

FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA. CARACTERIZAÇÃO RÁPIDA DAS CEPAS INVASORAS DE HAEMOPHILUS AEGYPTIUS

M.C.C. BRANDILEONE (1); V.S.D. VIEIRA (1); M.L.C. TONDELLA (1); C.T. SACCHI (1); I.M. LANDGRAF (1);
R.C. ZANELLA (1); W.F. BIBB (2); K. IRINO (1) & GRUPO DE ESTUDO DA FEBRE PURPÚRICA BRASILEIRA

RESUMO

Cepas de *H. aegyptius* isoladas em surtos de Febre Purpúrica Brasileira (FPB) no Brasil, foram caracterizadas pelo método de aglutinação em lâmina utilizando um anti-soro produzido com cepa de *H. aegyptius* isolada de cultura de sangue de paciente com FPB. Através desse método foi possível identificar cepas de *H. aegyptius* responsáveis por surtos de conjuntivite com características antigênicas iguais às cepas isoladas de FPB. A sensibilidade e especificidade da soroaglutinação em lâmina foi de 97,7% e 89,6% respectivamente, podendo ser utilizado como método de triagem em estudos de conjuntivites purulentas, para detectar cepas invasivas de *H. aegyptius* associadas a FPB, possibilitando assim a implantação de medidas que ampliem a eficiência na prevenção e na vigilância epidemiológica da doença.

UNITERMOS: *Haemophilus aegyptius*; Febre purpúrica brasileira, Diagnóstico laboratorial; Soroaglutinação em lâmina.

INTRODUÇÃO

A Febre Purpúrica Brasileira (FPB) é uma doença sistêmica com caráter geralmente epidêmico, apresentando-se associada a surtos de conjuntivite purulenta. Acometê crianças na faixa etária de 2 meses a 10 anos, caracterizando-se clinicamente por febre alta, vômitos e dor abdominal, evoluindo para o aparecimento de púrpura, colapso vascular e necrose da pele^{3,4,5}.

No período de 1986 a 1988, cepas de *Haemophilus aegyptius* foram isoladas de sangue ou de líquido cefalorraquidiano de 17 pacientes com FPB residentes em regiões de Ribeirão Preto, Presidente Prudente e São José do Rio Preto, no Estado de São Paulo, Brasil^{6,11}. Estes, juntamente com as recentes descrições em Israel²¹ e Austrália¹⁷ de casos de

endocardite e FPB, respectivamente, são os únicos relatos de doença sistêmica causada por esse microrganismo.

Epidemias de conjuntivite purulenta que têm como agente etiológico o *H. aegyptius* ocorrem frequentemente em países de clima quente¹. No Brasil, casos de FPB associados a surtos de conjuntivite por esta bactéria tem sido observados desde 1984 na região Oeste do Estado de São Paulo^{4,5,9} e em 1988 no município da Capital.

O *H. influenzae* e o *H. aegyptius* foram considerados por alguns autores como duas espécies distintas, devido a diferenças em suas características morfológicas, bioquímicas, exigências nutricionais, capacidade de aglutinar hemácias "O" e variação na sua vi-

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

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

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

ruência^{8,13,16}. Outros autores não consideraram estas características suficientes para diferenciar as duas espécies, classificando o *H. aegyptius* como biotipo III do *H. influenzae*. Estudos genéticos de hibridização DNA/DNA²⁰ e de transformação sugerem que o *H. aegyptius* e o *H. influenzae* constituem uma única espécie^{2,14,15}. Atualmente, está sendo proposta a designação de *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* para o *H. aegyptius*⁷.

Estudos envolvendo a caracterização do perfil enzimático, das proteínas totais, dos padrões de restrição do gene rDNA e dos plasmídios sugerem que as cepas de *H. aegyptius* invasivas apresentam características específicas que as diferenciam de outras cepas⁷.

