

**MARIA ADELAIDE GALVÃO DIAS**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE**  
***Histoplasma capsulatum***  
**EM MORCEGOS EM ÁREAS URBANAS**  
**DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2009

**MARIA ADELAIDE GALVÃO DIAS**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Histoplasma capsulatum*  
EM MORCEGOS  
EM ÁREAS URBANAS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

São Paulo  
2009

FOLHA BANCA

*CERTIFICADO*

*Dedico este trabalho aos meus filhos Aline, Henrique e Ana Luiza, que me desculpem pela ausência em alguns momentos e por momentos de nervosismo, e também aos meus sobrinhos. E que todos possam alcançar seus sonhos por mais difícil que lhes pareça, que tenham sempre em mente que existe um ser superior “Deus” que sempre nos impulsiona e zela por nós.*

*Ao meu esposo e companheiro Marcos, pai maravilhoso, sempre presente, obrigada pela sua compreensão e desculpe pelos momentos de ausência.*

*A minha mãe, por estar sempre presente me apoiando, incentivando em todos os momentos de minha vida, minha companheira e amiga muito obrigada por ser tão dedicada, estando sempre pronta a me ajudar.*

*Ao meu paizinho, onde quer que esteja, sei que esteve presente comigo durante esta jornada, agradeço pelo apoio que me deu em vida.*

*À Zenilda, minha secretária do lar e amiga, obrigada pelo carinho e dedicação com meus filhos.*

*Aos meus tios Manoel, Joel e Josias que sempre me apoiaram, me incentivaram e na falta de meu pai me aconselharam como verdadeiros pais, e a todos familiares que mesmo à distância sempre me apoiaram. Enfim, ao meu querido irmão Bosco que sempre disse que eu poderia.....sim agora eu sei .....eu posso.....*

*Agradeço ao Professor Dr. Carlos Pelleschi Taborda que me motivou, orientou e, principalmente, por ter acreditado em meu trabalho, me incentivando nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo apoio quando eu mesma não acreditava que poderia dar certo e por fazer com que eu enxergasse um novo caminho a seguir. Deixo aqui um registro da minha profunda admiração e respeito pelo Professor, profissional e amigo que sempre foi. Obrigada.*

## AGRADECIMENTOS

- ◆ Agradeço a Deus por iluminar minha vida sempre, principalmente nos momentos mais difíceis, enviando pessoas tão maravilhosas e especiais para fazer parte da minha trajetória.
- ◆ Um agradecimento especial a uma amiga especial, que compartilhou vários momentos importantes de minha vida. Trabalhamos juntas, fizemos cursos juntas, por um período quis o destino um intervalo, mas logo estaríamos compartilhando o mesmo local de trabalho. Eu agradeço a oportunidade concedida e sua valiosa contribuição na reativação do Setor de Micologia, pela “bancada móvel” e pelo seu apoio e auxílio de todas as horas, tornando-se possível a realização deste trabalho. Deixo aqui o registro da minha profunda gratidão à Dr<sup>a</sup> Marilene Fernandes de Almeida. Obrigada.
- ◆ Agradeço a Dr<sup>a</sup> Elisa San Martin Mouriz Savani, por me auxiliar todas as vezes que eu precisei, por ajudar-me no início do meu aprendizado, e também por conseguir cepas de fungos para a nossa Micoteca, junto ao Instituto Adolfo Lutz.
- ◆ Agradeço ao amigo Dr. Hildebrando Montenegro Netto que me auxiliou muito, quando iniciei no Setor, apresentando-me ao ICB-II USP, onde tudo começou.
- ◆ Agradeço a Dr<sup>a</sup> Lucia Eiko e a Dr<sup>a</sup> Marly Matiko Maeda, pela paciência que tiveram comigo quando dividimos o mesmo espaço no Setor de Parasitologia (eu e a bancada móvel!!!), obrigada pelo companheirismo e amizade. Um agradecimento aos colegas do setor José Teodoro Damaceno, Izilda Cortes, Eloisa e Ângela.
- ◆ Agradeço ao Dr. Mauro Cintra Giudice pela grande contribuição neste trabalho, pela paciência, pela atenção e auxílio nos momentos em que eu mais necessitei. À Dr<sup>a</sup> Adriana A. Reis Menezes pelo apoio em todas as horas e principalmente pela sua amizade.
- ◆ Agradeço a Professora Dr<sup>a</sup>. Rosely Maria Zancopé Oliveira como grande colaboradora, pela atenção e suporte técnico. Obrigada.

- ◆ Sou grata a Dr<sup>a</sup> Elizabeth Amattuzi não só por incentivar-me, mas por me ajudar, me apoiar em um início bastante difícil.
- ◆ A Dr<sup>a</sup> Maria Lucia de Oliveira, obrigado por gestos amáveis como confeccionar artesanalmente e com muito capricho meu primeiro suporte de madeira para tubos. Pela criação do Banco de Dados para setor de Micologia, e por todo o suporte de informática, e principalmente pela paciência que teve comigo durante o período.
- ◆ Agradeço a uma amiga especial e colaboradora que conheci no trajeto a estagiária Juliana de Amorim, que me ajudou muito quando precisei me afastar por motivos de saúde, obrigada. Enfim a todos os estagiários que fizeram parte da micologia, principalmente ao 1º estagiário da micologia, Rodrigo de Barros no manuseio com os morcegos, a Leyva C.V. de Mello pela dedicação e apoio, e por fim ao nosso atual estagiário Leonardo C.P. Nogueira pela sua dedicação ao Setor de Micologia e colaboração nas ilustrações deste trabalho. Obrigada a todos.
- ◆ Agradeço ao Setor de Quirópteros, pela identificação dos morcegos deste projeto, o trabalho executado foi de grande importância neste estudo, muito obrigada a Adriana Rosa Ruckert e Miriam Martos Sodré .....muito obrigada.
- ◆ Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças transmitidas por Vetores, por todos os momentos vividos nesta trajetória e peço desculpas pelo nervosismo de algumas horas. Obrigada a todos sem exceção, pelos que me trataram sempre com carinho, enfim pela doçura de uns ou pela dureza de alguns colegas que na verdade serviram de mola para me impulsionar para que eu atingisse o meu melhor.
- ◆ Um obrigado especial a todos do Setor de Micologia/CCZ, à Iraci Grigorio como grande cooperadora e dedicação ao Setor, à Luciana Renata Jordão sempre ajudando e procurando soluções, uma grande parceira, à Marinalva Guedes dos Santos sempre disposta a ajudar e à Lyone Mônica Suh a amiga de todos, sempre prestativa e organizada.
- ◆ Um agradecimento especial aos funcionários da biblioteca do ICB, pela atenção e apoio ao trabalho.



◆ Aos amigos que fiz no Setor de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da USP, à Luciana Thomaz sou grata, por me auxiliar vários momentos deste trabalho. Aos amigos Shirley, Márcia, Adriana, Julian, Thor, Felipe, Renata, Fernanda, Paula, Alexandre, Marcelo, Rubens, Valda, Cássia, Glauce, Elza, Débora, Georgea e Alice, eu gostaria que vocês soubessem que foi um período maravilhoso, as participações em seminários, congressos, enfim por todos os momentos, vou sentir saudades, principalmente daqueles momentos de descontração.....que Deus ilumine a todos nós e a trajetória continua.

Este trabalho foi preparado de acordo com as Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, do Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2004.

*"Lutei, venci e guardei sempre a fé em Deus, por quem serei julgado".  
Carlos da Silva Lacaz*

## RESUMO

GALVÃO-DIAS, M. A. **Aspectos Epidemiológicos de *Histoplasma capsulatum* em morcegos em áreas urbanas do Estado de São Paulo**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A histoplasmose, uma micose sistêmica, é um importante problema de saúde pública, de distribuição mundial e uma infecção muito comum em regiões endêmicas. A infecção é causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, que cresce como fungo filamentosos em solo, guano de morcegos e aves, ou como uma levedura parasitária intracelular. A ocorrência de morcegos é relatada em quase todo o mundo e estes contribuem para manutenção deste fungo na natureza. Na cidade de São Paulo, Brasil, morcegos ocorrem em todas as regiões e em várias situações: usando sótãos e forro de telhado como abrigos ou adentrando residências, entre outras. Entre agosto de 2003 a dezembro de 2008, foram encaminhados ao Setor de Micologia do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo 2427 morcegos. Amostras de fígado e baço desses morcegos foram removidos em condições estéreis e inoculados, ambos, em Agar infusão de cérebro e coração (BHI) e em Agar Sabouraud Dextrose, incubados a 25 °C e 37 °C. As colônias suspeitas foram reincubadas em Agar Mycosel e identificadas pela morfologia e pela reversão em ML-gema (Mueller Hinton Broth com L-cisteína e gema de ovo) a 37 °C. O objetivo deste estudo foi estabelecer a prevalência do *H. capsulatum* em morcegos presentes na cidade de São Paulo e em outras cidades do Estado. Os 87 isolados de *H. capsulatum* (3,58%) foram todos de morcegos da família Molossidae, de hábito alimentar insetívoro, pertencentes a quatro gêneros e cinco espécies sendo 74 *Molossus molossus*, 10 *Nyctinomops macrotis*, 1 *Tadarida brasiliensis*, 1 *Molossus rufus* e 1 *Eumops glaucinus*. Para 3 espécies (*Molossus rufus*, *Nyctinomops macrotis* e *Eumops glaucinus*) trata-se do primeiro relato. Dos 2427 morcegos, 1728 morcegos eram procedentes da cidade de São Paulo (71,2%) e 699 morcegos eram originários de cidades do Estado de São Paulo (28,8%). Cinco cidades apresentaram espécimes positivos: 70 procedentes da cidade de São Paulo (80,5%) e 17 de outros municípios do Estado (19,5%): 4 de Jundiáí, 10 de Guarulhos, 2 de Osasco e 1 de Mogi Mirim. Para a análise das 61 amostras de fezes de morcegos recebidas, foram utilizadas as técnicas de inoculação em camundongo e semeadura em placa de Petri contendo meio de Agar Mycosel incubadas a 37 °C. Uma amostra positiva para *H. capsulatum* foi isolada do Agar Mycosel. Os resultados mostram que o *H. capsulatum* esta presente na população de morcegos presentes em áreas urbanas do Estado de São Paulo. Este fato é importante, porque morcegos contaminados podem ser fonte de disseminação e risco para pessoas ou animais adquirirem a infecção. O conhecimento da história natural da histoplasmose em áreas urbanas pode ter um importante papel no estabelecimento de estratégias de prevenção.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*. Morcegos. Epidemiologia. São Paulo.

## ABSTRACT

GALVÃO-DIAS, M. **Epidemiologic Aspects of *Histoplasma capsulatum* in bats from urban areas of State of São Paulo**. 89 p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Systemic histoplasmosis is an important health problem worldwide and a very common infection in endemic areas. Its causative agent, the thermodimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, grows in bat guano or bird droppings rich soils as filamentous fungi, or as parasitic intracellular yeast cells in hosts. Bats can be found in almost all the world and contribute to the maintenance of this fungus in nature. In many cities in Brazil, bats are found in urban areas and in many situations: house basements and/or roofs, fallen in the soil or even inside the houses, among others. Between August 2003 and December 2008, 2,427 bats, 1,728 from São Paulo City (71.2%) and 699 from other cities from São Paulo State, were sent to the Micology Section of Centro de Controle de Zoonoses of São Paulo City. The purpose of this work was to establish the prevalence of *H.capsulatum* in bats of São Paulo City and other cities from São Paulo State. Samples of spleen and liver from the animals were removed in sterile conditions and inoculated in Brain Heart Infusion Agar and in Sabouraud Dextrose Agar, incubated at 25 °C and 37 °C. The suspicious colonies were inoculated in Mycosel Agar and were identified by the morphology, as well as by the temperature-reversion after incubation in ML-egg yolk (Mueller Hinton Broth, with L-cysteine and hen egg yolk) at 37 °C. All 87 positive samples (3.58%) were isolated from insectivorous bats from Molossidae family, belonging to four genus and five species: 74 samples were from the specie *Molossus molossus*, 10 from *Nyctinomops macrotis*, 1 from *Molossus rufus*, 1 from *Tadarida brasiliensis*, and 1 from *Eumops glaucinus*. For three of these species (*Nyctinomops macrotis*, *Molossus rufus* and *Eumops glaucinus*) this is the first report of *H. capsulatum* isolation. Seventy positive bats were from São Paulo (80.5%), ten from Guarulhos City, four from Jundiaí City, two from Osasco City and one from Mogi Mirim City. Sixty-one samples of feces were analysed by mouse inoculation test and inoculation in Petri dishes containing Mycosel Agar. Our results showed that the *H. capsulatum* is present in bat populations living in urban areas. This is an important fact since *H. capsulatum* contaminated bats can be a source of contamination for people or animals in contact with them. The knowledge of the natural history of histoplasmosis in urban areas may be important for the establishment of prevention strategies.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*. Bats. Epidemiology. São Paulo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Regiões Espaçadoras Intergênicas .....	<b>30</b>
<b>Figura 2.</b> Morcego <i>Diclidurus scutatus</i> .....	<b>33</b>
<b>Figura 3.</b> Espécies de morcegos de relevância neste trabalho .....	<b>36</b>
<b>Figura 4.</b> Procedência das espécies de morcegos analisadas .....	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> Câmara de CO <sub>2</sub> para sacrifício dos animais pré-anestesiados.....	<b>41</b>
<b>Figura 6.</b> Macromorfologia de <i>Histoplasma capsulatum</i> isolados de morcegos: fase filamentosa e fase leveduriforme .....	<b>47</b>
<b>Figura 7.</b> Macromorfologia e micromorfologia de <i>H. capsulatum</i> isolados de vísceras e fezes de morcegos.....	<b>49</b>
<b>Figura 8.</b> Perfis genotípicos obtidos com o iniciador M13 .....	<b>51</b>
<b>Figura 9.</b> Perfis genotípicos obtidos com o iniciador GACA <sub>4</sub> .....	<b>51</b>
<b>Figura 10.</b> Positividade de <i>H.capsulatum</i> em morcegos: (A) distribuição relativa geral; (B) distribuição absoluta por espécie .....	<b>55</b>
<b>Figura 11.</b> Municípios do Estado de São Paulo, que apresentam morcegos positivos para histoplasmose .....	<b>57</b>
<b>Figura 12.</b> Abrigos e captura de morcegos em forros de residências.....	<b>60</b>
<b>Figura 13.</b> Vão de dilatação de prédio abrigando morcegos .....	<b>60</b>
<b>Figura 14.</b> Gráfico. Porcentagem de espécies da família <b>Molossidae</b> .....	<b>64</b>
<b>Figura 15.</b> Gráfico. Porcentagem de espécies da família <b>Phyllostomidae</b> ....	<b>65</b>
<b>Figura 16.</b> Gráfico. Porcentagem de espécies da família <b>Vespertilionidae</b> ...	<b>66</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Morcegos analisados para histoplasmose, segundo família e ano, 2003-2008,CCZ/SP .....	<b>52</b>
<b>Tabela 2.</b> Morcegos processados para histoplasmose em número e percentual, segundo identificação e ano, 2003-2008, CCZ/SP .....	<b>53</b>
<b>Tabela 3.</b> Morcegos analisados para histoplasmose segundo sexo e ano, 2003-2008, CCZ/SP .....	<b>54</b>
<b>Tabela 4.</b> Positividade para <i>H. capsulatum</i> em número e percentual de acordo com a espécie, 2003-2008, CCZ/SP .....	<b>55</b>
<b>Tabela 5.</b> Positividade para histoplasmose segundo gênero, espécie, sexo e percentual, 2003-2008, CCZ/SP .....	<b>56</b>
<b>Tabela 6.</b> Morcegos analisados para histoplasmose segundo procedência do animal e ano, 2003-2008, CCZ/SP.....	<b>58</b>
<b>Tabela 7.</b> Morcegos positivos para histoplasmose segundo ano, espécie, sexo, local da captura e circunstância da captura, 2003-2008, CCZ/SP.....	<b>61</b>
<b>Tabela 8.</b> Circunstância de captura de morcegos positivos para <i>H.capsulatum</i> , 2003-2008, CCZ/SP .....	<b>63</b>
<b>Tabela 9.</b> Fezes de morcegos processados para <i>H. capsulatum</i> , 2003-2008, CCZ/SP .....	<b>63</b>
<b>Tabela 10.</b> Percentual de morcegos analisados por região entre 2003 e 2008, CCZ/SP .....	<b>63</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>HISTOPLASMOSE</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Histoplasma capsulatum</i></b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>PATOGENIA</b>	<b>25</b>
<b>1.5</b>	<b>DIAGNÓSTICO LABORATORIAL</b>	<b>27</b>
<b>1.6</b>	<b>ANÁLISE MOLECULAR</b>	<b>29</b>
<b>1.7</b>	<b>ASPECTOS GERAIS SOBRE MORCEGOS</b>	<b>31</b>
<b>1.8</b>	<b>IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA</b>	<b>34</b>
<b>1.9</b>	<b>PATOGENIA EM MORCEGOS</b>	<b>34</b>
<b>1.10</b>	<b>ASPECTOS GERAIS DAS ESPÉCIES INSETÍVORAS DE RELEVÂNCIA NESTE TRABALHO</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>CAPTURA DE MORCEGOS</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>ANESTESIA E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>ISOLAMENTO DE <i>H. CAPSULATUM</i> EM VÍSCERAS DE MORCEGOS</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>ISOLAMENTO DE <i>H. CAPSULATUM</i> EM AMOSTRAS DE FEZES DE MORCEGOS</b>	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISE MOLECULAR DE <i>H. CAPSULATUM</i> ISOLADOS DE VÍSCERAS DE MORCEGOS</b>	<b>43</b>



<b>3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM OS INICIADORES</b>	
<b>GACA<sub>4</sub> E M13 .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E SEQUENCIAMENTO .....</b>	<b>45</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 ANÁLISE DOS MORCEGOS .....</b>	<b>52</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>89</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTOPLASMOSE

A histoplasmose, originalmente chamada de doença de Darling, também conhecida como histoplasmose clássica, é uma micose sistêmica de ocorrência mundial causada pelo *Histoplasma capsulatum*, fungo termodimórfico, encontrado em solo rico contendo fezes de morcegos e aves. Quando cultivado entre 25-27 °C apresenta-se na fase miceliana que constitui a forma saprofítica, apresentando macroconídios esféricos e tuberculados medindo entre 8-20 µm e quando cultivado entre 35-37 °C apresenta-se na fase leveduriforme, que constitui a forma infectante do fungo. Em tecidos, *H. capsulatum* apresenta-se sob a forma de pequenas células redondas ou ovais, medindo geralmente entre 1-5 µm, fagocitadas em sua maioria, muito semelhantes aos agentes da leishmaniose (LACAZ, 2002).

