

ISOLAMENTO DE *HAEMOPHILUS AEGYPTIUS* ASSOCIADO À FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA, DE CLOROPÍDEOS (DIPTERA) DOS GÊNEROS *HIPPELATES* E *LIOHIPPELATES*

M. L. C. TONDELLA (1), C. H. PAGANELLI (2), I. M. BORTOLOTTO (3), O. A. TAKANO (4), K. IRINO (1),
M. C. C. BRANDILEONE (1), B. MEZZACAPA NETO (1), V. S. D. VIEIRA (1) & B. A. PERKINS (5).

RESUMO

O reconhecimento da Febre Purpúrica Brasileira (FPB), em 1984, originou uma série de estudos que revelaram uma correlação desta doença com conjuntivites causadas por *Haemophilus aegyptius*. A associação do aumento de conjuntivites em crianças e a maior densidade populacional de cloropídeos do gênero *Hippelates* já havia sido verificada desde o século passado. Este fenômeno está relacionado ao tropismo que estes insetos apresentam pelos olhos, secreções e feridas de onde se alimentam. Embora haja evidências do papel destes cloropídeos na transmissão mecânica de conjuntivites bacterianas, o isolamento de *Haemophilus aegyptius* a partir dos mesmos, no seu habitat natural, ainda não havia sido verificado. No presente trabalho obtivemos o isolamento de cepas invasivas de *Haemophilus aegyptius*, associadas à FPB, de duas coleções de cloropídeos, classificados como *Liohippelates peruanus* e uma espécie nova, *Hippelates neoproboscideus*, coletados ao redor dos olhos de crianças com conjuntivite.

UNITERMOS: *Haemophilus aegyptius*; *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*; Febre Purpúrica Brasileira; Conjuntivite; Chloropidae; *Hippelates*; *Liohippelates*; Eye gnats.

INTRODUÇÃO

A Febre Purpúrica Brasileira (FPB) é uma doença infecciosa aguda, reconhecida pela primeira vez no Brasil, no ano de 1984. É caracterizada por febre alta, frequentemente acompanha de dor abdominal, vômito e evolução rápida para formação de petéquias e/ou púrpura, colapso vascular e choque descompensado, no intervalo de 24 a 72 horas após o início da febre. É causada por cepas de *Haemophilus aegyptius* com características invasivas, acometendo crianças eutróficas na faixa etária entre dois meses e 14 anos.

Esta moléstia vem ocorrendo de forma epidêmica e/ou esporádica, com letalidade superior a 60%. É precedida, na maioria das vezes, por uma história de conjuntivite purulenta, 7 a 16 dias antes do início da febre^{2, 3, 10, 11, 22}.

A etiologia da FPB foi caracterizada somente em 1986, durante a epidemia ocorrida em Serrana, SP, quando isolou-se o microorganismo *Haemophilus aegyptius* de líquidos estéreis de crianças cujos sintomas clínicos

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

(2) Seção de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

(3) Divisão de Epidemiologia, Secretaria da Saúde, Cuiabá, MT, Brasil.

(4) Fundação Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

(5) Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA.

Endereço para correspondência: Maria Lúcia Cecconi Tondella, Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bacteriologia, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil.

correspondiam à definição de caso de FPB, já estabelecida ² e posteriormente revisada ¹⁰.

O fato de até o advento da FPB o microorganismo *Haemophilus aegyptius* ter sido raramente apontado como agente bacteriano de enfermidades sistêmicas, levou a uma série de investigações epidemiológicas e laboratoriais, que resultaram na identificação de cepas de *Haemophilus aegyptius* com características distintas daquelas associadas à etiologia de conjuntivites. Entre estas características ressalta-se a reatividade positiva ao anti-soro policlonal anti-*Haemophilus aegyptius* (anti-Hae) ¹, presença de um plasmídeo de 24 Magadaltons (MDa), com padrão eletroforético específico produzido pelo tratamento com a endonuclease de restrição *AccI*, denominado 3031 ⁵ e ribotipos obtidos pela digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI*, denominados 3 ou 4 ¹² e posteriormente modificados para 3A, 3B, 4A e 4B ¹³. As cepas com estas características são denominadas cepas invasivas de *Haemophilus aegyptius*.