O estudo de marcadores epidemiológicos do *H. aegyptius* é de fundamental importância para a vigilância epidemiológica da FPB, no sentido de se identificar os surtos de conjuntivite purulenta causadas por cepas invasivas de *H. aegyptius*.

Este trabalho tem por objetivo caracterizar cepas invasivas de *H. aegyptius*, pelo estudo de seus antígenos de superfície pela técnica de soroglutinação em lâmina, utilizando antisoro produzido com uma cepa de *H. aegyptius* isolada de paciente com FPB.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 331 cepas de *Haemophilus sp* distribuídas em 6 grupos discriminados abaixo:

Grupo 1 — 22 cepas de *H. aegyptius*, isoladas de 17 casos confirmados de FPB*, em diferentes municípios do Estado de São Paulo (Promissão em 1984, Serrana, Guataparã, Fartura, São José do Rio Preto e Presidente Prudente em 1986, Serra Azul em 1988).

Grupo 2 — 26 cepas de *H. aegyptius* (25 cepas isoladas de secreções conjuntivais e 1 de orofaringe) de pacientes que apresentavam exclusivamente conjuntivite, procedentes de municípios do Estado de São Paulo onde ocorreram na mesma época casos confirmados de FPB (Pro-

missão em 1984 e 1985, São José do Rio Preto e Presidente Prudente em 1986, Serrana em 1986 e 1988, Serra Azul em 1988).

Grupo 3 — 20 cepas de *H. aegyptius* (20 cepas isoladas de secreções conjuntivais) isoladas de pacientes que apresentavam exclusivamente conjuntivite, procedentes de municípios do Estado de São Paulo onde ocorreram casos suspeitos de FPB** (Garça, Bauru e Lins em 1985 e Piracicaba em 1986, Pradópolis em 1987, São José do Rio Preto e Nova Granada em 1988).

Grupo 4 — 53 cepas de *H. aegyptius* isoladas de pacientes que apresentavam exclusivamente conjuntivite (51 cepas isoladas de secreções conjuntivais e 2 de orofaringe) procedentes de municípios do Estado de São Paulo onde não ocorreram casos confirmados ou casos suspeitos de FPB (Bastos em 1985, Restinga, Barretos, Vista Alegre do Alto, Dois Córregos, Ribeirão Preto, São Paulo e Guariba em 1986, Promissão e Guariba em 1987, Tanabi, Promissão, Fernandópolis e Ribeirão Preto em 1988).

Grupo 5 — 8 cepas de *H. aegyptius* procedentes de outros países, e 2 cepas padrões.

— *H. aegyptius* de outros países:

H-32974 — isolada de sangue de um caso de FPB ocorrido na Austrália.

F-3330, 172a, 175a, 145a, 180a, KC-1018 isoladas nos Estados Unidos da secreção da conjuntiva.

F-3331, isolada no Egipto, da secreção da conjuntiva.

— Cepas padrões: *H. aegyptius* NCTC - 8135
H. influenzae GB - 3291

Grupo 6 — 200 cepas de *Haemophilus sp*, 163 cepas de *H. influenzae* (80 de secreção conjuntival e 83 de orofaringe) e 37 cepas de *H. parainfluenzae* (6 de secreção conjuntival, 31 de secreção de orofaringe), isoladas em 1987 e 1988 durante surtos de conjuntivite, procedentes de diferentes municípios do Estado de São Paulo, onde ocorreram casos confirmados e casos suspeitos de FPB e onde não ocorreram casos.

Todas as cepas foram mantidas a -70°C , em caldo Levinthal acrescidos de 15% de glicérol ou mantidas liofilizadas a $+4^{\circ}\text{C}$.

* Confirmados clinicamente e pela presença de *H. aegyptius* no sangue ou líquido cefalorraquidiano ou na lesão purpúrica da pele.

** Clinicamente confirmado, sem confirmação laboratorial.

Foram produzidos 1 anti-soro com a cepa de *H. aegyptius* e 6 anti-soros contra os antígenos capsulares dos sorotipos de *H. influenzae*.