Entre 1905 e 1906 Samuel Taylor Darling procurava em suas necropsias casos suspeitos de leishmanioses, escolhendo doentes falecidos com quadros de leucopenia, febre irregular e hepatoesplenomegalia. Os três primeiros casos observados pelo patologista americano eram da região do Canal do Panamá e durante sua pesquisa achou que se tratava de um novo protozoário, o qual denominou *Histoplasma capsulatum* (LACAZ, 2002).

Em 1912, o pesquisador brasileiro Henrique Rocha Lima demonstrou a natureza fúngica, determinando *H.capsulatum* como um fungo leveduriforme.

Somente 22 anos depois foi realizado o primeiro cultivo, reconhecendo seu caráter dimórfico (ROCHA LIMA, 1912 e DE MONBREUN,1934 apud LACAZ, 2002).

Emmons (1949) foi o primeiro a fazer isolamento do fungo no solo, relacionando o habitat de morcegos com o patógeno (1958) quando estudou uma família que se mudou para uma casa em área rural, no entorno de Clarksburg (Maryland, EUA), cujo sótão era habitado por morcegos. A quantidade de guano

no sótão e nas áreas adjacentes à casa e o isolamento de *H. capsulatum* de vários lugares ao redor da residência sugeriram que essa era a fonte de infecção da doença. A colônia de morcegos encontrada foi identificada como *Eptesicus fuscus*, morcegos insetívoros. Dezesseis morcegos foram capturados e coletados fígado e baço para pesquisa do fungo, com resultados negativos. Quarenta e cinco de 66 (68%) amostras de solo foram positivas para *H. capsulatum*. O autor concluiu que a presença de morcegos era aparentemente o fator responsável pela infestação do solo.

Zeidberg et al. (1952), em Williamson County (Tennessee, EUA), relataram o crescimento de *H. capsulatum* em solo fertilizado com excretas de galinhas coletadas em diferentes locais de residências onde houve positividade para o teste de histoplasmina dos moradores. Das 299 amostras, 93 eram próximas às residências, 51 debaixo das habitações, 37 dentro de galinheiros, 14 em volta dos galinheiros, 25 em volta dos celeiros, 4 dentro dos celeiros, 45 de locais próximos a fontes de água, 25 de áreas abertas e 5 de outros locais. Desses locais, os que apresentaram positividade para *H. capsulatum* foram os galinheiros (13.5%), ao redor destes (14.3%) e debaixo das habitações (7,8%).

Shacklette et al. (1962) relataram o primeiro isolamento de *H. capsulatum* a partir de fígado e baço de morcegos insetívoros na região do Panamá. No estudo, os autores sugerem que a associação de *H. capsulatum* com fezes de morcego poderia ser um indicativo de que estes animais atuariam como reservatório.

Shacklette et al. (1969) relataram estudo realizado durante dois anos, em que os pesquisadores realizaram capturas de 21 espécies de morcegos, periodicamente em 13 locais como: cavernas, edifícios abandonados e sótão de residências, entre outros. Neste estudo os pesquisadores relataram diferentes taxas de infecção entre colônias da mesma espécie, diferentes taxas de infecção em um mesmo abrigo com espécies diferentes e diferentes taxas no mesmo abrigo em períodos diferentes.

Depois destes isolamentos diversos autores relataram à infecção em várias espécies de morcegos (KLITE e DIERCKS, 1965; DI SALVO et al., 1969; HOFF et al., 1981; CONSTANTINE, 1988; VARGAS-YAÑES et al., 1998; CANTEROS et

al., 2005), (Anexo A), e outros mamíferos silvestres, entre eles, roedores, marsupiais, tatus e primatas (ZANCOPE-OLIVEIRA e WANKE, 1986; NAIF et al., 1996). Locais como cavernas, grutas, galinheiros, prédios urbanos, porões ou sótãos, túneis ou minas abandonadas, quando habitados por morcegos ou aves, se tornam importantes focos de disseminação da doença. O fungo é encontrado naturalmente no solo e a presença de fezes favorece sua multiplicação mantendo as áreas endêmicas na natureza (EMMONS et al., 1966; ZEIDBERG et al., 1952; AJELLO, 1956; BARTLETT et al., 1982; SUZAKI et al., 1995; MARTINS et al., 2003; HUHN et al., 2005; VICENTINI-MOREIRA et al., 2008).

## 1.2 *Histoplasma capsulatum*

*Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum* é um fungo termodimórfico encontrado em solo, um importante patógeno humano com distribuição mundial.

É um eucarioto pertencente ao Reino Fungi e encontra-se na divisão (filó) Ascomycota, subdivisão (subfiló) Ascomytina, classe Ascomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Histoplasma* (Ajellomyces), espécie *Histoplasma capsulatum*, apresentando três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, das quais somente as variedades *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* são patogênicas ao homem (LACAZ et al., 1998).

*H. capsulatum* var. *duboisii* foi descrito pela primeira vez por Dubois et al. (1952), na região do antigo Congo Belga, atual República Democrática do Congo, através do isolamento do patógeno de lesões cutâneas.

Neste estudo, somente *H. capsulatum* var. *capsulatum* será abordada, *H. capsulatum* var. *duboisii* é encontrada na África e por último a *H. capsulatum* var. *farciminosum* que foi descrita apenas como patógeno de cavalos e mulas em algumas áreas da Europa, África e Ásia (LACAZ et al., 1998).

*H. capsulatum* existe na natureza na forma de micélio, assim como quando cultivado em Agar Dextrose Sabouraud, formando colônias de brancas a beges, quando incubadas entre 25 °C e 30 °C. Dois tipos de conídios são formados,

macroconídios e microconídios. Os macroconídios são tuberculados, medem em torno de 8  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$  e possuem parede espessa. Os microconídios são pequenos e possuem paredes lisas, medindo em torno de 2  $\mu\text{m}$  a 4  $\mu\text{m}$ , e são as formas infectantes. Na temperatura corpórea ou quando cultivado *in vitro* entre 36 e 37  $^{\circ}\text{C}$  o organismo se converte em levedura, com morfologia oval e pequena, medindo em torno de 2  $\mu\text{m}$  a 4  $\mu\text{m}$ . A levedura não é encapsulada, embora no tecido pareça ser envolta por uma zona clara, que foi erroneamente interpretado como sendo uma cápsula por Darling (KAUFFMAN, 2007).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo *H. capsulatum* é relativamente comum no Brasil e ocorre em várias regiões de forma endêmica, sendo comprovada através de inquéritos epidemiológicos através de testes cutâneos, indicando apenas contato prévio com o fungo (ZANCOPE-OLIVEIRA e WANKE, 1986; FAVA NETTO et al., 1967; 1976)

O fungo já foi isolado tanto de amostras ambientais, tais como em solo e fezes de morcegos, quanto de amostras clínicas provenientes de animais silvestres e domésticos e do próprio homem (ZANCOPE-OLIVEIRA e WANKE, 1986; NAIF et al., 1996).

Há registros de microepidemias de histoplasmose, em pessoas que foram infectadas após visitarem grutas ou estiveram em casas cujos forros possuíam contaminação maciça de fezes de morcegos ou aves (SCHMIDT et al., 1973; FAVA NETTO et al., 1976; SUZAKI et al., 1995; PEÇANHA MARTINS et al., 2000; TAYLOR et al., 1999; CURY et al., 2001; VICENTINI-MOREIRA et al., 2008; JULG et al., 2008).

Vários casos de histoplasmose disseminada em humanos têm sido assinalados em lactentes, idosos, transplantados, imunodeprimidos e pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), (ALVES, 1998, CASSOTI et al., 2006). A histoplasmose disseminada ocorre geralmente em pacientes imunodeprimidos, muitas vezes associada à tuberculose (ROCHA e SEVERO,

1994). Sathapatayavongs et al. em 1983 relataram o primeiro caso de histoplasmose em paciente com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

No Brasil em estudo realizado em 1996 a 2006 por Prado et al., 2009, os autores relatam o crescimento da histoplasmose como causa primária de morte associada ou não com AIDS. Nesse período observou-se a histoplasmose como terceira causa morte entre esses pacientes em relação às micoses sistêmicas (Anexo B).

Entretanto, a doença não se restringe somente a estas populações. Lacaz et al. (1999) relataram um caso de histoplasmose cutânea em uma criança de cinco anos, HIV negativo, natural e procedente da cidade de São Paulo, com lesões cutâneas não diagnosticadas clinicamente. Levi et al. em 2003 relataram também casos raros de histoplasmose do sistema nervoso central, como única manifestação da doença em pacientes sem deficiência de imunidade, sendo um adulto natural e procedente do município de Cáceres em Mato Grosso, e uma criança natural e procedente de Itapeverica da Serra em São Paulo. No caso da criança havia relato de contato com aves.

Em inquéritos epidemiológicos, com teste de reação à histoplasmina realizado em humanos, no Estado de São Paulo, encontraram positividade entre 9,6% a 86% conforme revisado por Lacaz, 2002.

Martins et al. em 2003 relataram uma microepidemia de histoplasmose pulmonar, ocorrida em Niterói, Rio de Janeiro, em que cinco crianças desenvolveram a doença, após limpeza de um forno desativado para produção de carvão vegetal.

No Estado da Bahia, Peçanha Martins et al. (2000) relataram um surto de histoplasmose envolvendo quatro membros de uma família, um adulto e três crianças após exposição a fezes de morcegos, relacionada à limpeza do forro da casa, no qual os animais se abrigavam. O adulto foi a óbito.

Em 2005 Martins et al. demonstraram em seu estudo em clínica privada de Pneumologia, realizado em 18 pacientes das cidades do Rio de Janeiro e Niterói moradores e residentes da área urbana, que a presença da histoplasmose pulmonar em áreas urbanas é uma realidade, e que pode acometer indivíduos

saudáveis, sendo muitas vezes subdiagnosticada devido aos sintomas inespecíficos e a remissão espontânea em muitos casos. A febre e o nódulo pulmonar foram os principais achados clínicos e radiológicos.

Há vários relatos de surtos associados ao acúmulo de fezes de morcegos, como a ocorrência de um surto da doença em Illinois, Estados Unidos em 1980, devido ao acúmulo de fezes de morcegos da espécie *Eptesicus fuscus*, encontradas quando trabalhadores realizavam a limpeza de sótão em uma torre de igreja. Entre as 73 pessoas que visitaram o local, quatro trabalhadores e mais 16 pessoas foram diagnosticadas com histoplasmose pulmonar aguda. Pela investigação epidemiológica o autor concluiu que não é necessário que as fezes dos morcegos estejam misturadas ao solo para que haja crescimento de *H. capsulatum* e que o fungo pode sobreviver no ambiente quente e seco de um sótão (BARTLETT et al., 1982).

Dois surtos, também ocorridos em Illinois, um em 2001, envolvendo trabalhadores que revolveram o solo de um galpão que tinha sido usado como depósito de alimento para animais e grãos, e outro, com indivíduos envolvidos na reconstrução de uma ponte, foram relatados. No primeiro surto, oito entre os 11 trabalhadores apresentaram anticorpos circulantes contra *H. capsulatum* que foram detectados pelas técnicas de Imunodifusão e Reação Fixação de Complemento. O segundo surto relacionado à reconstrução de uma ponte em 2003, na qual os trabalhadores observaram guano de morcegos. Seis dos 12 trabalhadores apresentaram diagnóstico confirmado de histoplasmose pelas mesmas técnicas. Os autores concluíram que os trabalhadores devem usar equipamento de proteção individual e técnicas de supressão de poeira quando trabalharem em áreas potencialmente contaminadas com fezes de pássaros ou morcegos (HUHN et al., 2005).

Existem diversos relatos de surtos de histoplasmose associadas a visitas de grupos turísticos a cavernas habitadas por morcegos. Um grupo de oito turistas japoneses adquiriram a infecção por entrarem e permanecerem por 2 horas em uma caverna próxima a Manaus, Brasil (SUZAKI et al., 1995).

Lyon et al. (2004) estudaram dois surtos envolvendo 51 pessoas, ocorridos entre outubro de 1998 e abril de 1999, em uma caverna na Costa Rica. O primeiro grupo consistia de 61 crianças e 14 adultos dos quais 44 pessoas (72%) foram diagnosticadas com histoplasmose aguda. No segundo grupo com 14 turistas dos Estados Unidos e Canadá, nove (64%) apresentaram a infecção.

Em 2008, Julg et al. relataram caso de três pesquisadores que adquiriram histoplasmose, após manterem-se aproximadamente por uma hora e meia, a cerca de um metro da entrada da caverna Tamana situada no grupo de ilhas de Trinidad e Tobago para observação das espécies de morcegos locais. Os pesquisadores utilizaram apenas luvas e não fizeram uso de proteção por máscara respiratória porque não haveria a necessidade de entrar no abrigo. Esse período de observação dos morcegos saindo da caverna foi suficiente para que os três pesquisadores adquirissem a infecção.

Na cidade de Arapeí, São Paulo, Vicentini-Moreira et al. (2008) relataram um surto ocorrido em 2007 em um grupo de 35 pessoas que visitaram uma caverna habitada por morcegos, que já havia sido anteriormente interdita após confirmação do isolamento de *H. capsulatum*. Para o diagnóstico foram utilizadas as técnicas de Imunodifusão Dupla (ID) e Immunoblotting (IB) como prova complementar. Na primeira amostra, coletada um mês após a exposição, apenas um indivíduo apresentou anticorpos anti-*H. capsulatum* na ID e 51% na IB. Em amostras coletadas dois meses após à exposição apresentaram 97% e 100% de reatividade respectivamente comprovando, segundo os autores, que esses indivíduos certamente entraram em contato com o fungo na caverna visitada.

O grupo de Benevides (2007) do Serviço de Clínica Médica do Hospital Heliópolis, na cidade de São Paulo, relatou caso de histoplasmose adrenal bilateral em homem idoso imunocompetente morador de área urbana na cidade de São Paulo, com relatos em quais o paciente costumava frequentar áreas de pesca. Os pesquisadores relatam não ser frequente a histoplasmose disseminada acometendo a glândula adrenal, entretanto, ocorre mais em pacientes imunossuprimidos e de forma unilateral.



## 1.4 PATOGENIA

A histoplasmose inicia-se através da inalação de microconídios da fase miceliana do fungo *Histoplasma capsulatum*, que chegam aos alvéolos pulmonares, onde ocorre a diferenciação de microconídios em leveduras, as quais são fagocitadas por macrófagos. As leveduras multiplicam-se dentro dos fagolisossomas e acabam lisando os macrófagos. A infecção, em geral, é controlada por células T auxiliares que reconhecem proteínas de choque térmico e os antígenos da parede celular de *H.capsulatum* (ALLEENDOERFER e DEEPE, 1997).

O principal mecanismo para as células T contribuírem na resposta imune protetora é pela via de liberação de citocinas que ativam macrófagos, a principal célula efetora que restringe o crescimento intracelular do organismo. A principal citocina envolvida na resposta imune protetora contra *H. capsulatum* é o Interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Assim como macrófagos e células dendríticas, as células Natural Killer (NK) são fundamentais para a resposta imune adquirida. Além da sua atividade citolítica, elas produzem algumas citocinas que incluem Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  (ALLEENDOERFER e DEEPE, 1997, 1998).

A importância das células T em humanos é indicada por um acentuado aumento na suscetibilidade à histoplasmose em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou naqueles com imunidade celular deficiente por agentes imunossupressores (WHEAT et al., 1990; GRAYBILL, 1988).

A infecção também está relacionada à quantidade inalada de conídios. Quando ocorre exposição leve (baixa quantidade de conídios inalados), tanto uma infecção primária como uma reinfecção, podem transcorrer sem sintomas e serem autolimitada. No caso de exposições moderadas ou intensas em locais fechados, onde há altas concentrações de propágulos do fungo, a maior parte dos indivíduos expostos neste ambiente, desenvolve a forma sintomática ocorrendo doença pulmonar, febre, tosse, cefaléia, dor torácica e fadiga, mas em geral ocorre melhora sem tratamento (PAULA e AIDÉ, 1985).

A doença ocorre sob várias manifestações clínicas e a maioria das infecções não é reconhecida clinicamente. Segundo Wheat e Kauffman (2003), a infecção aguda causada por *H. capsulatum* é assintomática em 50% a 90% dos casos.

Os propágulos de *H. capsulatum* podem ser inalados por pessoas que vivem em áreas endêmicas, no entanto, apenas um número pequeno delas desenvolverá a infecção sintomática podendo ser a histoplasmose pulmonar aguda, a histoplasmose crônica cavitária, infecção granulomatosa do mediastino e a fibrose mediastinal, entre outras. Na maior parte das pessoas infectadas os sintomas são amenos e quase nunca são reconhecidos como histoplasmose (KAUFFMAN, 2007).

Uma forma particular da infecção é a histoplasmose disseminada, que ocorre em indivíduos com exposição prévia ao fungo com quadros assintomáticos. A disseminação hematogênica ocorre através do sistema retículo endotelial e os fungos parasitam os macrófagos. Focos latentes do fungo podem permanecer viáveis em vários órgãos e, em indivíduos residentes em áreas endêmicas, muitas vezes, não é possível saber com certeza se a doença se trata de uma infecção antiga, uma reativação de infecção primária, ou nova infecção (KAUFFMAN, 2007).

No organismo do hospedeiro as primeiras células efetoras que respondem ao fungo *H. capsulatum* são os macrófagos. Entretanto, é complexo o papel dos macrófagos na histoplasmose, porque mesmo participando da imunidade, estas células promovem um ambiente propício e protetor, em que o patógeno acaba sobrevivendo e se replicando no interior dos fagolisossomos destas células (NOSANCHUK e GACSER, 2008).