A associação entre o aumento de determinadas oftalmias (tracoma e conjuntivite) e a maior densidade de moscas, denominadas na América do Norte de "eye gnats" e popularmente conhecidas no Brasil como "lame-olhos", tem sido reportada desde o século passado. A importância destes dípteros na transmissão de doenças varia de acordo com o clima e a localidade. A espécie *Liohippelates pusio* (Loew) - (Diptera: Chloropidae), anteriormente denominada *Hippelates*, foi primeiramente citada na literatura entomológica como possível vetor de conjuntivites em 1884 por SCHWARZ, na Flórida, EUA ²¹. (Para atualização da nomenclatura sobre o gênero *Hippelates* s. l., vide SABROSKY, 1980 e SABROSKY & PAGANELLI, 1984)

Estes insetos apresentam um tropismo por secreções dos olhos e ouvido de homens e animais, das quais se alimentam. São também atraídos por feridas e outras partes do corpo onde substâncias odoríferas estão presentes. Em 1927, SCHNEIDER ²⁰ citou a espécie *Hippelates flavipes* Loew, atualmente *Liohippelates*, e a *Musca domestica* como principais transmissores de conjuntivite aguda endêmica na Califórnia. Em 1933, BENGTON ⁶ registrou que a ocorrência de conjuntivite aguda causada pelo bacilo de "Koch-Weeks", antiga denominação do *Haemophilus aegyptius*, teria sido amplamente transmitida pela mosca *Liohippelates pusio*.

DAVIS & PITTMAN ⁸ relataram a possível trans-

missão mecânica de *Haemophilus* sp pela espécie *Liohippelates pusio*, uma vez que a incidência de conjuntivite parecia coincidir com a distribuição geográfica e variação sazonal da densidade destes insetos. DAWSON ⁹ demonstrou a concomitância entre a variação sazonal de surtos de conjuntivite causados pelo bacilo de "Koch-Weeks" e a densidade de moscas da espécie *Liohippelates collusor*. BUEHLER et al. ⁷ igualmente consideraram o papel das moscas *Liohippelates pusio* como vetores mecânicos de conjuntivite epidêmica aguda, posto que residentes locais confirmaram a predominância destes insetos durante o pico da epidemia.

Após a notificação de casos de FPB no Estado de Mato Grosso ⁴, tentamos estudar o papel destes cloropídeos na transmissão de conjuntivite causada por cepas de *Haemophilus aegyptius* associadas à FPB, uma vez que a densidade destes insetos era bastante elevada, durante os surtos de conjuntivites de ocorrência concomitante à FPB.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de cloropídeos dos gêneros Hippelates e Liohippelates.

Foram estudadas 41 amostras (6 a 10 cloropídeos cada), coletadas dos olhos ou regiões próximas aos olhos de 18 crianças com conjuntivite aguda. Estas crianças foram selecionadas por residirem nas cidades de Alto Taquarí e Cuiabá, MT, onde haviam sido notificados casos de FPB e na cidade de Nova Mutum, MT, onde ocorria surto de conjuntivite sem registro de FPB.

Coleta e transporte dos cloropídeos para isolamento de bactérias do gênero Haemophilus.

Seis a dez cloropídeos foram coletados de cada criança, preferencialmente aqueles que se encontravam próximos aos olhos, ou mesmo dentro deles, através de um aspirador bucal. As amostras foram imediatamente colocadas em 0,5ml de salina fisiológica esterilizada, adicionada de solução estéril de bacitracina (BYK Prociex Química Farmacêutica LTDA, SP), a uma concentração final de 300 µg/ml. Este antimicrobiano é regularmente utilizado no isolamento seletivo de *Haemophilus* sp ¹⁴.

Parte de algumas amostras de cloropídeos foi reservada para identificação sistemática, e para tal conservada em etanol a 70%.

Semeadura do macerado de cloropídeos para o estudo da flora bacteriana interna e externa.