O soro anti-*H. aegyptius* foi produzido com a cepa 254/86 amostra esta, isolada do sangue de um paciente de FPB. Este soro foi absorvido e utilizado da seguinte forma:

- a) S-254 — soro anti-*H. aegyptius* produzido com a cepa 254/86, isolada a partir de cultura de sangue de um caso de FPB.
- b) S-254/254F — soro anti-*H. aegyptius* produzido com a cepa 254/86 e absorvido com a mesma cepa fervida a 100°C em banho-maria por 2 horas.
- c) S-254/329 — soro anti-*H. aegyptius* produzido com a cepa 254/86 e absorvido com a cepa 329/86, também isolada de líquido cefalorraquidiano de um caso de FPB.
- d) Soros capsulares a, b, c, d, e, f, produzidos com as cepas padrões dos tipos capsulares de *H. influenzae* SM-2, GB-3291, SM-72, SM-6, SM-7, SM-8, respectivamente.

O anti-soro de *H. aegyptius* foi produzido em coelhos albinos adultos com peso igual ou superior a 3 kg. A partir de uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente $1,2 \times 10^9$ bactérias/ml (escala 4 de MacFarland), e morta pela formalina 0,5% da seguinte forma:

- a) suspensão bacteriana de 6×10^8 bactérias/ml (escala 2 de MacFarland) com adjuvante completo de Freund; 1 ml deste antígeno foi inoculado por via intradérmica no dorso do animal, em 15 diferentes pontos.
- b) 30 dias após a inoculação intradérmica, 0,5 ml da mesma suspensão bacteriana com adjuvante incompleto de Freund foi inoculado em uma única dose por via intramuscular na coxa posterior.
- c) 7 dias após, 1 dose de 1 ml da suspensão bacteriana de 9×10^8 bactérias/ml (escala 3 de MacFarland) sem adjuvante, foi inoculada semanalmente, durante 4 semanas por via endovenosa.

Uma semana após a última inoculação, os animais foram sangrados e os anti-soros separados dos coágulos, foram conservados a -20°C, adicionado de 0,05% de azida sódica.

Os anti-soros capsulares de *H. influenzae* foram obtidos segundo a metodologia descrita no Procedural Manual for Production of Bacterial, Fungal, and Parasitic Reagent¹⁰.

As absorções do anti-soro S-254 foram feitas com a mistura de 1 volume de anti-soro diluído 1:2, com igual volume de células bacterianas cultivadas em caldo Levinthal por 18 horas, sob agitação em estufa a 36°C, coletadas por centrifugação e lavadas, uma vez, em PBS, 0,1M, pH 7,2. A mistura anti-soro-bactérias foi homogeneizada e deixada por 2 horas a 37°C e a seguir 18 horas a 4°C. Os anti-soros absorvidos foram obtidos após centrifugação a 6.000rpm por 20 minutos a +4°C.

As titulações foram feitas pela técnica de soroaglutinação em lâmina, utilizando como antígeno, uma densa suspensão bacteriana contendo aproximadamente 12×10^9 bactérias/ml, e adicionada de formalina a 0,5%. Foi utilizada solução salina a 2% para o controle da rugosidade das cepas bacterianas. As cepas de *H. aegyptius* foram testadas em diluições seriadas de 1:2 a 1:1024 dos soros S-254, S-254/254F e S-254/329, tendo sido consideradas como diluições de uso aquelas que apresentaram uma forte aglutinação (+++ ou ++++). Os 6 anti-soros capsulares de *H. influenzae* nas suas respectivas diluições de uso, foram também incluídos neste estudo.

O teste de aglutinação foi comparado com os padrões de restrição do gene rDNA que caracterizam as cepas de *H. aegyptius* associados a casos de FPB, pertencentes aos padrões 3 e 4¹².

RESULTADOS

Os resultados das titulações dos anti-soros S-254, S-254/254F e S-254/329 com a cepa n° 254/86 estão na tabela 1.