Vários fatores de risco são associados ao início da disseminação de *H. capsulatum*, especialmente aqueles em que existe algum mecanismo de imunossupressão envolvido, tais como: pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), indivíduos transplantados ou com doenças hematológicas malignas e em indivíduos sob uso de corticosteróides. Na infância, a susceptibilidade pode estar relacionada à resposta imune celular, tornando as

crianças um grupo especial com risco a desenvolverem infecções graves (KAUFFMAN, 2007).

As manifestações clínicas da histoplasmose são bem diversas. Ocorrem, em sua maioria, infecções na forma assintomática, embora o fungo possa se propagar por todo o organismo. Essa infecção fúngica pode ser classificada, segundo Furcolow (1949 apud LACAZ et al., 2002) em: formas assintomáticas; formas benignas simulando um resfriado comum com ou sem eritema nodoso; formas moderadamente graves, acompanhadas de febre e tosse, com quadro clínico e radiológico de “pneumonia atípica”; formas graves com três tipos de lesões: pneumonite aguda; tipo progressivo agudo (com hepatoesplenomegalia, febre, tosse, dispnéia, e emagrecimento); tipo progressivo crônico (com lesões pulmonares escavadas) e formas localizadas (cutâneo-mucosa).

## 1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial definitivo deve ser realizado utilizando-se técnicas micológicas, histopatológicas e sorológicas.

No exame direto, uma das ferramentas utilizadas no diagnóstico micológico da histoplasmose, a demonstração da presença de células leveduriformes de *H. capsulatum* em urina, escarro, lavado brônquico, líquido, medula óssea e biópsias, através da microscopia de preparações a fresco ou utilizando-se hidróxido de potássio a 10%, é extremamente difícil. Melhor rendimento nestes casos é obtido através da observação por métodos de coloração tais como Wright, Giemsa e Grocott. Outro fator limitante ao exame direto a fresco ou corado é o tamanho reduzido e a similaridade de *H. capsulatum* com outros agentes causadores de micoses e outras parasitoses. Deste modo, torna-se essencial a identificação do fungo através de seu isolamento em cultivo para o diagnóstico definitivo da histoplasmose (RIPPON, 1988).

Para o cultivo, as amostras biológicas provenientes de pacientes com suspeita de histoplasmose devem ser cultivadas em meio de isolamento tais como Ágar Sabouraud, Mycosel, entre outros, com incubação a 25 °C durante 6 a 12

semanas (RIPPON, 1988). Nestes meios e temperaturas apropriados são observados dois tipos de conídios na hifa, o macroconídio tuberculado medindo em torno de 8  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro e microconídios de 2  $\mu\text{m}$  a 4  $\mu\text{m}$  com parede lisa. O fungo também pode ser isolado após inoculação animal, por via intraperitoneal, do material suspeito.

A confirmação da identificação do fungo requer a conversão à fase leveduriforme de *H. capsulatum*, porém esta etapa não é facilmente realizada, uma vez que depende das características fisiológicas de cada isolado (EISSEBERG e GOLDMAN, 1991). Quando convertidos à fase leveduriforme observam-se colônias glabras, lisas, branco-amareladas em que na microscopia evidenciam-se leveduras ovais, unibrotantes (LACAZ et al., 2002; RIPPON, 1988).

O diagnóstico histopatológico pode ser feito quando células leveduriformes são vistas parasitando macrófagos em cortes teciduais corados pela hematoxilina-eosina (HE). As leveduras são observadas como corpúsculos levemente basofílicos, esféricos, rodeados por um halo claro delimitado por uma parede celular fina e hialina (RIPPON 1988). Também é indicada a utilização da impregnação pela prata (Método de Gomori-Grocott). No entanto, a positividade encontrada na utilização de métodos de colorações especiais é somente de 50%. Resultados falso-positivos podem ocorrer quando outros fungos como *Pneumocystis carinii* ou artefatos de coloração estão presentes (WHEAT, 1996).

No diagnóstico da histoplasmose as técnicas sorológicas são fundamentais para o diagnóstico, uma vez que o procedimento de isolamento do agente é demorado e com baixa sensibilidade. Vários ensaios sorológicos são utilizados para detectar anticorpos específicos contra o fungo. Historicamente, a identificação de anticorpos circulantes contra *H. capsulatum* em soro humano tem se mostrado importante no diagnóstico confirmatório, bem como no prognóstico da doença (GUIMARÃES et al., 2006).

Atualmente as técnicas sorológicas utilizadas para diagnóstico da infecção fúngica são a Imunodifusão e a Reação de Fixação de Complemento (utilizada em menor frequência). A técnica mais utilizada para detecção de anticorpos é a

imunodifusão com sensibilidade de 70 a 100% de especificidade, dependendo da forma clínica. A técnica de Reação de Fixação de Complemento apresenta uma menor especificidade entre 60 e 90% (GUIMARÃES et al., 2006).

Testes para detecção de anticorpos são mais úteis em pacientes com histoplasmose na forma crônica, em que o indivíduo já desenvolveu anticorpos suficientes para detecção. São necessárias de 2 a 6 semanas para a formação de anticorpos, inviabilizando assim o teste para indivíduos na fase aguda da doença ou em pacientes imunodeprimidos, cuja resposta imune é deficiente (KAUFFMAN, 2007).

Amostras como tecidos ou fluidos do corpo são enviados para o laboratório, são cultivadas em meio de Agar Sabouraud Dextrose e incubadas a 25 °C para permitir o crescimento da fase micelial de *H. capsulatum*. O sangue e tecidos são enviados aos laboratórios para cultura, bem como biópsias de tecidos para exames histopatológicos. São produzidos dois tipos de conídios na hifa, o macroconídio tuberculado medindo em torno de 8 µm a 15 µm de diâmetro e microconídios de 2 µm a 4 µm com parede lisa. A identificação dos macroconídios tuberculados é indicativa de histoplasmose. As leveduras de *H. capsulatum* são encontradas tipicamente dentro de macrófagos, mas podem ser visualizadas também livres no tecido (KAUFFMAN, 2007).

## 1.6 ANÁLISE MOLECULAR

Vários métodos fenotípicos e genotípicos são utilizados para avaliar e caracterizar melhor a distribuição e frequência de fungos e das doenças causadas por eles.

Em revisão feita por Lacaz et al. (2002), os autores indicam que para estudos de sistemática e evolução dos fungos, grande número de propriedades e marcadores fenotípicos são importantes.

A observação macroscópica e microscópica dos fungos, assim como características fisiológicas e bioquímicas favorece a identificação da maioria dos representantes do reino Fungi.

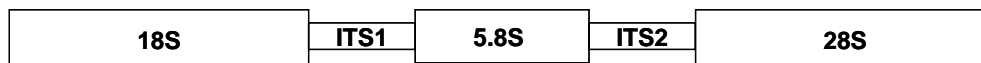
Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas aos fungos com a finalidade de diagnóstico, identificação laboratorial e como marcadores epidemiológicos.

Para a histoplasmose estas técnicas se mostraram importantes ferramentas na compreensão da epidemiologia da doença, tanto na determinação de novas zonas endêmicas como na relação do hospedeiro com as fontes de infecção (REYES-MONTES et al., 2000).

Entre os métodos de tipificação Gaur et al. (1981) destacaram-se em estudos na fenotipagem de *H. capsulatum* ao introduzir isoenzimas com o propósito de analisar as variações em isolados de solo obtidos de quatro áreas nos EUA, em que foi observada diversidade fenotípica entre as cepas.

Spitzer et al. (1989) realizaram as primeiras aplicações em estudos epidemiológicos utilizando sondas moleculares obtidas de seqüências específicas do DNA clonado de *H. capsulatum*. Esses autores ampliaram os estudos de tipificação de cepas incluindo isolados de solo com o objetivo de determinar diferenças entre os isolados clínicos.

White et al. (1990) descreveram que a unidade de DNA ribossomal (rDNA) nuclear consiste uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 26S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS, Internal Transcribed Spacer). A região ITS, localizada entre o 18S e 26S inclui dois espaços (ITS1 e ITS2) separados por uma região conservada, a 5.8S. Diferenças interespecíficas na seqüência do ITS1 e ITS2 têm sido utilizadas para detectar e identificar espécies de fungos (Figura 1).



**Figura 1.** Regiões Espaçadoras Intergênicas ITS 1 – ITS 2.

No Brasil existem poucos estudos de epidemiologia molecular no que se refere a histoplasmose. Isolados de humanos, animais e de solo foram comparados por DNA fingerprinting no estado do Rio de Janeiro por Muniz et al.

(2001). Nesta pesquisa utilizando a técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA - Polymerase Chain Reaction) os autores observaram 100% de similaridade entre os isolados de solo com isolados de animais e isolados clínicos, sugerindo que a fonte de infecção fosse a mesma para animais e a população local. Muniz comparou os isolados do Rio de Janeiro com isolados dos EUA que distinguiram em menos de 70% de similaridade.

Zancope-Oliveira et al. (2005) realizaram primeiro estudo da epidemiologia molecular da histoplasmose no Brasil, em que os autores analisaram o polimorfismo genético, através da técnica de RAPD-PCR em *H. capsulatum* isolados de diferentes regiões do Brasil.

Taylor et al. (2000, 2005) realizaram tipificação molecular de *H. capsulatum* isolados de morcegos da região do México, pelo método de RAPD-PCR, relatando diversidade genética e sugerindo diferentes populações de *H. capsulatum* na região.

## 1.7 ASPECTOS GERAIS SOBRE OS MORCEGOS

O morcego é o único mamífero com a capacidade de voar e representa cerca de um quarto de toda a fauna de mamíferos do mundo, e constitui o segundo maior grupo de mamíferos. Estão distribuídos por todo o mundo com exceção de regiões polares e de ilhas muito afastadas dos continentes.

A ordem Chiroptera (cheiros=mão e pteron=asa, animal com mão transformada em asas), é formada por 18 famílias, compostas por 202 gêneros e 1120 espécies (SIMMONS, 2005), representando 22% das espécies conhecidas de mamíferos. Subdivide-se em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. Os Megachiropteros incluem apenas uma família, os grandes morcegos frugívoros conhecidos como raposas voadoras (Pteropodidae), que podem atingir até 1,70 m de envergadura. A subordem Microchiroptera inclui as 16 famílias e 930 espécies), não ocorrendo apenas nas regiões polares.

No Brasil são conhecidas nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies e constituem a segunda ordem em espécies, superada apenas pela ordem

Rodentia, com 235 espécies. Habitam todo território nacional ocorrendo na Amazônia, no Cerrado, na Mata Atlântica, no Pantanal, no árido Nordeste, nos pampas gaúchos e em áreas urbanas (REIS et al., 2007).

Os morcegos insetívoros ocorrem em quase todo mundo e compreendem cerca de 70% das espécies (BREDET et al., 1996). São freqüentemente encontrados nas áreas urbanas, atraídos pela população de insetos, que por sua vez são atraídos pela iluminação pública (RYDELL e RACEY, 1995).

No Brasil, os morcegos insetívoros representam mais de 50% das espécies, os frugívoros quase 30% e os nectarívoros 15%. Os carnívoros, hematófagos e piscívoros juntos somam menos que 5% das espécies. Nove espécies brasileiras são consideradas ameaçadas de extinção. Vinte e nove das 167 espécies brasileiras já foram registradas explorando refúgios em habitações humanas (sótãos, porões, persianas, telhados, etc.) ou em suas proximidades (TADDEI, 1996; ESBÉRARD et al., 1999).

Em várias línguas, os morcegos são associados a camundongos ou ratos. Em espanhol são chamados de *murcielagos* (camundongos velhos), em francês recebem o nome de *chauve-souris* (camundongo careca), em alemão de *fledermaus* (rato voador) (REIS et al., 2007). Em chinês são chamados de *sein-shii* que quer dizer camundongo celestial e na língua dos Astecas (povo que viveu onde hoje é o México) eram chamados de *quimich-papalotl* que significa camundongo borboleta (ARELLANO-SOTA, 1988).

O próprio nome morcego é derivado do latim que é *muris* (rato) e *coecus* (cego). Em grego é *vespertilio* e em latim é *nycteris*, que são nomes relacionados ao hábito de vida noturna (Reis et al., 2007). Os estudos atuais mostram que na verdade, os morcegos são filogeneticamente distantes dos roedores, e são do ponto de vista evolutivo, mais próximos dos primatas. A ordem Chiroptera pertence à superordem Archonta, juntamente com a ordem Primata (subordem Dermoptera e Euprimates) e a ordem Scandentia (MCKENNA e BELL, 1997).



Morcegos em geral apresentam alta longevidade se comparados a mamíferos do mesmo porte: enquanto um rato de 40 gramas vive até dois anos, o morcego hematófago pode viver até 20 anos na natureza (BARNARD, 2005).

Como animais noturnos, eles têm poucos cones na retina, uma estrutura relacionada com a percepção de cores. No entanto não são cegos, embora todas as famílias brasileiras usem a ecolocalização para se orientar, alguns frugívoros maiores também se localizam pela visão. Por utilizar primariamente o sistema de ecolocalização, os olhos são pequenos, e as orelhas são grandes, o *tragus* (apêndice membranoso na abertura auricular) bem desenvolvido e as ornamentações nasais e faciais muitas vezes estão presentes (REIS et al., 2007).

Para esses animais noturnos uma coloração viva seria de pouca utilidade, por isso há apenas variações entre o preto e o pardo, com algumas espécies ruivas ou amareladas. Mesmo assim podem ocorrer pelagens brancas (Figura 2), como nas espécies de *Dicliduros* (REIS et al., 2007) .



**Figura 2.** Morcego *Diclidurus scutatus*, durante o período deste estudo, somente um espécime foi processado para histoplasnose, em SP.

## 1.8 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA

Estudos estabeleceram o papel ecológico dos morcegos insetívoros como agente controlador da população de insetos em área urbana. Segundo esses estudos os morcegos são capazes de ingerir mais da metade do seu peso em insetos e a vida nas cidades seria insuportável sem os morcegos para controlar a população de insetos (GOULD, 1955; GREENHAL, 1982).

Os morcegos que se alimentam de néctar, pólen ou frutos têm um papel importante na polinização de uma grande variedade de espécies de plantas. O valor comercial dos produtos agrícolas de importância para humanos, cuja semente é dispersa por morcegos, é estimado em centenas de milhões de dólares anualmente. Os morcegos fitófagos (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* e *Carollia perspicillata*) são freqüentemente encontrados em florestas secundárias ou áreas onde a vegetação original foi derrubada e uma floresta regenerada está se formando (WILSON, 1997).

Quanto aos morcegos hematófagos, o guano (fezes) depositado no fundo das cavernas é usado como fertilizante (NOWAK, 1991) e também é a base da cadeia alimentar em ambiente cavernícola (cadeia detritívora), permitindo a sobrevivência de grande número de espécies parasitas que por sua vez servem de alimento para animais de outros níveis da cadeia alimentar. (AGUIAR e TADDEI, 1996).

## 1.9 PATOGENIA EM MORCEGOS

Klite e Diercks (1965) em seus estudos observaram a anatomia intestinal de *Molossus major* e *Carollia perspicillata* constatando que esses morcegos possuem comprimento intestinal total em média de 12,3 cm e 20 cm respectivamente, não apresentando a região do intestino grosso, ceco e apêndice.

Nestes animais, o intestino, em comparação com o intestino de camundongos é de três a cinco vezes menor. Com uso de um marcador (indigo-

carmine), observaram que o tempo do trânsito intestinal era de aproximadamente 15 minutos.

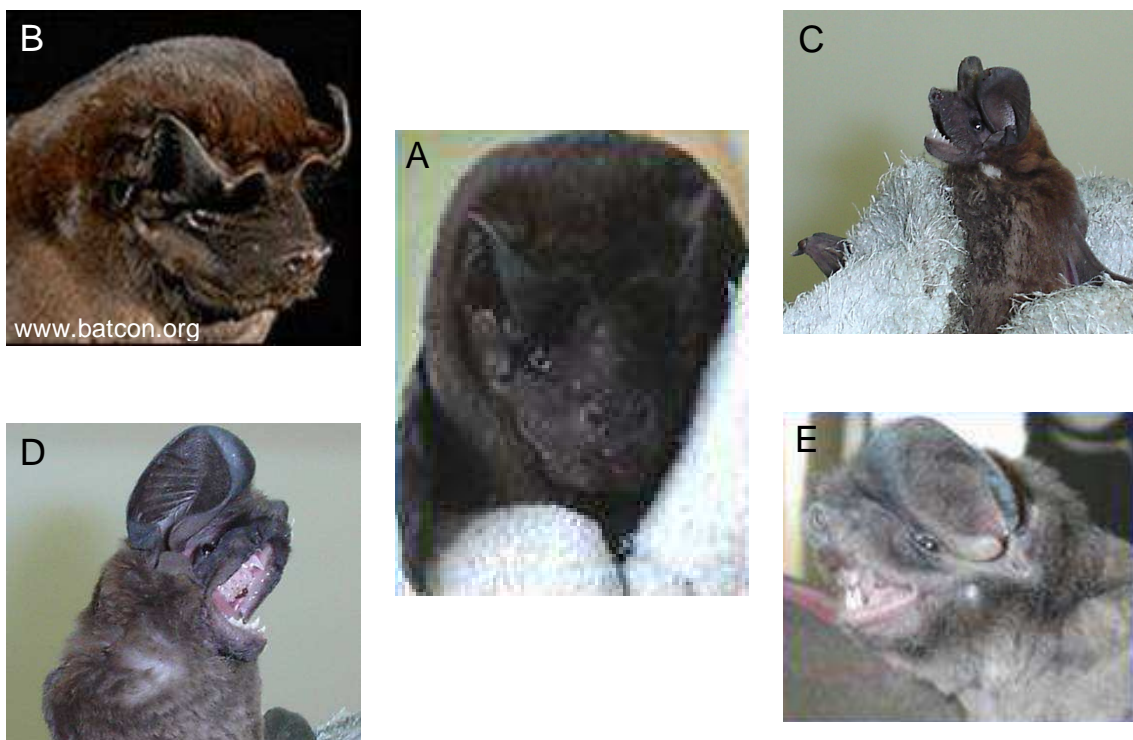
Segundo McMurray e Greer (1979) morcegos têm um trato intestinal extremamente curto, e poderiam rapidamente eliminar o patógeno por esta via. A ativa multiplicação de leveduras no tecido extra lúmen foi demonstrada por exames histopatológicos de *Molossus molossus* quando infectados com *H. capsulatum* que são capazes de eliminar em suas fezes fungos viáveis por um longo período.