Os cloropídeos foram retirados da solução fisiológica contendo bacitracina e macerados, utilizando-se lâminas de vidro estéreis. O macerado foi semeado em placa de agar chocolate, base infusão de cérebro e coração de boi (BHI, Difco, Detroit) adicionado de 10% de sangue desfibrinado e estéril de cavalo, 300 µg/ml de bacitracina e 3,6% de agar. Esta concentração de agar foi utilizada para minimizar o fenômeno de formação de "bafo" por *Proteus* sp. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5 a 10% de CO₂.

Isolamento de espécies do gênero *Haemophilus* de cloropídeos

Todas as colônias com características morfológicas semelhantes às apresentadas pelas espécies do gênero *Haemophilus* foram semeadas em tubos de agar chocolate inclinado. O número de colônias semeadas variou de 5 a 20 por placa. O crescimento bacteriano de todos os tubos foi submetido ao exame microscópico dos esfregaços, corados pelo GRAM, e aqueles com bacilos sugestivos de hemófilos foram separados para triagem sorológica com o anti-soro policlonal anti-Hae, utilizado como teste para identificação rápida das cepas invasivas de *Haemophilus aegyptius*¹.

As cepas foram bioquimicamente identificadas segundo o método proposto por KILLIAN & BIBERSTEIN¹⁴ e aquelas correspondentes à espécie *Haemophilus aegyptius* foram tipadas através dos padrões de restrição de plasmídios de 24 MDa e ribotipagem^{5, 12}.



Fig. 1 - Presença de moscas ao redor dos olhos de criança com conjuntivite aguda, residente na cidade de Cuiabá, Estado de Mato Grosso.

RESULTADOS

Foram realizadas 41 culturas para isolamento de bactérias do gênero *Haemophilus* provenientes das coleções de moscas obtidas das 18 crianças que apresentavam conjuntivite aguda (Fig. 1). Destas culturas foram isoladas 13 cepas de *Haemophilus* sp sendo as 28 culturas restantes negativas para bactéria deste gênero, embora tivessem apresentado um crescimento denso de bactérias pertencentes, principalmente, à família *Enterobacteriaceae* (Fig. 2).

As 13 cepas isoladas foram identificadas ao nível de espécie, tendo 9 (69,2%) apresentado o perfil bioquímico de *Haemophilus aegyptius*, 3 (23,1%) de *Haemophilus segnis* e 1 (7,7%) o de *Haemophilus parainfluenzae* biotipo III. Das cepas de *Haemophilus aegyptius* isoladas, 8 foram caracterizadas segundo a reatividade ao soro anti-Hae, padrões de restrição de plasmídeo de 24 MDa e ribotipagem. Destas, 4 cepas aglutinaram em presença do soro anti-Hae e apresentaram os marcadores epidemiológicos representados pelo plasmídeo 3031 e ribotipo 3B, resultando na confirmação da presença de cepas invasivas de *Haemophilus aegyptius* em 4 coleções de moscas, obtidas de 3 crianças. Duas destas coleções de cloropídeos haviam sido simultaneamente separadas para identificação sistemática, tendo os resultados sido demonstrados na Tabela 1.



Fig. 2 - Crescimento bacteriano em placa de agar chocolate obtido após semeadura de macerado de moscas. Observar a presença de colônias pequenas de *Haemophilus* sp e o crescimento abundante de outros microrganismos, principalmente enterobactérias.

TABELA I

Caracterização das cepas de *Haemophilus aegyptius* isoladas de 4 amostras de díptera (3 espécies diferentes) colhidas da proximidade dos olhos de 3 crianças de Mato Grosso com conjuntivite.

Amostra de Díptera	Cepas de <i>H. aegyptius</i>			Número de exemplares dos Díptera
	Aglutinação*	Ribotipo**	Plasmídeo**	
948/BSP	Positiva	3B	3031	<i>L. peruanus</i> (10 exs)
950/JPO	Positiva	3B	3031	<i>H. neoproboscideus</i> (2exs) <i>L. peruanus</i> (5 exs)
970/APC	Positiva	3B	3031	NR****
971/APC	Positiva	3B	3031	NR

- * Teste de aglutinação em lâmina com o soro anti-Hae
- ** Perfil de restrição do gene rDNA (*EcoRI*)
- *** Tipo de restrição do plasmídeo de 24 MDa (*AccI*)
- **** Não realizado

DISCUSSÃO

Apesar da implicação desses dípteros na transmissão de conjuntivites e outras oftalmias ter sido relatada desde o século passado, pouco tem sido comprovado pelo isolamento dos agentes etiológicos relacionados a estas infecções, a partir destes insetos. DAWSON⁹ não obteve o isolamento do bacilo de "Kock-Weeks" de moscas do gênero *Hippelates* coletadas da face de criança com conjuntivite, embora não considerasse tais resultados uma evidência negativa da atuação destas moscas como vetores mecânicos.