O título do anti-soro S-254 foi de 1:1024 e do anti-soro S-254/254F foi de 1:256; com o anti-soro S-254/329 não houve aglutinação em nenhuma diluição com a cepa 254/86.

Os resultados das soroaglutinações das 22 cepas de *H. aegyptius* do grupo 1 estão apresentados na tabela 2. Nesta tabela observamos que todas as cepas de *H. aegyptius* isoladas de casos de FPB no Brasil aglutinaram com o anti-soro S-254, em títulos que variaram de 1:64 a 1:256 (++++) e com o anti-soro S-254/254F, entre 1:32 e 1:128 (+++); nenhuma cepa do grupo 1 aglutinou com o anti-soro S-254/329.

Pela tabela 3 onde estão relacionados o número e percentual de cepas de *H. aegyptius*, pertencentes aos grupos 1, 2, 3 e 4, verificamos

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(4):221-227, 1989.

TABELA 1

Títulos homólogos aglutinantes dos anti-soros S-254, S-254/254F e S-254/329 obtidos com a cepa nº 254/86 de *H. aegyptius*

Soros	Diluições									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
S-254 (1)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
S-254/254F(2)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	—	—
S-254/329(3)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

- (—) Ausência de aglutinação
 (+) Aglutinação incompleta, muito fraca
 (++) Aglutinação incompleta, fraca
 (+++) Aglutinação completa, forte
 (++++) Aglutinação completa, muito forte
- (1) S-254 soro preparado com a cepa nº 254 — *H. aegyptius* isolada de sangue de um caso de FPB.
 (2) S-254/254F soro S-254 absorvido com a amostra homóloga fervida de *H. aegyptius* nº 254.
 (3) S-254/329 soro S-254 absorvido com antígeno não fervido da cepa nº 329/86 — *H. aegyptius* isolada de um caso de FPB.

TABELA 2

Aglutinação de cepas de *H. aegyptius* do grupo I isoladas de 17 casos de FPB, segundo os anti-soros e a origem das cepas

Material biológico	Número Cepas	S-254 (1/64)	S-254/254F (1/32)	S-254/329 (negativo)
Sangue	13	13/13	13/13	13/13
LCR	4	4/4	4/4	4/4
Secreção da conjuntiva	2	2/2	2/2	2/2
Secreção da orofaringe	2	2/2	2/2	2/2
Raspado de pele	1	1/1	1/1	1/1
Total de cepas	22	22/22	22/22	22/22

TABELA 3

Número e percentual de cepas de *H. aegyptius* dos grupos 1, 2, 3 e 4 segundo os resultados das aglutinações com os anti-soros S-254 e padrões de restrição do gene rDNA.

Grupo das cepas	Número de cepas estudadas	Aglutinação + rDNA + *	Aglutinação – rDNA + *	Aglutinação + rDNA – **	Aglutinação – rDNA – **
1	22	22 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
2	26	16 (61,5%)	0 (0,0%)	2 (7,7%)	8 (30,8%)
3	20	3 (15,0%)	1 (5,0%)	2 (10,0%)	14 (70,0%)
4	53	2 (3,8%)	0 (0,0%)	4 (7,5%)	47 (88,7%)

- (1) — cepas isoladas de casos confirmados de FPB
 (2) — cepas isoladas em municípios com casos confirmados de FPB
 (3) — cepas isoladas em municípios com casos suspeitos de FPB
 (4) — cepas isoladas em municípios sem casos de FPB

* rDNA + perfil de restrição dos tipos 3 ou 4 característicos das cepas invasivas