Em morcegos a morbidade ou mortalidade atribuída a *Histoplasma capsulatum* foi demonstrada por inoculação intraperitoneal em *Tadarida brasiliensis*. Foi observada uma taxa de mortalidade de 80%, de 7 a 34 dias pós-infecção.

A morbidade em alguns animais foi evidenciada desde os primeiros dias após a inoculação. Em outros animais os sinais de irritabilidade, letargia, recusa de alimentação e diarreia foram observados por vários dias até a morte. (HOFF e BIGLER, 1981).

Segundo estudos realizados por Greer e McMurray (1981) em morcegos *Artibeus lituratus*, após infecção experimental com altas doses ( $10^4$  ou  $10^6$ ) de fragmentos viáveis de *Histoplasma capsulatum* via intraperitoneal ou intranasal, houve rápida disseminação do fungo no baço, fígado, pulmão e intestino culminando na morte de alguns morcegos em 2 a 3 semanas produzindo doença sistêmica em aproximadamente metade dos morcegos com o baço e fígado mais freqüentemente envolvido.

### 1.10 ASPECTOS GERAIS DAS ESPÉCIES DE MORCEGOS INSETÍVOROS DE RELEVÂNCIA NESTE TRABALHO



**Figura 3.** Espécies de morcegos de relevância neste trabalho: (A) *Molossus molossus*; (B) *Molossus rufus*; (C) *Tadarida brasiliensis*; (D) *Nyctinomops macrotis*; (E) *Eumops glaucinus*.

***Molossus molossus*** (PALLAS, 1766 apud REIS et al., 2007), (Figura 2A).

Essa espécie é encontrada na Florida (EUA), México, América Central, Caribe, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname, Brasil, Paraguai, Peru, norte da Argentina.

No Brasil está amplamente distribuída com registro em 16 estados. São exclusivamente insetívoros. As fêmeas apresentam dois períodos reprodutivos por ano na estação úmida e desenvolvem apenas um filhote por gestação. São encontrados tanto em áreas urbanas ocupando forros de residência e outras construções quanto em áreas não urbanizadas ocupando ocos de árvores (REIS et al., 2007).

***Molossus rufus*** (GEOFFROY, 1805 apud REIS et al., 2007), (Figura 3B).

Distribui-se em Sinaloa (México) e por toda América Central e América do Sul, com exceção do Uruguai e Chile. No Brasil há registro dessa espécie em 15 estados. São morcegos insetívoros e costumam dividir abrigo com *Molossus molossus*. As fêmeas são poliétricas, termo que se refere à capacidade das fêmeas de engravidar em quase todos os meses do ano (Reis et al., 2007).

***Tadarida brasiliensis*** (GEOFFROY, 1824 apud REIS et al., 2007), (Figura 3C).

A distribuição dessa espécie estende-se dos Estados Unidos, México, América Central a América do Sul. No Brasil a distribuição não é uniforme e há registro em 7 estados.

O pico de nascimentos de filhotes ocorre entre o final da primavera e início do verão. Formam-se grandes colônias maternidades nas quais os filhotes permanecem todos juntos com fêmeas adultas no seu entorno. No Brasil ocupa cavernas e se adaptou ao ambiente urbano ocupando telhados, forros e outras construções humanas (REIS et al., 2007).

***Nyctinomops macrotis*** (GRAY, 1840 apud REIS et al., 2007), (Figura 3D).

Distribuem-se na América do Norte, Central e do Sul. No Brasil há registro em 8 estados. Esta espécie é a maior entre as espécies do seu gênero entre as que ocorrem no Brasil.

O nascimento dos filhotes ocorre entre o final da primavera e início do verão. Formam colônias maternidades, nas quais o macho é segregado. As fêmeas têm um filhote por parto (REIS et al., 2007).

***Eumops glaucinus*** (WAGNER, 1843 apud REIS et al., 2007), (Figura 3E).

Habitam parte dos Estados Unidos (Flórida), América Latina continental desde o México até o Brasil. Alimentam-se de insetos no ar.

São poliestro e geralmente produzem um filhote por gestação. É uma espécie florestal, mas pode se abrigar em ocos de árvores, frestas de rochas e construções. Formam colônias pequenas, 9 a 32 indivíduos (REIS et al., 2007).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar o papel dos morcegos na epidemiologia da histoplasmose, a partir de animais abrigados em área urbana da cidade de São Paulo e de outros municípios vizinhos.

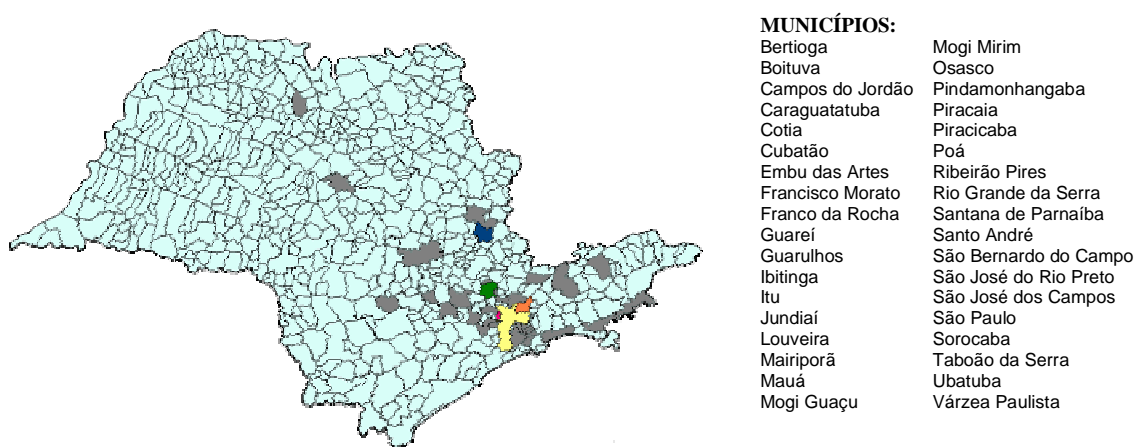
### 2.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer a prevalência de *H. capsulatum* em morcegos presentes no Município de São Paulo e de algumas cidades do Estado;
- Caracterizar morfológicamente os fungos isolados a partir das amostras processadas;
- Analisar a frequência das espécies de morcegos infectadas com *H. capsulatum*;
- Analisar a frequência da infecção em relação ao sexo dos animais;
- Analisar a frequência de contaminação ambiental por *H. capsulatum* em fezes coletadas nos abrigos;
- Determinar o polimorfismo genético entre os diferentes isolados de *H. capsulatum*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CAPTURA DE MORCEGOS

Os morcegos recebidos ou capturados foram procedentes da cidade de São Paulo e cidades do interior do Estado de São Paulo. A localização das cidades de procedência dos espécimes é apresentada na figura 4.



**Figura 4.** Procedência das espécies de morcegos analisadas.

Os animais foram capturados por técnicos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), utilizando puçás ou redes tipo “mist net” e transportados em gaiolas aramadas ou sacos de algodão, e alguns foram entregues pelo próprio município.

Todos os morcegos, recebidos vivos ou mortos, em bom estado de conservação foram processados. O presente trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão Científica do CCZ e Comissão de Ética da Universidade de São Paulo.

A identificação das espécies de morcegos foi realizada avaliando-se as características morfológicas e morfométricas de cada animal, de acordo com a chave de identificação de Visotto e Taddei (1973), no CCZ – Setor de Quirópteros.



### 3.2 ANESTESIA E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os morcegos recebidos vivos foram pesados em saco de algodão em dinamômetro de Newton. Esse procedimento foi realizado para determinar a dose/volume de anestésico que seria utilizada para o sacrifício dos animais (ALMEIDA et al., 2005).

O anestésico utilizado foi o cloridrato de ketamina (Vetanarcol®, de uso veterinário), via intramuscular, músculo peitoral, de ação rápida, na dose de 50 mg/kg. Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> (Figura 5).



**Figura 5.** Câmara de CO<sub>2</sub> para sacrifício dos animais pré-anestesiados.

### 3.3 ISOLAMENTO DE *H. capsulatum* EM VISCERAS

Para coleta das vísceras, realizou-se assepsia na parte abdominal do animal com álcool 70%. A retirada do fígado e baço foi feita de forma asséptica em fluxo laminar de segurança biológica classe II, com exaustão externa.

Os órgãos foram macerados com gral e pistilo de porcelana, estéreis, acrescentando-se 3 mL de salina com cloranfenicol 200 mg/L. Do homogeneizado foram distribuídos 0,5 mL/tubo, em dois tubos contendo Ágar Sabouraud Dextrose

com cloranfenicol 200 mg/L e dois tubos de Ágar infusão de cérebro e coração (BHI) com cloranfenicol 200 mg/L suplementado com 0,1% L-cisteína, 1% glicose sendo um tubo de Sabouraud e um de BHI incubados a 25 °C e um tubo de Sabouraud e um de Ágar infusão de cérebro e coração (BHI) incubados a 37 °C (Anexo C). Os cultivos em ambas as temperaturas foram realizados na ausência de CO<sub>2</sub> e protegidos de intensidade de luz artificial.

Foram realizadas triagens semanais por um período de 60 dias. A identificação dos isolados foi realizada com base na morfologia das colônias após crescimento em Agar Sabouraud dextrose, Ágar infusão de cérebro e coração (BHI) incubados à 25 °C e 37 °C e em ausência de CO<sub>2</sub> e protegidos de intensidade de luz artificial, utilizando técnicas clássicas de observação das características macroscópicas e microscópicas específicas. As colônias com suspeita de *H. capsulatum* foram repicadas em Agar Mycosel para observação da morfologia macroscópica e microscópica.

Para a análise dos aspectos microscópicos do fungo, foi retirada uma amostra da colônia, colocada em lâmina e adicionando-se o corante lactofenol azul de algodão. A leitura foi efetuada em microscópio óptico comum (400x), observando-se a presença dos macroconídios tuberculados e microconídios específicos do fungo.

Para a caracterização do dimorfismo dos isolados, foi realizada a reversão para a fase leveduriforme, a partir da sementeira do fungo na fase miceliana em meio ML-gema (FRESSATTI et al., 1992) e incubados a 37 °C com ausência de CO<sub>2</sub> e protegidos de intensidade de luz artificial, aproximadamente por 30 dias (Anexo C).

### **3.4 ISOLAMENTO DE *H. capsulatum* EM AMOSTRAS DE FEZES**

As amostras de fezes foram processadas em fluxo laminar de segurança biológica, com exaustão externa. Foi realizada uma suspensão do total da amostra em solução salina estéril com cloranfenicol (200 mg/L) em uma diluição 1:10 (v/w). A suspensão foi agitada por 5 minutos em agitador mecânico.

Após repouso de 15 minutos, o sobrenadante foi separado e 0,5 mL foi inoculado, via intraperitoneal, em 4 camundongos albino suíço. Após 60 dias foi realizado o procedimento da retirada de fígado e baço, e semeado em meio de cultura realizando-se o mesmo procedimento utilizado para morcegos. Em paralelo 1 mL da suspensão foi semeado em placa de Petri contendo meio Mycosel, incubados por 45 dias a 25 °C, protegidos de intensidade de luz artificial.

Os animais foram mantidos em isolamento no infectório do CCZ por 60 dias. Após esse período os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e transferidos para o fluxo laminar para retirada asséptica dos órgãos, fígado e baço. As vísceras foram processadas como já descrito para os morcegos.

### **3.5 ANÁLISE MOLECULAR DE *Histoplasma capsulatum* ISOLADOS DE VÍSCERAS DE MORCEGOS**

A caracterização molecular dos isolados foi gentilmente realizada pela Dr<sup>a</sup>. Rosely Zancopé do Laboratório de Micologia – Setor de Imunodiagnóstico do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz – RJ (FioCruz), por meio da técnica de Tipagem molecular através de DNA *fingerprinting*, utilizando os iniciadores de minisatélite M13 (5'-GACAGACAGACAGACA-3') e microsatélite GACA<sub>4</sub> (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') em uma reação em cadeia da polimerase (PCR).

O DNA foi extraído e purificado de acordo com os protocolos do laboratório de Micologia (FioCruz).

Extração de DNA: Após 48 horas de crescimento de *H.capsulatum* em meio Agar BHI, foi retirada uma colônia isolada e transferida para meio YPD Broth (Yeast-potato-dextrose) líquido (Sigma) acrescido de cisteína 0,1% para produção de massa fúngica. Após sete dias, as leveduras foram lavadas em PBS, e estocadas a -20 °C até o momento da extração. As células foram homogeneizadas em 500 µL de TES (50 mM EDTA Ácido etileno diamono tetracético, 20% Sacarose, 10 mM tris-HCl Tris-(hidroximetil)-aminometano, pH 8.0) e adicionados o mesmo volume de pérolas de vidro 0,5 mm de diâmetro.

A suspensão foi vigorosamente agitada em vortex por cinco vezes intercalando com incubação no gelo por 5 minutos. Após a lise celular, toda a suspensão foi retirada e foram adicionados 275 µL de acetato de amônia a 7 M, pH 7,0 e incubadas a 65 °C por 5 minutos e em seguida por 5 minutos no gelo.

Posteriormente, foram adicionados 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos; este procedimento foi realizado por três vezes.

O sobrenadante foi coletado e foi adicionado 1 mL de isopropanol gelado, centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 70% ao *pellet* e a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi secado em um Micro Vac MV-100 com aquecimento por 5 minutos, e o DNA foi hidratado com 50 µL de água Milli-Q.

### **3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM OS INICIADORES GACA<sub>4</sub> E M13**

A PCR foi realizada utilizando iniciadores específicos desenhados a partir da seqüência de oligonucleotídeos de regiões microsatélite GACA (5'-GACAGACAGACAGACA-3') e regiões minisatélites do fago M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'). Estes iniciadores amplificam seqüências hipervariáveis do DNA genômico (SCHONIAN et al., 1993).

Esta metodologia é uma ferramenta eficiente na diferenciação e caracterização dos isolados tanto ao nível de espécie, bem como amplamente utilizada na diferenciação genotípica de isolados da mesma espécie.

A reação de amplificação utilizando GACA<sub>4</sub> (Anexo D) foi feita em um volume final de 25 µL contendo 25 ng do DNA genômico, 10 mM Tris-HCL, pH 8.3, 50 mM KCl<sub>2</sub>, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) , 3 mM de acetato de magnésio (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 30 ng do iniciador (GACA)<sub>4</sub> e 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil).

A reação de amplificação utilizando M13 (Anexo D) foi feita em um volume

de 50  $\mu$ l contendo 10 ng do DNA genômico, 10 mM Tris-HCL, pH 8.3, 50 mM KCl<sub>2</sub>, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) , 3 mM de acetato de magnésio (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 10 ng do iniciador M13 e 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil).

As condições de amplificação foram idênticas para os dois iniciadores se deram em 35 ciclos compostos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de pareamento a 50 °C, e 20 segundos de extensão a 72 °C, seguido de uma extensão final de 6 minutos a 72 °C.

Para detecção dos “amplicons” realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1.4% em TBE (0.1 M Tris, 0.09 M ácido bórico, 0.001 M EDTA [pH 8.4]) por aproximadamente 6 horas a 70 V. O gel foi corado com brometo de etídio (0.5  $\mu$ g/mL em água destilada) por 30 minutos e lavado por 30 minutos com água destilada. O produto da PCR foi visualizado em um transiluminador de UV e depois fotografado.

### **3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO**

A reação de PCR foi constituída de 10 mM de tampão Tris-HCl contendo 50 mM de KCl, pH 8.0 (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2 mM deoxinucleosidio trifosfato (dNTP) (Invitrogen, Brasil) e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen,Brasil). Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram adicionados na concentração de 0,2 mM cada. O DNA foi adicionado na concentração de 20 ng num volume final de 100  $\mu$ l de reação. A desnaturação inicial de DNA foi obtida com aquecimento a 95 °C por cinco minutos. A seguir, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C e um minuto a 72 °C. Uma etapa final de extensão foi conduzida por dez minutos a 72 °C. O sucesso da amplificação da PCR foi confirmado pela visualização do produto da PCR no gel de agarose 2% após eletroforese. A eletroforese foi conduzida a 80 V por 60 min. O gel foi corado com brometo de etídeo por 30 min e

lavado com água destilada por mais 30 minutos e visualizado no transiluminador de UV.

Para o seqüenciamento utilizou-se o mesmo protocolo descrito acima para amplificação do rDNA incluindo ITS1, o gene 5,8 S do DNA ribossomal e ITS4 através da reação de cadeia de polimerase (PCR). Após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados usando QIAquick Spin Columns (Qiagen Corp., Chatsworth, Calif.) e foram reconstituídos com 30 µl de água destilada. O seqüenciamento foi realizado na PLATAFORMA DE SEQÜENCIAMENTO DE DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde se utilizou Big Dye reagente (Applied Biosystem, Foster City CA, USA) e o seqüenciador automático Applied Biosystems ABI Prism 3730 (Applied Biosystem, Foster CA, USA). O seqüenciamento foi realizado nas direções 5´ e 3´ em um volume de reação de 10 µl contendo 4 µl de “premix terminator”, 100 ng de DNA, 3,2 pMoles de iniciador “primer”.

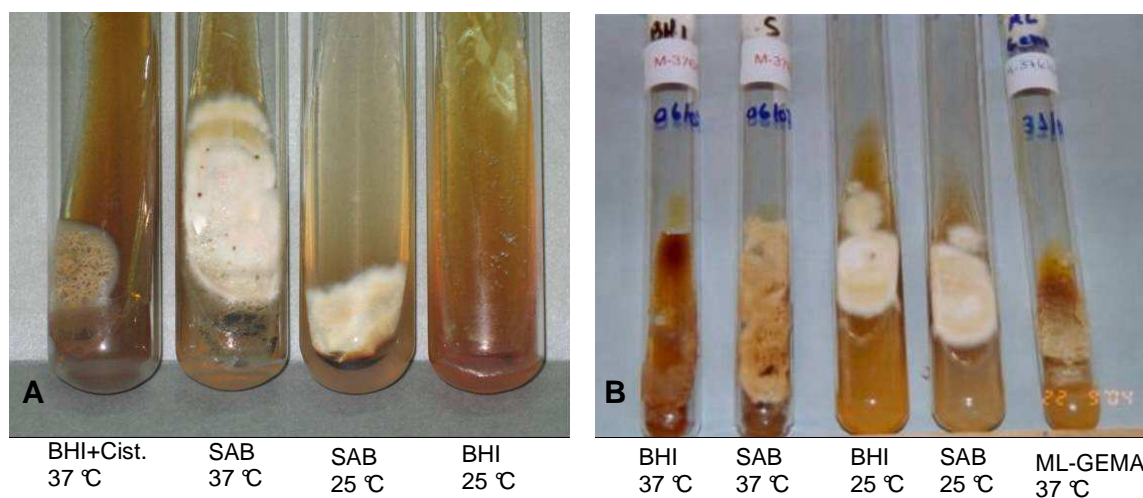
De posse do mapa do seqüenciamento, as seqüências foram analisadas com os programas Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation). A confirmação de espécie foi realizada através da submissão da seqüência nucleotídica no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- NIH) e comparação com as seqüências de outros fungos dimórficos de importância médica depositadas no GenBank.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR

Os 87 isolados foram identificados através das técnicas clássicas de observação macroscópica e microscópica.