McGUIRE & DURAN¹⁵ estudaram a flora bacteriana de duas espécies de moscas domésticas (*Musca domestica vicina* e *Musca sorbens*) coletadas da face de crianças. O número de bactérias do gênero *Haemophilus* encontrado nestas moscas foi significativamente menor quando comparado a outros microorganismos, o que permitiu a conclusão de que a maioria das oftalmias bacterianas, associadas à infestação por estas espécies de moscas, seria causada por outras bactérias. Já o trabalho realizado por PAYNE et al.¹⁷ em modelo animal, comprovou a transmissão de conjuntivite por *Haemophilus aegyptius* através de moscas da espécie *Liohipelates pusio*. Os resultados indicaram que as moscas poderiam, efetivamente, atuar como vetores mecânicos de *Haemophilus aegyptius*, uma vez que os mesmos permaneciam viáveis nestes dípteros por um período de até 10 horas.

O isolamento de cepas de *Haemophilus aegyptius* com os marcadores epidemiológicos característicos de cepas responsáveis pela FPB, em 4 coleções de moscas, sugere a implicação destes cloropídeos na trans-

missão da FPB, embora estudos complementares ainda sejam necessários para determinação do tempo de viabilidade deste microorganismo nestes insetos. Nossos resultados confirmaram a presença de *Haemophilus aegyptius*, associados à FPB, em cloropídeos das espécies *Liohipelates peruanus* (Becker) e *Hippelates neoproboscideus* Paganelli & Sabrosky, recentemente descrita¹⁶, sugerindo o possível papel destas moscas na transmissão da FPB.

SUMMARY

Isolation of *Haemophilus aegyptius* associated to Brazilian purpuric fever from *Hippelates* and *Liohipelates* flies (Diptera: Chloropidae).

The recognition of the Brazilian purpuric fever (BPF) in 1984 led to a number of studies which showed a relation between this disease and conjunctivitis caused by *Haemophilus aegyptius*. The increase in cases of conjunctivitis in children associated with higher population density of eye gnats (Chloropidae: *Hippelates*) has been reported since last century. This phenomenon is related to the attraction that those flies show for the eyes, secretions and wounds, from where they feed on. Although there are evidences on the role of these flies in the mechanical transmission of seasonal bacterial conjunctivitis, the isolation of *Haemophilus aegyptius* from them in their natural habitat had not been demonstrated yet. In this study *Haemophilus aegyptius* associated to BPF was isolated from two pools of chloropids collected around the eyes of children with conjunctivitis which were identified as *Liohipelates peruanus* (Becker) and a new species *Hippelates neoproboscideus*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Carmo Elias Andrade Melles, Instituto Adolfo Lutz, Dr. Eliseu Alves Waldman, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Dra. Graziela Almeida da Silva, Centro de Vigilância Epidemiológica "Alexandre Vranjak", Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo e Dra. Claire Broome, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, pelas sugestões na realização deste trabalho.