** rDNA – perfil de restrição diferentes dos tipos 3 ou 4

que os resultados das soroaglutinações e dos perfis de restrição foram concordantes em 92,5% das cepas estudadas, e que somente 8 cepas soroaglutinantes possuíam perfis de restrição diferentes dos tipos 3 ou 4 assim como 1 cepa tinha perfil de rDNA invasor e foi não aglutinante. Verificamos também que nos municípios onde ocorreram casos confirmados de FPB 61,5% das cepas isoladas da secreção da conjuntiva e ou orofaringe de pacientes que apresentavam exclusivamente conjuntivites, apresentaram aglutinação positiva e padrão de restrição característico de cepas invasivas, enquanto que apenas 3,8% de cepas isoladas nos municípios onde não ocorreram casos de FPB apresentam o mesmo perfil. Por outro lado 88,7% das cepas isoladas nos municípios onde não ocorreram casos de FPB, não aglutinaram com o soro S-254 e apresentaram perfil de restrição do gene rDNA diferentes dos tipos 3 e 4.

As cepas de *H. aegyptius* do grupo 5, onde inclusive estava a cepa isolada de um caso de FPB ocorrido na Austrália, não aglutinaram com os anti-soros S-254 e S-254/254F.

Nenhuma cepa de *Haemophilus sp* pertencente ao grupo 6 aglutinou com o anti-soro S-254 na diluição de uso (1:64).

Todas as cepas de *H. aegyptius* pertencentes aos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 foram testadas contra todos os anti-soros capsulares de *H. influenzae* resultando em aglutinação negativa.

A sensibilidade do método de soroaglutinação em lâmina foi de 97,7% e a especificidade de 89,6%.

DISCUSSÃO

O padrão antigênico da espécie tipo do gênero *H. influenzae* é bem conhecido¹⁸ devido seu grande interesse na clínica de doenças infecciosas, definindo-se pela presença de uma capsula polissacarídica que determina os sorotipos a, b, c, d, e, f. Com relação ao *H. aegyptius* poucos estudos foram realizados sobre a sua estrutura antigênica e consequentemente não se tem um esquema sorológico estabelecido.

PITTMAN & DAVIS¹⁹, em 1950, estudaram os determinantes antigênicos de *H. aegyptius* isolados durante um surto de conjuntivite no Texas, e mostraram que cepas de *H. aegyptius* são antigenicamente diferentes de cepas de

H. influenzae, formando um grupo sorológico relativamente homogêneo. As reações cruzadas sugeriam a presença de muitos componentes antigênicos, distribuídos de modo desigual entre as diferentes cepas de *H. aegyptius*. Cepas de *H. aegyptius* que apresentavam o mesmo perfil aglutinante com diferentes anti-soros foram classificadas em grupos epidemiologicamente relacionados.

Em nosso trabalho, o título elevado do anti-soro S-254 de *H. aegyptius* e a absorção do mesmo com a amostra homóloga fervida sugerem a presença de determinantes antigênicos de natureza termo lábil na superfície bacteriana. O soro S-254/329 (Tabela 1) mostrou que as 2 cepas são muito semelhantes, uma vez que a cepa 329/86 foi capaz de esgotar o soro S-254.

As cepas de *H. aegyptius* isoladas de casos de FPB ocorridos no Estado de São Paulo, Brasil, se caracterizaram por apresentarem o mesmo perfil de aglutinação com os três anti-soros, sugerindo uma constituição antigênica semelhante, enquanto que cepa padrão de *H. aegyptius* e aquelas originárias de outros países, inclusive a cepa isolada de um caso de FPB ocorrido na Austrália, não apresentaram os componentes antigênicos específicos das cepas isoladas no Brasil. Uma cepa com características específicas parece ter sido o agente etiológico da FPB no Brasil, desde 1984.

O *H. aegyptius* sempre foi considerado responsável somente por surtos epidêmicos de conjuntivite purulenta¹; a modificação das cepas de *H. aegyptius* associados a FPB poderia estar relacionada entre outros fatores, à aquisição destes novos componentes antigênicos.

Tais informações mostram a importância do desenvolvimento de estudos que permitam uma rápida caracterização das cepas de *H. aegyptius* quanto a sua capacidade invasora, em epidemias de conjuntivites purulentas por *H. aegyptius*.