A identificação baseou-se na morfologia da colônia após o crescimento em meio Agar Sabouraud Dextrose. Todos os isolados foram convertidos à fase leveduriforme em meio ML-gema incubados a 37 °C, em sua maioria, houve reversão parcial, apresentando uma fase intermediária entre micélio e levedura, exceto raros isolados que se apresentaram na fase leveduriforme no primo-isolamento em meio BHI + cisteína quando incubados a 37 °C (Figura 6).

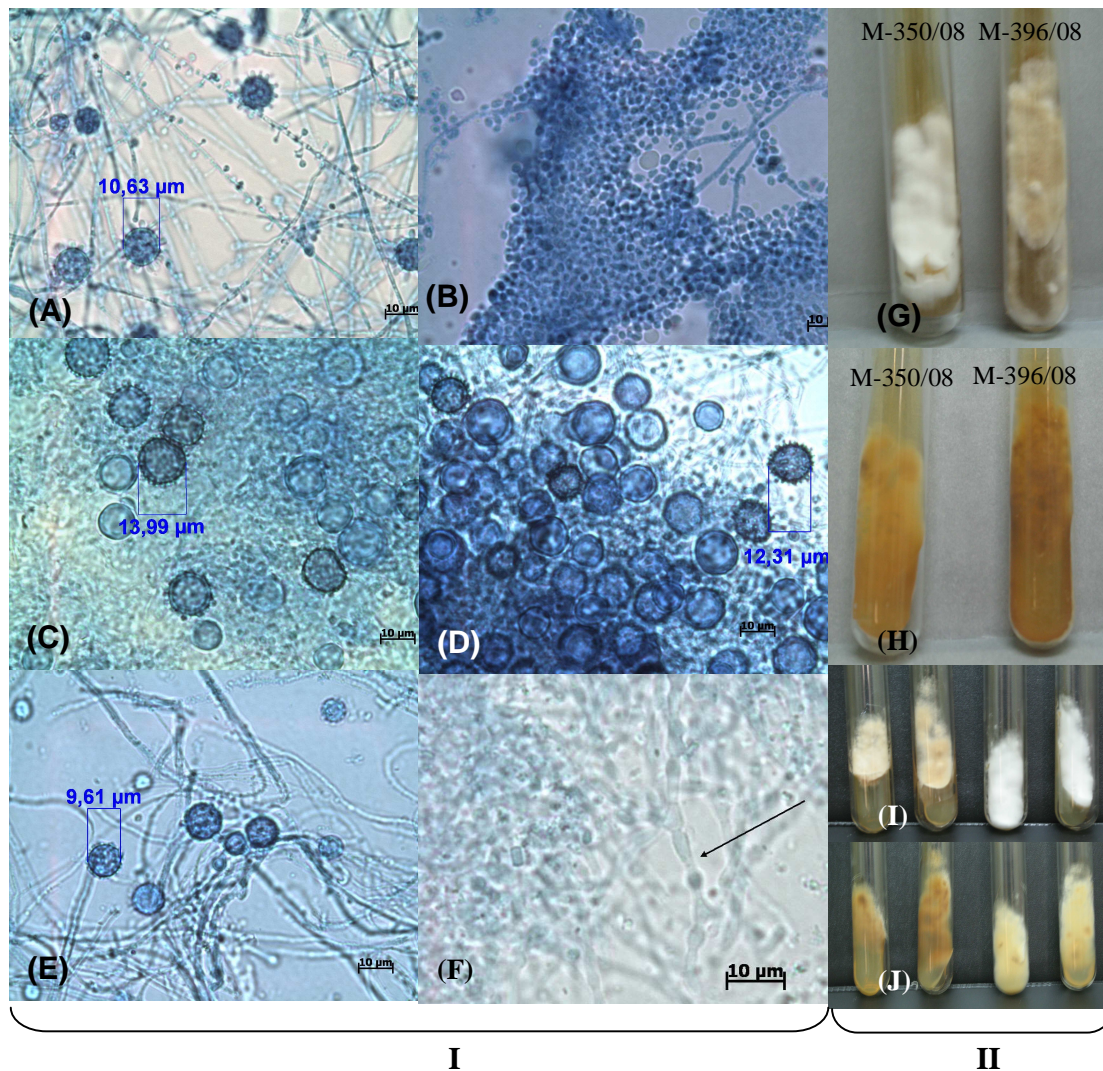


**Figura 6.** Macromorfologia de *H. capsulatum* isolados de morcegos: **(A)** *H. capsulatum* na fase leveduriforme incubado à 37 °C em meio BHI + cisteína, e na fase filamentosa incubado à 25 °C e 37 °C em meio Sabouraud; **(B)** *H. capsulatum* na fase filamentosa incubado à 25 °C e 37 °C nos meios Sabouraud e BHI e em BHI + cisteína, e a reversão à fase leveduriforme em meio ML-gema incubados à 37 °C.

Em sua macromorfologia foram observados isolados que se desenvolveram lentamente entre 15 a 30 dias, com textura algodoadosa, de cor branca, variando

ao castanho. Em sua micromorfologia foram observadas a presença de macroconídios tuberculados e microconídios específicos de *H.capsulatum*. Os fungos isolados de coloração castanha produziram quantidade de macroconídios e microconídios superior àqueles isolados de coloração branca. Foram observados macroconídios tuberculados específicos do fungo com maior frequência nos isolados de coloração castanha (Figura 7).





**Figura 7.** Macromorfologia e micromorfologia de *H. capsulatum* isolados de vísceras e fezes de morcegos: **I. Micromorfologia:** Isolado de vísceras de morcego: microcultivo (A) e reversão para a fase leveduriforme (B); Isolado de vísceras de morcego na fase filamentosa: amostra M-350/08 com raros macroconídios (C), e amostra M-396/08 com grande quantidade de macroconídios (D); Isolado de fezes de abrigo de morcegos, fase filamentosa (E) e em reversão parcial para a fase leveduriforme (F). **II. Macromorfologia:** (G e H) verso e reverso de cepas cultivadas em meio Sabouraud amostra M-350/08 (coloração branca) e M-396/08 (coloração castanha): (I e J) verso e reverso de cepas cultivadas em meio Sabouraud, mostrando a variedade branca e castanha.

Das 87 cepas de *Histoplasma capsulatum* isolados de morcegos encaminhados ao Laboratório de Micologia, Fundação Oswaldo Cruz, todas as amostras analisadas foram confirmadas, através da presença de macroconídios e microconídios compatíveis com a espécie fúngica e conversão para a fase leveduriforme. Entre estes 87 isolados de *H. capsulatum*, 22 foram escolhidos aleatoriamente para a confirmação molecular de espécie. A análise resultante demonstrou que estes 22 isolados de nossa amostragem apresentaram entre 90 a 100% de similaridade com *H. capsulatum*.

A diversidade genética entre 15 isolados *H. capsulatum* de morcegos foi avaliada utilizando as seqüências nucleotídicas de minisatélite M-13 e microsátélite GACA<sub>4</sub> em uma PCR, onde se observou considerável polimorfismo.

A análise dos perfis eletroforéticos com o iniciador M13 revelou dois grupos com 40% de similaridade. Grupo I foi composto por sete isolados, sendo seis isolados de *H. capsulatum* da espécie de morcegos *M. molossus* e um da espécie *N. macrotis*. (Figura 8) e o Grupo II foi composto de 10 isolados sendo cinco isolados de *H. capsulatum* obtidos da espécie *M. molossus*, um *N. macrotis*, um *M. rufus*, um *T. brasiliensis*. Foram, também, incluídos dois *H. capsulatum* provenientes de histoplasmose humana. O iniciador GACA<sub>4</sub> foi menos discriminatório que M13 (Figura 9). Os isolados M154 e M232 apresentaram 100% de similaridade, os espécimes eram de Mogi Mirim e São Paulo respectivamente, ambos da espécie *M. molossus*.

Paralelamente, o polimorfismo genético também foi avaliado pelo seqüenciamento do microsátélite (GACA<sub>4</sub>), através de um projeto de colaboração estrangeira entre a FIOCRUZ e a Universidad Autonoma de Mexico, o qual gerou um manuscrito atualmente em revisão final pelos autores.

## DNA Fingerprinting M-13

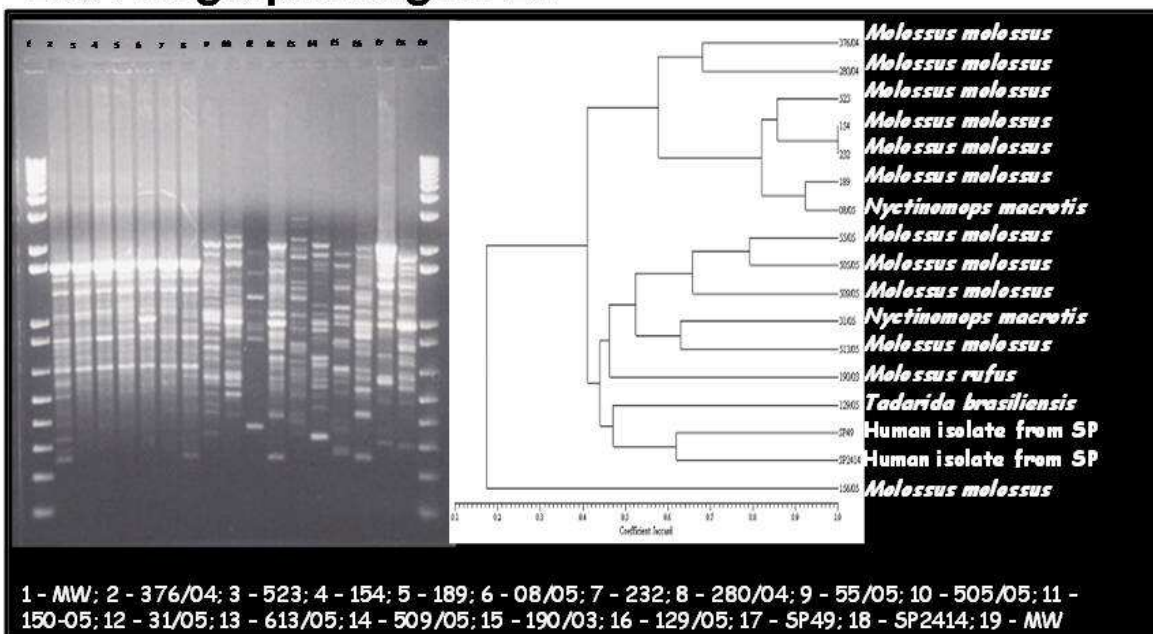


Figura 8. Perfis genotípicos obtidos com o iniciador M13.

## DNA Fingerprinting GACA

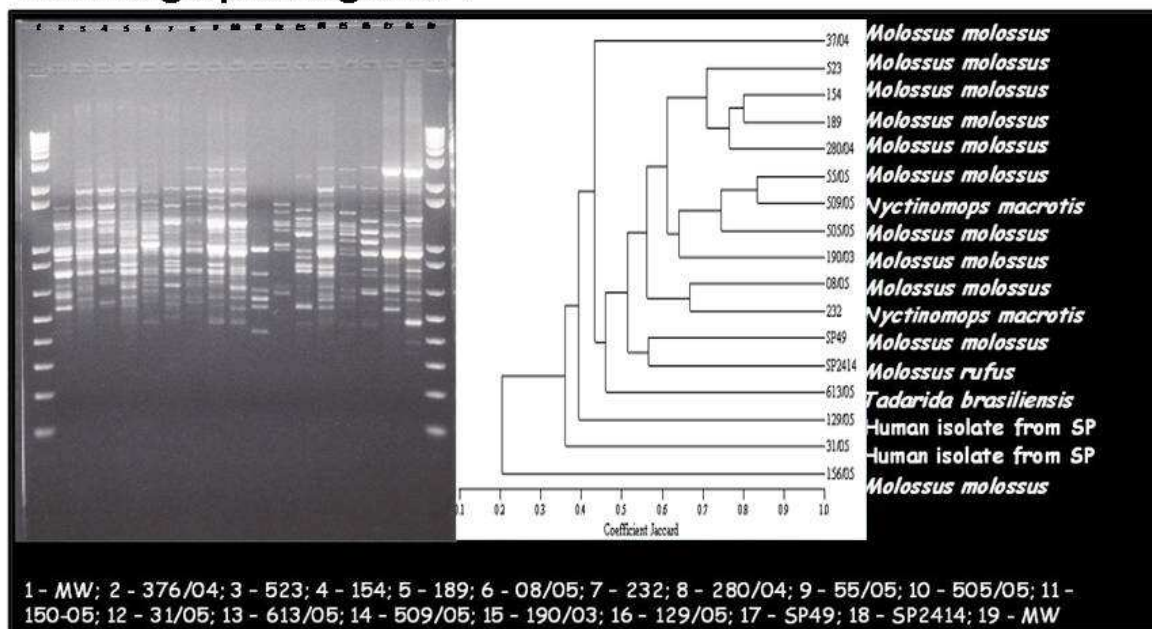


Figura 9. Perfis genotípicos obtidos com o iniciador GACA<sub>4</sub>.

## 4.2 ANÁLISE DOS MORCEGOS

Realizou-se a identificação das Famílias dos morcegos referentes ao período de agosto de 2003 a dezembro de 2008. Neste período foram processados 2427 morcegos. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Morcegos analisados para histoplasmose, segundo família e ano, 2003-2008, CCZ-SP.

<b>Família/ano</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>Total</b>
<i>Molossidae</i>	183	313	188	217	243	247	1391
<i>Phyllostomidae</i>	82	144	178	93	171	144	812
<i>Vespertilionidae</i>	26	29	31	24	63	30	203
<i>Emballonuridae</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Não identificado</i>	3	6	6	3	2	0	20
<b>Total</b>	<b>294</b>	<b>492</b>	<b>403</b>	<b>337</b>	<b>479</b>	<b>422</b>	<b>2427</b>

Os morcegos processados e identificados neste estudo eram pertencentes a quatro famílias, 23 gêneros e 42 espécies. Em relação à família, 57,31% pertenciam a família Molossidae, 33,46% a família Phyllostomidae, 8,36% a família Vespertilionidae e 0,04% a família Emballonuridae. Em 44 morcegos não foi possível identificar a espécie, somente o gênero, e 20 espécimes não foram identificados, entretanto todos foram processados para o diagnóstico de histoplasmose. (Tabela 2).

**Tabela 2 .** Morcegos processados para histoplasmosose em número e percentual, segundo identificação e ano, 2003-2008, CCZ-SP.

Familia	Gênero / espécie	2003	2004	2005	2006	2007	2008	TOTAL	%
Molossidae	<i>Molossus molossus</i>	99	208	113	131	140	172	863	62,04
	<i>Molossus rufus</i>	9	14	8	7	2	8	48	3,45
	<i>Molossus pretiosus</i>	1	1	0	0	0	0	2	0,14
	<i>Molossus sp.</i>	4	0	0	0	0	0	4	0,29
	<i>Molossops neglectus</i>	0	1	1	2	0	1	5	0,36
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	14	24	31	39	59	28	195	14,02
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	5	14	11	9	8	13	60	4,31
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	7	8	11	6	6	7	45	3,24
	<i>Nyctinomops aurispinosus</i>	0	0	1	0	0	0	1	0,07
	<i>Nyctinomops sp.</i>	0	1	0	1	0	0	2	0,14
	<i>Promops nasutus</i>	0	1	0	1	4	0	6	0,43
	<i>Promops sp.</i>	0	1	0	0	0	0	1	0,07
	<i>Eumops glaucinus</i>	16	20	3	6	9	11	65	4,67
	<i>Eumops auripendulus</i>	10	8	3	13	8	2	44	3,16
	<i>Eumops perotis</i>	4	3	3	0	7	2	19	1,37
	<i>Eumops bonariensis</i>	0	1	1	1	0	2	5	0,36
	<i>Eumops maurus</i>	0	0	1	0	0	0	1	0,07
	<i>Eumops sp</i>	9	0	1	1	0	1	12	0,86
<i>Cynomops planirostris</i>	5	8	0	0	0	0	13	1,60	
SubTotal Molossidae		183	313	188	217	243	247	1391	57,31
Phyllostomidae	<i>Glossophaga soricina</i>	50	66	65	46	72	91	390	48,03
	<i>Artibeus lituratus</i>	18	18	24	14	55	7	136	16,75
	<i>Artibeus fimbriatus</i>	1	8	5	1	1	2	18	2,22
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	0	0	1	0	1	0	2	0,25
	<i>Artibeus sp.</i>	2	0	1	0	1	0	4	0,49
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	5	36	21	7	31	33	133	16,38
	<i>Pygoderma bilabiatum</i>	0	0	2	4	1	0	7	0,86
	<i>Anoura caudifera</i>	0	5	10	3	0	0	18	2,22
	<i>Anoura geoffroyi</i>	0	0	3	0	0	0	3	0,37
	<i>Carollia perspicillata</i>	0	0	11	6	0	0	17	2,09
	<i>Carollia sp.</i>	0	2	2	0	0	0	4	0,49
	<i>Sturnira lilium</i>	1	0	17	7	1	3	29	3,57
	<i>Sturnira sp</i>	1	2	0	0	0	0	3	0,37
	<i>Desmodus rotundus</i>	4	7	10	4	8	5	38	4,68
	<i>Dyphila ecaudata</i>	0	0	2	1	0	0	3	0,37
	<i>Micronycteris megalotis</i>	0	0	3	0	0	3	6	0,74
<i>Mimon bennetti</i>	0	0	1	0	0	0	1	0,12	
SubTotal Phyllostomidae		82	144	178	93	171	144	812	33,46
Vespertilionidae	<i>Myotis nigricans</i>	8	17	17	8	45	20	115	56,65
	<i>Myotis levis</i>	0	1	0	4	0	0	5	2,46
	<i>Myotis ruber</i>	0	0	0	1	1	0	2	0,99
	<i>Myotis riparius</i>	0	0	2	0	0	0	2	0,99
	<i>Myotis albescens</i>	0	0	0	1	0	0	1	0,49
	<i>Myotis sp</i>	0	0	1	0	4	0	5	2,46
	<i>Histiotus velatus</i>	11	0	7	2	10	1	31	15,27
	<i>Histiotus sp.</i>	1	0	0	1	0	0	2	0,99
	<i>Eptesicus furinalis</i>	0	3	2	1	1	3	10	4,93
	<i>Eptesicus diminutus</i>	0	0	0	0	0	4	4	1,97
	<i>Eptesicus brasiliensis</i>	0	1	0	1	1	0	3	1,48
	<i>Eptesicus sp.</i>	2	1	1	1	1	0	6	2,96
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	0	3	1	2	0	2	8	3,94
	<i>Lasiurus ega</i>	2	2	0	1	0	0	5	2,46
	<i>Lasiurus cinereus</i>	1	1	0	1	0	0	3	1,48
<i>Lasiurus sp.</i>	1	0	0	0	0	0	1	0,49	
SubTotal Vespertilionidae		26	29	31	24	63	30	203	8,36
Emballonuridae	<i>Diclidurus scutatus</i>	0	0	0	0	0	1	1	100,00
SubTotal Emballonuridae		0	0	0	0	0	1	1	0,04
não identificado		3	6	6	3	2	0	20	0,82
<b>TOTAL</b>		<b>294</b>	<b>492</b>	<b>403</b>	<b>337</b>	<b>479</b>	<b>422</b>	<b>2427</b>	<b>100,00</b>

Em relação ao sexo dos animais capturados neste período, 1126 espécimes eram machos e 1279 eram fêmeas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Morcegos analisados para histoplasmose segundo sexo e ano, 2003-2008, CCZ-SP.