Agradecemos, igualmente, a BYK Procienc Química Farmacêutica LTDA, SP, pelo fornecimento da bacitracina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANDILEONE, M. C. C.; VIEIRA, V. S. D.; TONDELLA, M. L. C. et al. - Febre purpúrica brasileira. Caracterização rápida das cepas invasoras de *Haemophilus aegyptius*. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 31: 221-227, 1989.
2. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Brazilian purpuric fever: epidemic purpura fulminans associated with antecedent purulent conjunctivitis. Lancet, 2: 757-761, 1987.
3. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - *Haemophilus aegyptius* bacteraemia in Brazilian purpuric fever. Lancet, 2: 761-763, 1987.
4. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - Brazilian purpuric fever identified in a new region of Brazil. J. infect. Dis., 165 (suppl. 1): S16-S19, 1992.
5. BRENNER, D. J.; MAYER, L. W.; CARLONE, G. M. et al. - Biochemical, genetic and epidemiological characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian purpuric fever. J. clin. Microbiol., 26: 1524-1534, 1988.
6. BENGTON, I. A. - Seasonal acute conjunctivitis occurring in the southern states. U. S. Publ. Hlth. Rep., 48: 917-926, 1933.
7. BUEHLER, J. W.; HOLLOWAY, J. T.; GOODMAN, R. A. & SIKES, R. K. - Gnat sore eyes: seasonal, acute conjunctivitis in a southern state. Sth. med. J. (Bgham, Ala), 76: 587-589, 1983.
8. DAVIS, D. J. & PITTMAN, M. - Acute conjunctivitis caused by *Haemophilus*. Amer. J. Dis. Child., 79: 211-222, 1950.
9. DAWSON, C. R. - Epidemic Koch-Weeks conjunctivitis and trachoma in the Coachella Valley in California. Amer. J. Ophthal., 49: 801-808, 1960.
10. HARRISON, L. H.; SILVA, G. A.; PITTMAN, M. et al. - Epidemiology and clinical spectrum of Brazilian purpuric fever. J. clin. Microbiol., 27: 599-604, 1989.
11. IRINO, K.; LEE, I. M. L.; KAKU, M. et al. - Febre purpúrica brasileira: resultados preliminares da investigação etiológica. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 29: 174-177, 1987.
12. IRINO, K.; GRIMONT, F.; CASIN, I.; GRIMONT, P. A. D. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP - rDNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius strains associated with the Brazilian purpuric fever. J. clin. Microbiol., 26: 1535-1538, 1988.
13. IRINO, K. - Ribotipo como marcador molecular de *Haemophilus aegyptius*, agente etiológico da febre purpúrica brasileira. São Paulo, 1992. (Tese de Doutorado-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
14. KILIAN, M. & BIBERSTEIN, E. L. - *Haemophilus* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Roberts and Smith, 1971. In: KRIEGH, N. R. & HOLT, J. G., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 558-569.
15. MCGUIRE, C. D. & DURANT, R. C. - The role of flies in the transmission of eye disease in Egypt. Amer. J. trop. Med. Hyg., 6: 569-575, 1957.
16. PAGANELLI, C. H. & SABROSKY, C. W. - *Hippelates* flies (Diptera: Chloropidae) possibly associated with Brazilian purpuric fever. Proc. ent. Soc. Washington, 95: 165-174, 1993.
17. PAYNE Jr., W. J.; COLE, J. R.; SNODDY, E. L. & SEIBOLD, H. R. - The eye gnat *Hippelates pusio* as a vector of bacterial conjunctivitis using rabbits as an animal model. J. med. Entomol., 13: 599-603, 1977.
18. SABROSKY, C. W. - New genera and new combinations in nearctic Chloropidae (Diptera). Proc. ent. Soc. Washington, 82: 412-429, 1980.
19. SABROSKY, C. W. & PAGANELLI, C. H. - Family Chloropidae, 63. In: *A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States*. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de S. Paulo, 1984. p. 1-63.
20. SCHNEIDER, A. - An introduction report on pseudo-trachoma endemic in the Salton Sea region of California. Med. Sentinel, 35: 154-161, 1927.
21. SCHWARZ, E. A. - Notes on *Hippelates pusio* in the southern states. Proc. ent. Soc. Washington, 3: 178-180, 1884.
22. 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, Instituto Adolfo Lutz, (São Paulo, SP). In: ANTUNES, J. L. F.; NASCIMENTO, C. B. do; NASSI, L. C. & PREGNOLATTO, N. P. *Instituto Adolfo Lutz - 100 anos de laboratório de saúde pública*. São Paulo, Letras & Letras, 1992. p. 255-271.

Recebido para publicação 28/07/1993.

Acceto para publicação em 04/11/1993.