulence of capsular transformants in normal and complement-depleted rats. *J. infect. Dis.*, 148: 385-394, 1983.

Recebido para publicação em 09/11/1992
Aceito para publicação em 10/03/1993