Sexo/ano	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total	%
Macho	137	234	221	161	182	191	1126	46,4
Femea	153	251	179	172	293	231	1279	52,7
s/identificação	4	7	3	4	4	0	22	0,9
Total	294	492	403	337	479	422	2427	100

A positividade para *H. capsulatum* observada no período, em relação ao total de animais foi de 3,58%.

Os isolados de *H. capsulatum* foram todos de morcegos da família Molossidae, pertencentes a quatro gêneros e cinco espécies: *M. molossus* em um total 863 morcegos sendo nesta espécie 18 machos e 56 fêmeas positivas, seguida de *N. macrotis* num total de 60 morcegos, sendo um macho e 9 fêmeas positivas, *M. rufus*, num total de 48 morcegos, teve um macho positivo; *T. brasiliensis*, num total de 195 morcegos também teve um macho positivo, assim como *E. glaucinus* que num total de 65 morcegos, teve um espécime macho positivo.

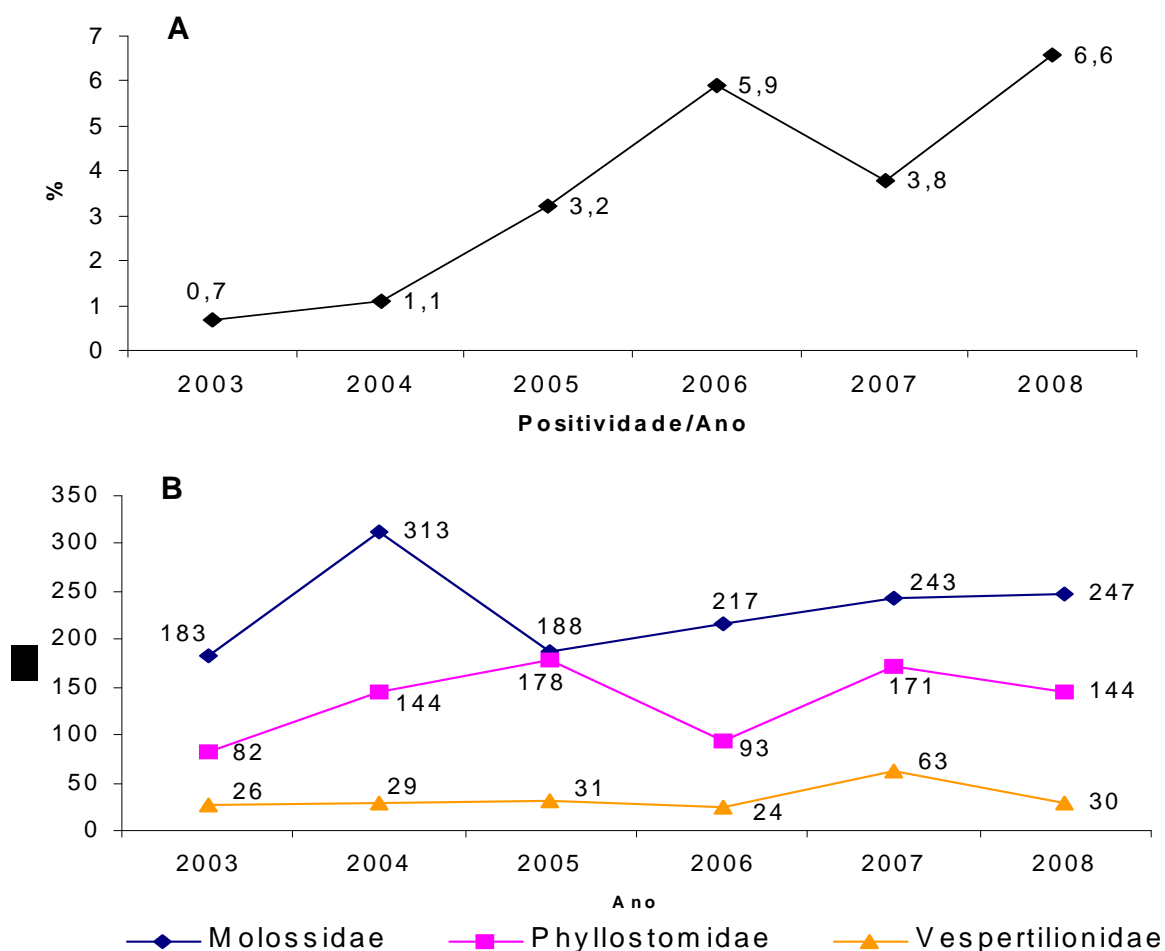
Com relação à faixa etária 44 animais foram identificados como adultos, oito como jovens e quatro classificados como subadulto. O morcego é considerado adulto quando as epífises dos membros superiores (antebraços) estão completamente ossificadas. Quanto às espécies não identificadas (22), este fato ocorreu pela impossibilidade de identificar devido a danos estruturais essenciais.

A Família Molossidae apresentou 6,25% de positividade para histoplasmose (Tabela 4).

**Tabela 4.** Positividade para *H. capsulatum* em número e percentual de acordo com a espécie, 2003-2008, CCZ-SP.

Família	gênero/espécie	Nº	Positivos	Positividade (%)
Molossidae	<i>Molossus molossus</i>	863	74	8,6
	<i>Molossus rufus</i>	48	1	2,1
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	195	1	0,5
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	60	10	16,7
	<i>Eumops glaucinus</i>	65	1	1,5
	outras espécies	160	0	0
<b>Total</b>		<b>1391</b>	<b>87</b>	<b>6,25</b>

A figura 10 abaixo apresenta a frequência absoluta e relativa da positividade de *H. capsulatum* em morcegos capturados ano a ano.



**Figura 10.** Positividade de *H. capsulatum* em morcegos: (A) distribuição relativa geral; (B) distribuição absoluta por espécie, 2003-2008, CCZ/SP.

A positividade observada, segundo gênero, espécie e sexo foi maior em *M. molossus* com prevalência em fêmeas com 64,4% e em machos com 20,7%, seguida de *N. macrotis*, com 10,3% em fêmeas e 1,1% em machos. Em *M. rufus*, *T. brasiliensis* e *E. glaucinus* a taxa foi de 1,1% em machos. (Tabela 5).

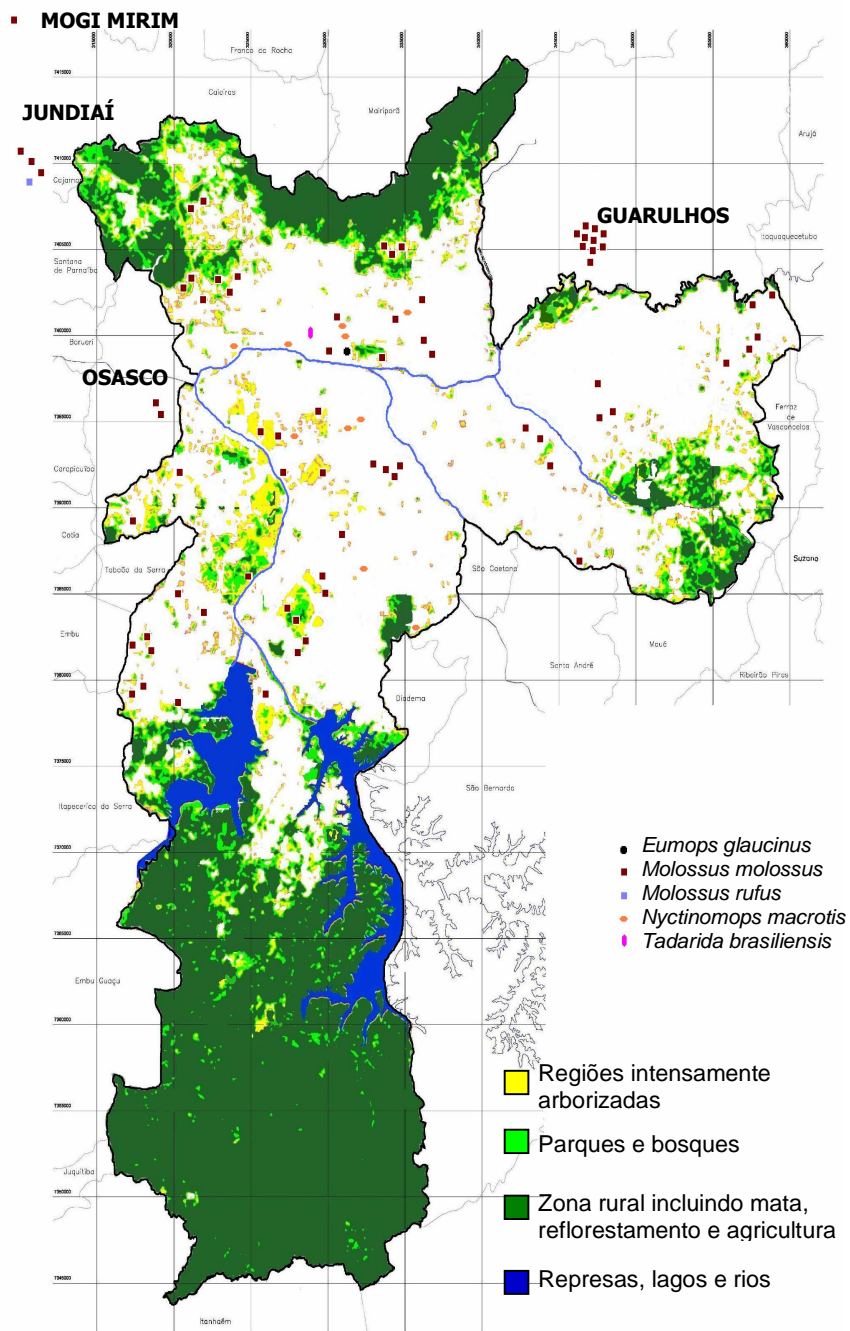
**Tabela 5.** Positividade para histoplasmose segundo gênero, espécie, sexo e percentual, 2003-2008, CCZ-SP.

Família	Gênero/espécie	Positivos	Macho		Fêmea	
			Nº	%	Nº	%
Molossidae	<i>Molossus molossus</i>	74	18	20,7	56	64,4
	<i>Molossus rufus</i>	1	1	1,1	0	0,0
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	1	1	1,1	0	0,0
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	10	1	1,1	9	10,3
	<i>Eumops glaucinus</i>	1	1	1,1	0	0,0
<b>Total</b>		<b>87</b>	<b>22</b>	<b>25,3</b>	<b>65</b>	<b>74,7</b>

Dos 2427 morcegos processados, 1728 morcegos eram procedentes da Cidade de São Paulo (71,2%) e 699 morcegos eram originários de cidades do Estado de São Paulo (28,8%).

Cinco cidades (Figura 11) apresentaram espécimes positivos: 70 procedentes da cidade de São Paulo (80,5%) e 17 de outros municípios do Estado (19,5%): 4 de Jundiaí, 10 de Guarulhos, 2 de Osasco e 1 de Mogi Mirim (Tabela 6).





**Figura 11.** Municípios do Estado de São Paulo, que apresentam morcegos positivos para histoplasnose.

**Tabela 6.** Morcegos analisados para histoplasmosose segundo procedência do animal e ano, 2003-2008, CCZ-SP.

Local/ano	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total	Total (%)	Positivo	%
São Paulo	144	241	290	273	422	358	1728	71,2	70	83,1
Outros municípios ESP	150	251	113	64	57	64	699	28,8	17	16,9
<b>Total</b>	<b>294</b>	<b>492</b>	<b>403</b>	<b>337</b>	<b>479</b>	<b>422</b>	<b>2427</b>	<b>100</b>	<b>87</b>	<b>100</b>

Os dados referentes aos locais e circunstâncias de captura e dos 87 morcegos positivos para histoplasmosose são apresentados na Tabela 7.

Na Tabela 7, são apresentados quatro locais na cidade de São Paulo onde foram detectados espécimes positivos em mais de uma ocasião (em destaque de cor): em um prédio no bairro de Capão Redondo em 2004 (232/04) e 2007 (1333/07), um prédio no bairro de Pinheiros em 2004 (376/04) e 2006 (624/06 e 627/06), e uma residência no Jardim Helena em 2005 (928/05) e em 2006 (240/06) (Figura 12 a,b,c). Em 2007 (973 e 1206) no bairro do Carrão em que os morcegos foram encontrados no chão em meses diferentes.

Na Tabela 7, também são apresentados os casos que, em mais de um espécime foram detectados positivos no mesmo local. Na cidade de São Paulo: em prédio residencial no Bairro de Arthur Alvim em 2005 (505/05 e 507/05), em forro no bairro de Itaim Paulista em 2006 (1056/06 e 1059/06), caído no chão em residência no bairro de Vila Guilherme em 2006 (1048/06 e 1049/06).

No bairro da Casa Verde em 2007 em vão de dilatação de prédio (Figura 13 a,b e c), ocorreu isolamento em duas espécies diferentes com coabitação, dois *N.macrotis* e um *E.glaucus* (940/07, 948/07 e 927/07). No bairro da Vila Carrão em 2007, no forro de residência em duas ocasiões (973/07 e 1206/07). No bairro de Santo Amaro em 2007, em forro de residência dois espécimes positivos (1175/07 e 1176/07).

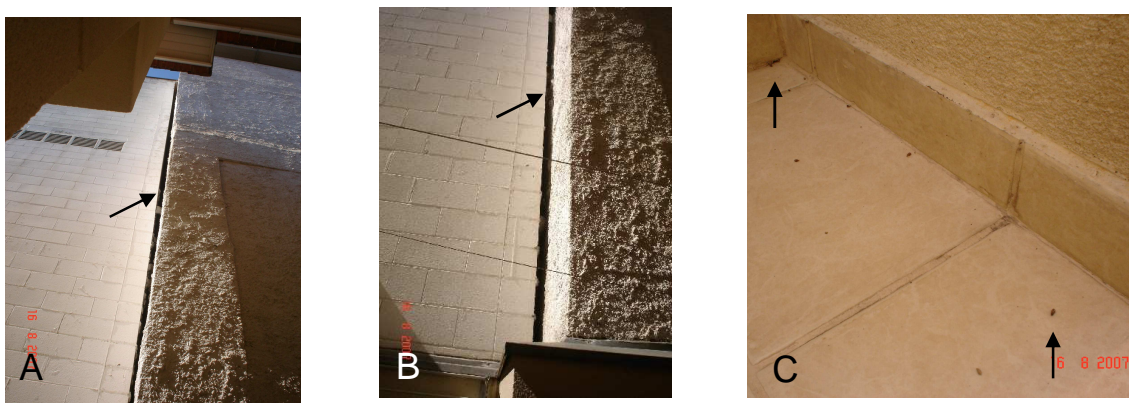
Na cidade de Osasco (212/06 e 219/06), e em Guarulhos(1438/07 e 1439/07), em 2006, ambos em forro de residências.

Em 2008, em seis ocasiões ocorreu a captura de mais de um espécime positivo em um mesmo local conforme relatado a seguir: em forro de residência no

Bairro de Capão Redondo (37/08, 38/08 e 39/08), e em abrigo no forro em casa no Bairro de Pirituba (Figura 12-D), de sete morcegos capturados, cinco estavam positivos. (835/08, 837/08, 838/08, 839/08 e 840/08), e no Bairro da Liberdade abrigados em caixas de persianas (1180/08, 1182/08 e 1183/08). Em Guarulhos, no Bairro de Jardim Santa Rita (350/08, 351/08), no Bairro do Jardim Santa Mena (393/08, 394/08 e 396/08), e no Bairro de Jardim Beirute (482/08 e 487/08), todos em abrigos no forro das residências.



**Figura 12.** Abrigos e captura de morcegos em forros de residências: (A) Captura de espécimes (928/05 e 240/06); (B) e (C) forro de residência – abrigo dos morcegos, com fezes (928/05 e 240/06); (D) Abrigo (laje) com isolamento de *H. capsulatum* em fezes de morcego (capturados cinco morcegos positivos para *H. capsulatum*, todos da espécie *M. molossus*), bairro de Pirituba, São Paulo/SP.