Metodologias laboratoriais de maior sofisticação, até agora utilizadas para caracterizar as cepas de *H. aegyptius* invasivas são de difícil aplicação em rotina de diagnóstico pelo alto custo e tempo necessário para a sua realização. Há portanto, a necessidade de se dispor de uma técnica rápida, de custo mais baixo que apresentem uma boa sensibilidade e especificidade, que possa ser utilizada para "screening" nas investigações epidemiológicas de surtos de conjuntivites por *H. aegyptius*.

A soroaglutinação em lâmina pela sua fácil

reprodutibilidade, alta sensibilidade e especificidade já vem sendo utilizada com êxito na triagem de cepas invasivas de *H. aegyptius* nos surtos de conjuntivite ocorridos no Estado de São Paulo. O fato de o soro policlonal S-254 não apresentar reações cruzadas com outras espécies do gênero *Haemophilus* presentes na conjuntiva e orofaringe como foi observado na análise das 200 cepas pertencentes ao grupo 6, demonstra a indicação de seu uso como método de diagnóstico presuntivo.

CONCLUSÕES

- 1) As cepas invasivas de *H. aegyptius* podem ser caracterizadas através de seus antígenos de superfície, pelo método de aglutinação em lâmina com anti-soro policlonal específico.
- 2) O método de aglutinação em lâmina utilizando um anti-soro específico produzido com uma cepa de *H. aegyptius* isolada de um caso de FPB apresentou 97,7% de sensibilidade e 89,6% de especificidade.
- 3) A boa reprodutibilidade de baixo custo da técnica de soroaglutinação em lâmina permite sua utilização como método de diagnóstico presuntivo, para identificar cepas invasivas de *H. aegyptius* responsáveis pela FPB, possibilitando a implantação de medidas adequadas na vigilância epidemiológica e prevenção desse agravo.

SUMMARY

Brazilian purpuric fever. Fast characterization of invasive *Haemophilus aegyptius*.

Strains of *H. aegyptius* isolated during outbreak of Brazilian Purpuric Fever (BPF) in Brazil were characterized antigenically by slide agglutination test utilizing antiserum produced with a *H. aegyptius* strain isolated from blood culture from a patient with BPF. By means of this method, it were identified *H. aegyptius* strains responsible for outbreaks of conjunctivitis with identical antigenic characteristics to strains isolated from BPF. The sensitivity and specificity of slide seroagglutination test was 97.7% and 89.6% respectively; therefore this assay was efficient to be used as a screening method in the studies

of purulent conjunctivitis for detecting high risk populations for BPF, and to implement measures that will increase the efficiency of epidemiologic surveillance.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o Dr. Lee Harrison, do Meningites and Special Pathogens, Division of Bacterial Diseases, Center for Disease Control, Atlanta, Estados Unidos, pelo envio das cepas do grupo 5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBRITTON, W.L. — Infections due to *Haemophilus* other than *H. influenzae*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 36:199-216, 1982.
2. ALBRITTON, W.L.; SETLOW, J.K.; THOMAS, M.; SOTTNEK, F. & STEIGERWALT, A.G. — Heterospecific transformation in the genus *Haemophilus*. *Molec. gen. Genet.*, 193:358-363, 1984.
3. BRAZILIAN PURPURIC FEVER TASK FORCE — Preliminary report: epidemic fatal purpuric fever among children — Brazil. *M.M.W.R.*, 34:217-219, 1985.
4. BRAZILIAN PURPURIC FEVER TASK FORCE — Brazilian purpuric fever: *Haemophilus aegyptius* bacteremia complicating purulent conjunctivitis. *M.M.W.R.*, 35:553-554, 1986.
5. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP — Brazilian purpuric fever: epidemic purpura fulminans associated with antecedent purulent conjunctivitis. *Lancet* 2:757-761, 1987.
6. BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP — *Haemophilus aegyptius* bacteraemia in Brazilian purpuric fever. *Lancet*, 2:761-763, 1987.
7. BRÉNNER, D.J.; MAYER, L.W.; CARLONE, G.M.; HARRISON, L.H.; BIBB, W.F.; BRANDILEONE, M.C.C.; SOTTNEK, F.O.; IRINO, K.; REEVES, M.W.; SWENSON, J.M.; BIRKNESS, K.A.; WEYANT, R.S.; BERKELY, S.F.; WOODS, T.C.; STEIGERWALT, A.G.; GRIMONT, P.A.D.; MCKINNEY, R.M.; FLEMING, D.W.; GHEESLING, L.L.; COOKSEY, R.C.; ARKO, R.Y.; 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. DAVIS, D.J.; PITTMAN, M. & GRIFFITS, J.J. — Hemagglutination by the Koch-Weeks bacillus. *J. Bact.*, 59:427-431, 1950.
9. FLEMING, D.W.; BERKELY, S.F.; BROOME, C.V.; BRANDILEONE, M.C.C.; WALDMAN, E.A. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP — *Haemophilus aegyptius* conjunctivitis associated with Brazilian purpuric fever. In: ANNUAL

- MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 88. Washington, DC, 1986. **Program and abstracts**. Abstr. C2.
10. HARRELL, W.K.; ASHWORTH, H.; BRITT, L.E.; GEORGE, J.R.; GRAY Jr., S.B.; GREEN, J.H.; GROSS, H. & JOHNSON, J.E. — **Procedural manual of production of bacterial, fungal and parasitic reagents**. Atlanta, Biological Reagents Section, Laboratory Division, Centers for Disease Control, 1970. p.18-20.
 11. IRINO, K.; LEE, I.M.L.; KAKU, M.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; LEVY, C.E.; BERKLEY, S.E.; FLEMING, D.W.; SILVA, G.A. & HARRISON, L. — Febre purpúrica brasileira: resultados preliminares da investigação etiológica. *Rev. Inst. Med. trop. 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. KILIAN, M. & BIBERSTEIN, E.L. — *Haemophilus* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Robers and Smith, 1917. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. — *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.558-569.
 14. LEIDY, G.; HAHN, E. & ALEXANDER, H.E. — Interspecific transformation in *Haemophilus*: a possible index of relationship between *H. influenzae* and *H. aegyptius*. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 102:86-88, 1959.
 15. LEIDY, G.; JAFFEE, I. & ALEXANDER, H.E. — Further evidence of a high degree of genetic homology between *H. influenzae* and *H. aegyptius*. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 118:671-679, 1964.
 16. MAZLOUM, H.A.; KILIAN, M.; MOHAMED, Z. & SAID, M.D. — Differentiation of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophylus influenzae*. *Acta path. microbiol. scand.*, 90:109-112, 1982.
 17. McINTYRE, P.; WHEATON, G.; ERLICH, J. & HANSMAN, D. — Brazilian purpuric fever in central Australia. *Lancet*, 2:112, 1987.
 18. PITTMAN, M. — Variation and type specificity in bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J. exp. Med.*, 53:471-492, 1931.
 19. PITTMAN, M. & DAVIS, D.J. — Identification of the Koch-Weeks Bacillus (*Haemophilus aegyptius*). *J. Bact.*, 59:413-426, 1950.
 20. POHL, S. — DNA relatedness among members of *Actinobacillus: Haemophilus* and *Pasteurellae*. In: KILIAN, M.; FREDERIKSEN, W. & BIBERSTEIN, E.L., ed. — *Haemophilus, Pasteurella* and *Actinobacillus*. London, Academic Press, 1981. p.245-253.
 21. PORATH, A.; WANDERMAN, K.; SIMU, A.; VIDNE, B. & ALKAN, M. — Case report: endocarditis caused by *Haemophilus aegyptius*. *Amer. J. med. Sci.*, 292:110-111, 1986.

Recebido para publicação em 20/12/1988.