**Figura 13.** (A) e (B) Vão de dilatação de prédio abrigando morcegos (setas); (C) quintal da residência ao lado do prédio, com fezes de morcegos (setas), bairro da Casa Verde, São Paulo/SP. Deste vão, foram capturados 2 morcegos da espécie *N. macrotis* e um *E. glaucinus* positivos para *H. capsulatum* e um outro morcego da espécie *N. macrotis* positivo para raiva (comunicação pessoal Dr<sup>a</sup>. Marilene Fernandes de Almeida – Coordenadora do projeto Fapesp nº 06/58210-7).

**Tabela 7.** Morcegos positivos para histoplasmose por ano, espécie, sexo, local de captura e circunstância de captura, 2003-2008, CCZ/SP.

Ano	Espécie	Circunstância da captura/Nº	LOCAL	SEXO	FAIXA ETÁRIA	
2003	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão	M 189	Jundiaí	Fêmea	adulto
(2)	<i>Molossus rufus</i>	caído no chão	M 190	Jundiaí	Macho	adulto
2004	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão	M 012	Jundiaí	Macho	jovem
(6)	<i>Molossus molossus</i>	sem informação	M 154	Mogi Mirim	Fêmea	jovem
	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão em predio	M 232	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	sem informação	M 280	Jundiaí	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	prédio Suvis Pinheiros	M 376	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão em predio	M 523	São Paulo	Macho	jovem
2005	<i>Nyctinomops macrotis</i>	adentramento - 15º andar	M 008	São Paulo	Fêmea	adulto
(13)	<i>Nyctinomops macrotis</i>	adentramento - 15º andar	M 031	São Paulo	Fêmea	jovem
	<i>Molossus molossus</i>	forro edícula	M 055	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	adentramento - 10º andar	M 129	São Paulo	Macho	jovem
	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão em praça	M 156	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro em predio COHAB	M 507	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro em predio COHAB	M 505	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento	M 613	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	adentramento - 14º andar	M 130	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído na piscina seca	M 717	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído em estabelecimento com.	M 721	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído predio COHAB-forro	M 797	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento casa	M 928	São Paulo	Fêmea	adulto
2006	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão – prédio CDHU	M 005	São Paulo	Fêmea	jovem
(20)	<i>Nyctinomops macrotis</i>	adentramento - 2ª andar	M 016	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento casa	M 099	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro	M 212	Osasco	Fêmea	s/inf
	<i>Molossus molossus</i>	forro	M 219	Osasco	Fêmea	s/inf
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento casa	M 240	São Paulo	Fêmea	subadulto
	<i>Molossus molossus</i>	pendurado na árvore em praça	M 241	São Paulo	Fêmea	subadulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento	M 436	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído quintal	M 522	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento	M 539	São Paulo	Macho	jovem
	<i>Molossus molossus</i>	prédio Suvis Pinheiros	M 624	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	prédio Suvis Pinheiros	M 627	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento aptº 9º andar	M 756	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento	M 1023	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído 2ª andar	M 1033	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro	M 1056	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro	M 1059	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído na rua	M 1103	São Paulo	Fêmea	subadulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído em residencia	M 1148	São Paulo	Fêmea	jovem
	<i>Molossus molossus</i>	caído em residencia	M 1149	São Paulo	Fêmea	subadulto

(continua)

**Tabela 7.** Morcegos positivos para histoplasmose por ano, espécie, sexo, local de captura e circunstância de captura, 2003-2008, CCZ/SP (continuação).

Ano	Espécie	Circunstância da captura/Nº	LOCAL	SEXO	FAIXA ETÁRIA	
2007 (18)	<i>Molossus molossus</i>	adentramento de residência	M 1220	São Paulo	macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento em edificação	M 1090	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	Vão de dilatação edifício	M 940	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Eumops glaucinus</i>	Vão de dilatação edifício	M 927	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	Vão de dilatação edifício	M 948	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	no chão, imóvel, abrigo no forro	M 973	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	no chão, imóvel, abrigo no forro	M 1206	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	adentramento de residência	M 992	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	caído no chão-Hosp. Santa Cas	M 1117	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	Caído no chão - COHAB	M 1333	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 1175	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 1176	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão	M 784	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de residência	M 1438	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de residência	M 1439	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	Caído no chão – quintal	M 1502	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	Adentramento	M 1509	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	Adentramento	M 1541	São Paulo	Fêmea	adulto
2008 28	<i>Molossus molossus</i>	forro de residência	M 37	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de residência	M 38	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de residência	M 39	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	vão de dilatação apto 4º andar	M 345	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de residência	M 443	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de residência	M 477	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão	M 663	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de edícula	M 835	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de edícula	M 837	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de edícula	M 838	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de edícula	M 839	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	forro de edícula	M 840	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	Adentramento	M 852	São Paulo	Macho	adulto
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	Adentramento apto	M 975	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	Caído no chão	M 1084	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 350	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 351	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 394	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 393	Guarulhos	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 396	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 487	Guarulhos	Macho	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 482	Guarulhos	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	abrigo no forro	M 1177	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caixa de persiana	M 1182	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caixa de persiana	M 1183	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caixa de persiana	M 1180	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão	M 1193	São Paulo	Fêmea	adulto
	<i>Molossus molossus</i>	caído no chão	M 1198	São Paulo	Fêmea	adulto

■ Capturados mais de um espécime positivo no mesmo local.

■ Capturados mais de um espécime positivo no mesmo local em ocasiões diferentes.

(conclusão)

Quanto às circunstâncias de localização de morcegos positivos, foi observado um percentual maior em morcegos encontrados abrigados em forros de residências e em morcegos encontrados caídos no chão (Tabela 8).

**Tabela 8.** Circunstância de captura de morcegos positivos para *H. capsulatum*, 2003-2008, CCZ/SP.

<b>Circunstância da captura</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
forro de residência	33	37,9
caído no chão	25	28,7
adentramento	20	23,0
vão de dilatação	4	4,6
caixa de persiana	3	3,4
pendurado em árvore	1	1,1
sem informação	1	1,1
<b>Total</b>	<b>87</b>	<b>100,0</b>

Foram analisadas 61 amostras de fezes em abrigos de morcegos e apenas uma amostra com isolamento positivo para *H. capsulatum* foi detectada. (Tabela 9).

**Tabela 9.** Fezes de morcegos processados para *H. capsulatum*, 2003-2008, CCZ-SP.

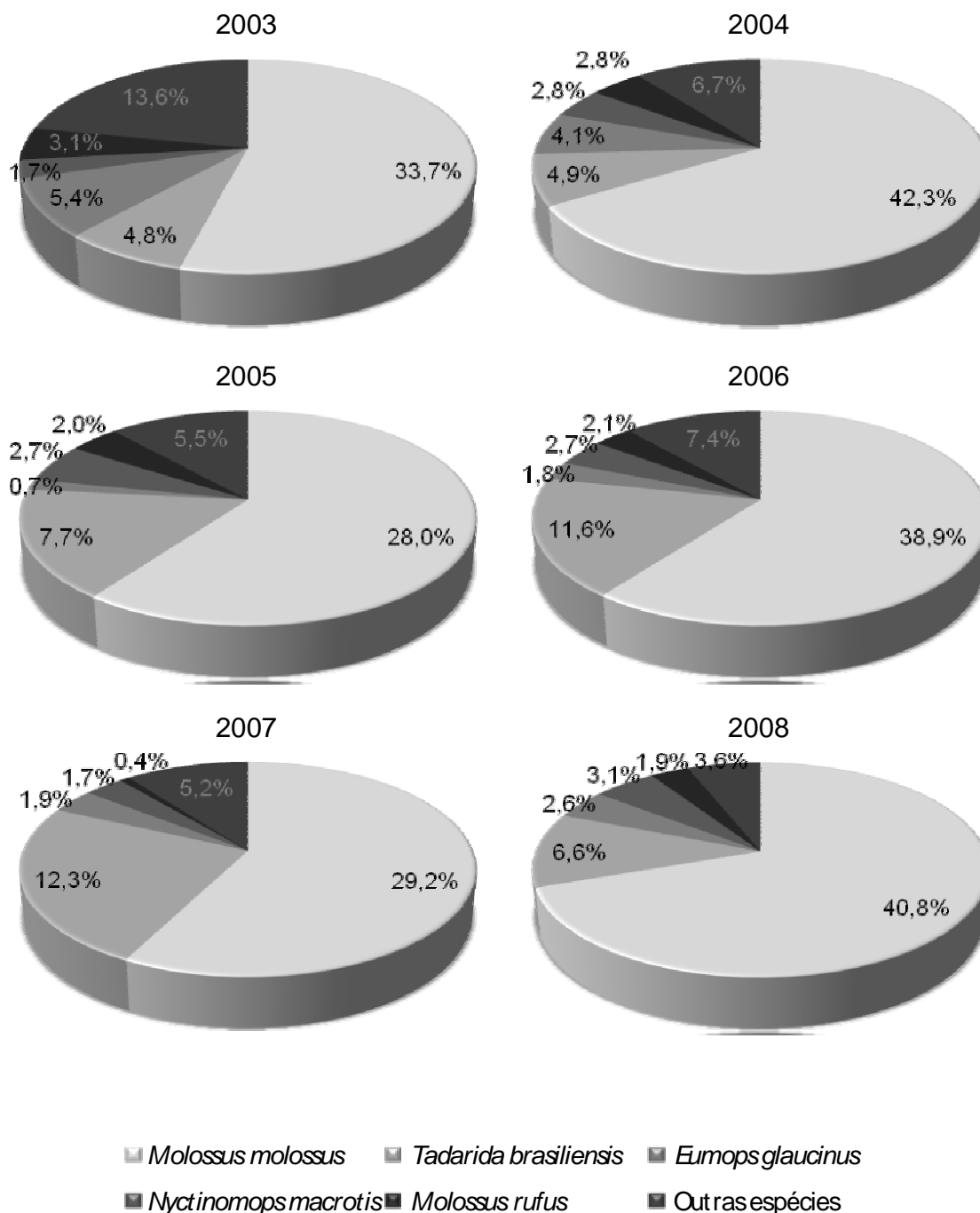
<b>Ano</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>Total</b>
São Paulo	0	10	7	13	7	24	<b>61</b>
Positividade	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>

A Tabela 10 apresenta a distribuição dos morcegos analisados por região e ano (São Paulo, Grande São Paulo e cidades do interior do Estado).

**Tabela 10.** Percentual de morcegos analisados por região, 2003-2008, CCZ/SP.

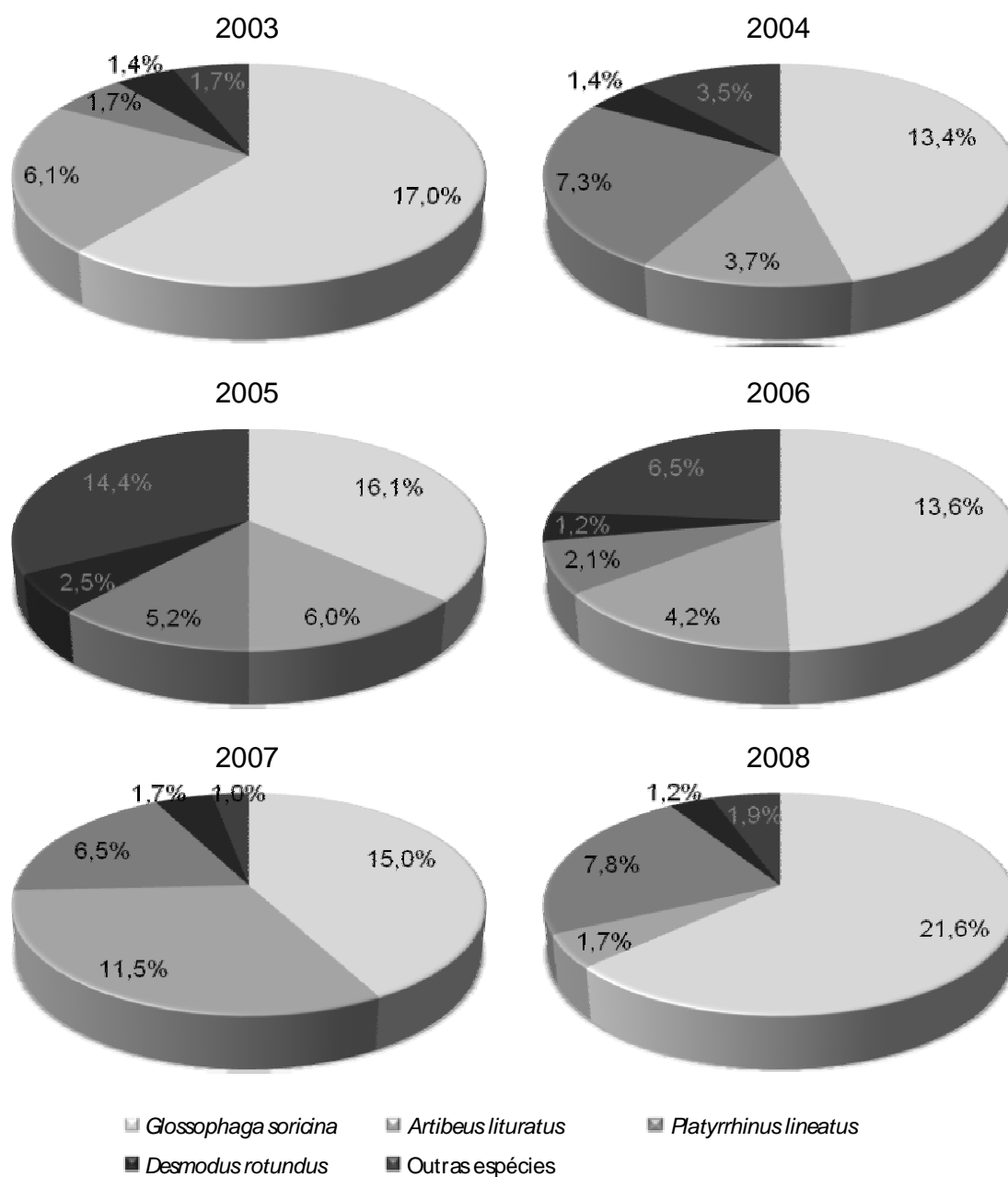
<b>Local/Ano</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>Total</b>
São Paulo	49,0	48,6	71,9	77,3	89,0	84,8	71,2
Grande SP	4,8	12,5	27,5	17,6	10,5	14,0	14,6
Interior	46,2	38,9	0,6	5,1	0,4	1,2	14,2

A distribuição percentual das espécies analisadas das famílias Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae está representada nas figuras 14, 15 e 16.

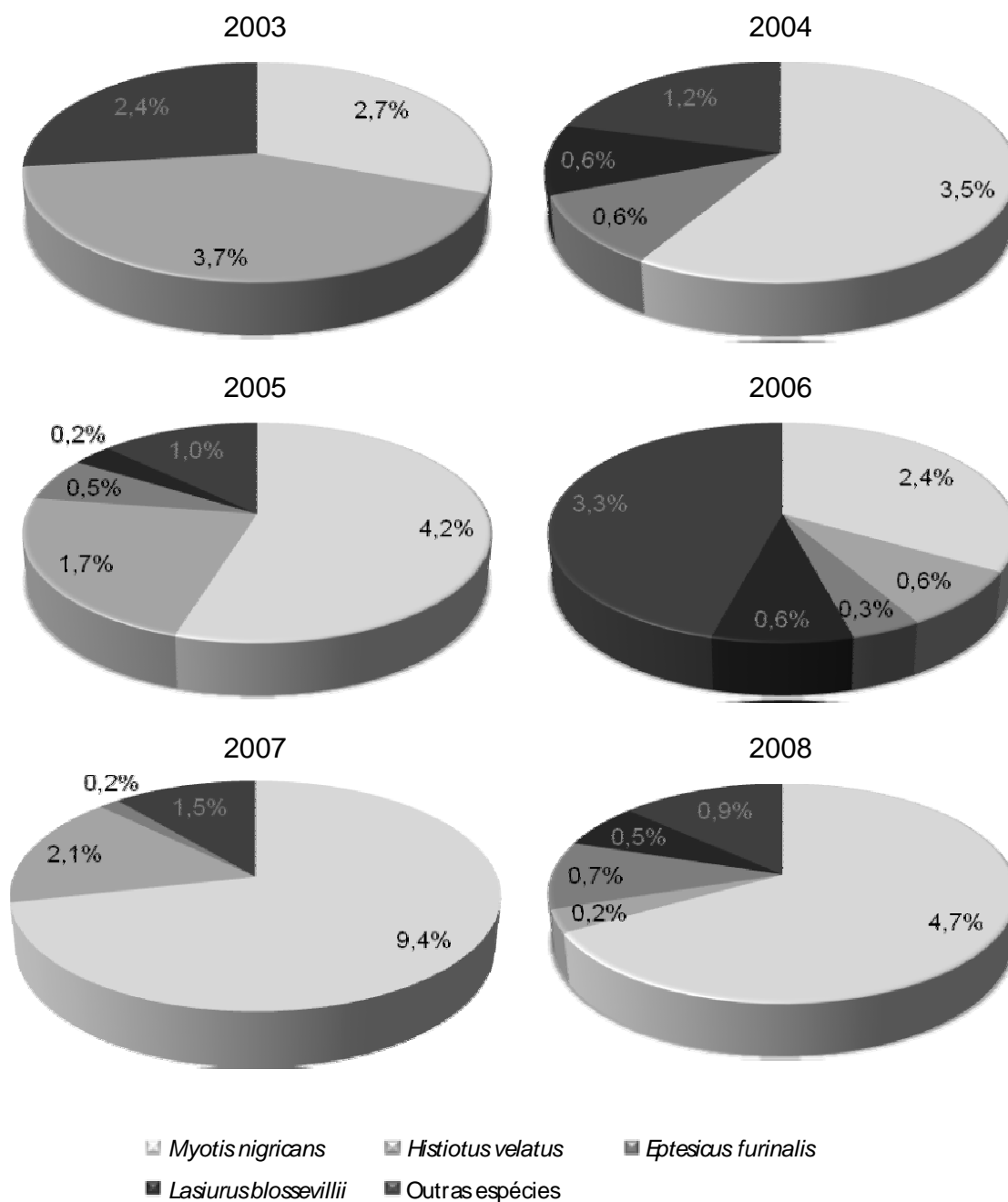


**Figura 14.** Percentual de espécies da família **Molossidae** registradas entre os anos de 2003 a 2008, em relação ao total de morcegos recebidos em cada ano (2003: n = 294; 2004: n = 492; 2005: n = 403; 2006: n = 337; 2007: n = 479; 2008: n = 422).





**Figura 15.** Percentual de espécies da família **Phyllostomidae** registradas entre os anos de 2003 a 2008, em relação ao total de morcegos recebidos em cada ano (2003: n = 294; 2004: n = 492; 2005: n = 403; 2006: n = 337; 2007: n = 479; 2008: n = 422).



**Figura 16.** Percentual de espécies da família **Vespertilionidae** registradas entre os anos de 2003 a 2008, em relação ao total de morcegos recebidos em cada ano (2003: n=294; 2004: n = 492; 2005: n = 403; 2006: n = 337; 2007: n = 479; 2008: n = 422).

## 5 DISCUSSÃO

Alguns estudos para a pesquisa de *H. capsulatum* em morcegos foram realizados em ambientes cavernícolas (SHACKLETTE et al., 1969; MCMURRAY et al., 1982; TAYLOR et al., 1999; CARVAJAL-ZAMORA, 1977). O fato de existirem poucas pesquisas de histoplasmose em morcegos nas áreas urbanas (SHACKLETTE et al., 1969; CANTEROS et al., 2005) evidencia a importância de nossa pesquisa. Esta é a primeira vez que se realiza a Vigilância da doença em morcegos em cidades do Estado de São Paulo.

As cinco cidades do Estado de São Paulo que apresentaram casos positivos têm em comum o fato de que os morcegos foram encontrados em áreas urbanas, em especial a cidade de São Paulo, capital do Estado, maior centro econômico do Brasil com população de 10.886.518 habitantes (Censo IBGE, 2007) vivendo em uma área de 11.523 km<sup>2</sup>, que apresentou o maior número de casos positivos (74). As cidades de Guarulhos com 1.236.192 habitantes (Censo IBGE, 2007) em uma área de 318 Km<sup>2</sup> e Osasco com 701.012 habitantes (Censo IBGE, 2007) e uma área de 65 km<sup>2</sup>, são vizinhas à capital em área denominada Grande São Paulo. A cidade de Jundiaí apresenta uma população de 342.983 habitantes (Censo IBGE, 2007) e uma área de 432 km<sup>2</sup> e a cidade de Mogi Mirim com uma população de 84.176 e uma área de 499 km<sup>2</sup>, são cidades do interior do Estado, próximas a capital (Figura 11).

Durante o período deste estudo, em 21 ocasiões, 38 morcegos da espécie *M. molossus*, três *N. macrotis* e um *E. glaucinus* positivos para *H. capsulatum*, foram encontrados no forro de residências ou muito próximos a abrigos em forro de prédios ou casas, evidenciando a sinantropia destas espécies em habitações humanas. Este fato é importante, pois, morcegos com histoplasmose sistêmica podem constituir focos de contaminação em habitações humanas na área urbana.

Das cinco espécies de morcegos envolvidas, duas já haviam sido previamente relatadas como positivas para histoplasmose: *T. brasiliensis* e *M. molossus* (CANTEROS et al., 2005). Trata-se do primeiro relato do isolamento de

*H. capsulatum* nas outras três espécies detectadas neste trabalho (*N. macrotis*, *E. glaucinus* e *M. rufus*).

No caso dos três isolamentos ocorridos em morcegos capturados no Bairro de Casa Verde em 2007, tratava-se de dois representantes da espécie *N. macrotis* (940/07 e 948/07) e um *E. glaucinus* (927/07), sendo o único positivo desta espécie neste trabalho e o único registro de morcegos de espécies diferentes capturados no mesmo abrigo e positivos para histoplasmose. Desta forma observou-se a ocorrência de histoplasmose inter-espécies e intra-espécies de morcegos no mesmo abrigo. Ainda neste mesmo abrigo um quarto espécime foi capturado e detectado positivo para raiva. Esse achado de mais de uma espécie dividindo o mesmo abrigo e com espécimes infectados para duas zoonoses demonstra o risco para saúde pública de abrigos urbanos usados por morcegos.

A reincidência de morcegos positivos em um mesmo local ocorrido em duas ocasiões, nos anos de 2004 (376/04) e 2006 (624/06 e 627/06) em um prédio em Pinheiros e nos anos de 2005 (928/05) e 2006 (240/06) em uma residência no Jardim Helena, sugere que tenha ocorrido contaminação no abrigo. Um morcego infectado poderia contaminar o resto da colônia, uma vez que, segundo McMurray e Greer (1979) ocorre ativa multiplicação de leveduras no tecido extra lúmen como demonstrado por exames histopatológicos em *M. molossus* sendo estes animais capazes de eliminar em suas fezes fungos viáveis por um longo período.

O estudo de infecção experimental realizado em *T. brasiliensis* por Hoff e Bigler (1981), colabora com esta hipótese, uma vez que foi observada taxa de mortalidade de 80% com sete a 34 dias pós-infecção e morbidade evidente de um a vários dias até a morte. Este período de morbidade aumentaria a possibilidade da disseminação do fungo entre os membros da colônia.

Um fato que poderia favorecer a disseminação da doença para a colônia seria a morte de um dos membros dentro do abrigo, possibilitando a disseminação através de sua carcaça (TAYLOR et al.,2005).

Todos os morcegos positivos pertenciam a Família Molossidae que, neste estudo, é o grupo com maior representatividade (57,1%). Esse fato era esperado uma vez que esta é a família de maior representatividade na área urbana da

cidade de São Paulo (SODRÉ, 2003). Entre os morcegos positivos para *H. capsulatum* houve predominância da espécie *M. molossus* (85,0%), o que pode ser explicado pelo comportamento desse animal, o qual tem como abrigos forros de residências e outros espaços construtivos. Desta forma, devido à sua proximidade da população humana, o número de reclamações dos munícipes quanto à sua presença é maior e em consequência o número de espécimes capturados é mais elevado.

A positividade observada na Família Molossidae (6,2%) sugere que o comportamento desta família na escolha de abrigos fechados, como forros, porões e sótãos, sendo similares a cavernas naturais possa aumentar o risco de contaminação nestes espécimes, o que não ocorreu com outros morcegos com hábitos diferentes como o caso das espécies frugívoras e nectarívoras que preferem as árvores como abrigo.

No primeiro relato de isolamento de *H. capsulatum*, em morcegos Shacklette et al. (1962) observaram a predominância em espécies insetívoras e estes autores não isolaram o fungo em espécies frugívoras. Isso não significa que outras espécies não possam se contaminar, pois eventualmente espécies diferentes coabitam locais fechados, aumentando a probabilidade de contaminação. Este fato foi confirmado por Shacklette et al. (1969) que relataram uma alta taxa de infecção em morcegos insetívoros da espécie *Pteronotus rubiginosa* e uma baixa taxa de infecção em morcegos nectarívoros da espécie *Carollia perspicillata*, capturados em um mesmo abrigo. Também demonstraram diferentes taxas de infecção de uma mesma espécie em abrigos diferentes. Os autores sugerem que possa haver espécies susceptíveis ou resistentes à infecção por *H. capsulatum*, ou o habitat pode contribuir para essas diferenças.

As características dos abrigos utilizados por estas espécies insetívoras são semelhantes, em quais os animais ficam entre vigas ou vãos entre paredes, sendo sempre locais apertados com pouca luminosidade e ventilação. As fezes se acumulam nestes abrigos, às vezes, a poucos metros ou centímetros do local de repouso, favorecendo a contaminação, visto que os animais permanecem grande parte do tempo nestes locais.

Em 2008, o abrigo localizado na laje de uma residência coberta com telhas onduladas (Figura 12 D), apresentava espaço entre as telhas e a laje de aproximadamente uns 40 centímetros onde havia acúmulo de fezes. O espaço entre os morcegos e este acúmulo era de poucos centímetros. Neste abrigo foram capturados sete morcegos da espécie *M. molossus*, e cinco deles foram positivos para histoplasmose. Este abrigo foi o que mais apresentou morcegos positivos durante o período deste estudo, e o único abrigo com análise de fezes positiva para *H. capsulatum* sugerindo que a proximidade dos morcegos, com o acúmulo de fezes favoreceu a disseminação da doença entre os espécimes do abrigo.

A positividade observada para *H. capsulatum*, no período deste estudo, foi de 3,58% e é possível que esta taxa tenha relevância em relação à transmissão da doença para humanos, pela proximidade desses animais e pelo fato de que 38% dos morcegos infectados foram encontrados em forros de residências.

Em relação aos oitenta e sete isolados de *H. capsulatum*, todos pertenciam a Família Molossidae (quatro gêneros e cinco espécies), que no presente estudo representou o maior grupo de espécimes coletados (57,3%), com positividade para este fungo de 6,2%.

A positividade observada para as espécies *M. rufus*, *T. brasiliensis*, *E. glaucinus* e *N. macrotis* pode não representar a realidade para estas espécies uma vez que o número de amostras analisadas foi menor. Entretanto em relação à positividade para o fungo na espécie *N. macrotis*, que foi de 16,8%, deve ser considerada, uma vez que esta espécie geralmente coabita com a espécie *M. molossus* (Tabela 4).

Dentre as espécies da família Molossidae, *M. molossus* representou 62%. Com relação à distribuição por sexo, a discreta predominância de morcegos fêmea (52,7%), não é significante ao número de machos coletados (46,4%) (Tabela 3). Essa diferença quando analisada estatisticamente por meio de qui-quadrado não se mostrou significativa ( $p = 3,24$ ).

Em relação à positividade de machos e fêmeas, entre as cinco espécies positivas: *M. molossus* (18 machos e 56 fêmeas), *N. macrotis* (um do sexo masculino e nove do sexo feminino), *M. rufus* (um macho), *T. brasiliensis* (um

macho) e *E. glaucinus* (um macho) observou-se uma diferença entre o número de positivos do sexo masculino (22) e o número de fêmeas positivas (65), que foi significativa quando analisada estatisticamente pelo teste qui-quadrado ( $p= 15,67$ ). Essa diferença pode estar relacionada a um possível comportamento da fêmea em permanecer mais tempo no abrigo cuidando dos filhotes, e o fato de que durante o período gestacional, ela poderia estar mais suscetível à infecção.

A vigilância da histoplasmose em morcegos para identificação dos espécimes infectados com o fungo em regiões urbanas é importante para se detectar áreas possivelmente contaminadas, desencadeando assim ações que possam prevenir a transmissão da doença para humanos.

Os técnicos do Centro de Controle de Zoonoses realizaram vistoria em todos os locais nos quais morcegos positivos para *H. capsulatum* foram encontrados. Os munícipes foram orientados sobre como evitar a presença de morcegos em residências e as providências que deveriam ser tomadas.

Não foi possível coletar amostras de fezes de morcegos em todos os casos notificados de presença de morcegos. Isto se justifica pelo difícil acesso aos abrigos e ao fato de que, na maioria das vezes, eles não foram localizados, uma vez que os morcegos são capazes de voar longas distâncias em busca de alimentos e a notificação não é diretamente relacionada ao abrigo e sim à presença do animal.

Entre todas as amostras de fezes processadas, obtivemos apenas uma amostra positiva. A dificuldade de isolamento do fungo dessas amostras pode estar relacionada a impossibilidade de obter várias amostras de diferentes locais do abrigo o que aumentaria a chance de isolamento, uma vez que o fungo *H. capsulatum* se concentra em pequenos focos (OLIVEIRA et al., 2006).

Neste estudo as culturas de *Histoplasma capsulatum* foram obtidas sempre nas mesmas condições atmosféricas e de intensidade de luz, no entanto, variações fenotípicas de coloração e produção de conídios foram observadas. Berliner et al. (1973) demonstraram haver forte influência na intensidade de luz *in vitro* na produção de colônias produtoras de pigmentos, além de as variantes

serem, também mais produtoras de macroconídios tuberculados em ausência total de luz.

Como afirmado por Berliner et al. (1973) culturas expostas à iluminação contínua mostram pouco ou quase nenhum crescimento até duas semanas de incubação, enquanto cultivos na ausência de luz, mantêm um potencial contínuo de crescimento. Em nosso estudo verificou-se que as colônias brancas tiveram desenvolvimento mais tardio que aquelas com pigmentação castanha, apesar de terem sido cultivados nas mesmas condições atmosféricas, de temperatura e luminosidade.

Em relação à caracterização morfológica dos isolados de *H. capsulatum* obtidos durante este estudo, observou-se diferenças fenotípicas, em que os isolados de coloração castanha produziam quantidade de macroconídios e microconídios superior aos isolados de coloração branca, no entanto estas características não podem ser validadas por este estudo, uma vez que não se estabeleceu um método específico para quantificar os conídios e avaliar a maturidade, em relação às diferenças macroscópicas. Alguns autores afirmam que isolados com pigmentação castanha possam ser mais virulentos em relação aos isolados de coloração branca (EISSEBERG e GOLDMAN, 1991).

Todos os isolados foram convertidos à fase leveduriforme em meio ML-gema incubados à 37 °C, apresentando em algumas vezes reversão parcial, exceto raros isolados que se apresentaram na fase leveduriforme no primo-isolamento em meio BHI + cisteína incubados a 37 °C. Ao contrário do que foi observado por Imano (2005), a conversão da fase filamentosa para a fase leveduriforme foi bastante satisfatória em ML-gema. Este fato pode estar associado ao uso de isolados recentes, o que, segundo a mesma autora, pode ser um fator preponderante ao processo de reversão in vitro.

Quanto à análise molecular, somente os isolados M154 e M232 apresentaram 100% de similaridade entre seus perfis genotípicos. Entre os outros isolados foi observado um alto grau de polimorfismo genético sugerindo diferentes populações de *H. capsulatum* nos municípios do Estado de São Paulo que poderiam atuar como fonte de infecção entre animais e a população humana local.



A positividade observada na cidade de São Paulo (3,58%) pode ser explicada pelo maior número de espécimes analisados (68,2%) e no fato da cidade possuir um CCZ com uma equipe treinada para captura e orientação da população quanto à presença de morcegos que, desde 1988, é realizada como parte do programa de vigilância da raiva e com laboratório de diagnóstico de zoonoses.

As outras cidades que enviaram espécimes não possuem laboratório. Outro agravante pode ser as condições dos espécimes do interior, uma vez que as amostras eram congeladas para envio semanal ou mensal, e em alguns casos os morcegos já não se encontravam em bom estado de conservação, o que poderia dificultar o isolamento do agente. Já as amostras procedentes da cidade de São Paulo estavam na sua maioria em boas condições para diagnóstico.

A presença de morcegos próximos ao nosso convívio em função da facilidade de abrigo e oferta de alimentos com a agravante da existência de morcegos contaminados com *H. capsulatum* torna real o risco de pessoas ou animais adquirirem a infecção micótica tanto a histoplasmose infecção como a histoplasmose doença, dependendo do grau de contaminação desses locais e do estado imunológico desses indivíduos.

Os morcegos são animais extremamente importantes para o equilíbrio ecológico, protegidos pela legislação (Lei Federal 9605/1998)\* e sua eliminação indiscriminada é crime contra a natureza.

Com medidas simples, como vedar o acesso desses animais nas residências, é possível afastá-los ou retirá-los das habitações sem comprometer a sobrevivência da espécie e prevenir a transmissão da doença para humanos.

---

\*Brasil. Distrito Federal. Lei Federal 9605, de fevereiro de 1998.  
<[http://www.sigam.ambiente.sp.gov.br/sigam2/legisla%C3%A7%C3%A3o%20ambiental/lei%20fed%201998\\_9605.pdf](http://www.sigam.ambiente.sp.gov.br/sigam2/legisla%C3%A7%C3%A3o%20ambiental/lei%20fed%201998_9605.pdf)>. acesso em 04/11/09.

## 6 CONCLUSÕES

- A prevalência de *H. capsulatum* em morcegos foi de 3,6%. Esta taxa possivelmente tem relevância em relação à transmissão da doença para humanos, pelo fato de que 37,9% dos morcegos infectados foram encontrados abrigados em forros de residência.

- A caracterização morfológica dos isolados apresentou diferenças fenotípicas em relação à coloração da colônia (branca e castanha) e a quantidade de conídios produzidos, apesar de terem sido cultivados nas mesmas condições atmosféricas, de temperatura e luminosidade, o que pode estar associado à virulência, uma vez que em colônias castanhas foi observada maior quantidade de conídios, permitindo, assim, uma propagação maior do fungo no ambiente.

- As 87 amostras positivas foram detectadas em 5 diferentes espécies de morcegos, de hábito alimentar insetívoro todos pertencentes à Família Molossidae, sendo que as espécies mais envolvidas na infecção por *H. capsulatum* foram *Molossus molossus* e *Nyctinomops macrotis* que habitualmente compartilham o mesmo abrigo.

- As fêmeas parecem ser mais suscetíveis à infecção por *H. capsulatum*, o que pode estar associado a um possível comportamento de permanecer mais tempo no abrigo cuidando dos filhotes ou período gestacional. No caso da espécie *Nyctinomops macrotis* as fêmeas estão mais expostas aos propágulos fúngicos, uma vez que formam colônias maternidade das quais os machos são segregados.

- A prevalência de *Histoplasma capsulatum* em fezes coletada em abrigos foi de 1,6%. A baixa prevalência observada pode estar relacionada à dificuldade de se obter várias amostras de diferentes locais dos abrigos o que poderia aumentar as chances de isolamento.
- Os isolados de *Histoplasma capsulatum* apresentaram alto grau de polimorfismo genético, sugerindo diferentes populações deste fungo, nos municípios do Estado de São Paulo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

AGUIAR, L.M.; TADDEI, V.A. Workshop sobre a conservação dos morcegos brasileiros. **Chiroptera Neotropical**, v. 1, n. 2, p. 24-29, 1995.

AJELLO, L. Soil as natural reservoir for human pathogenesis fungi. **Science**, v. 123, p. 876-879, 1956.

ALLENDOERFER, R.; DEEPE JR., G.S. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2564-2569, 1997.

ALLENDOERFER, R.; DEEPE JR., G.S. Infection with *Histoplasma capsulatum*: host-fungus interface. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 5, p. 256-260, 1998.

ALMEIDA, M.F.; MARTORELLI, L.F.A.; AIRES, C.C.; SALLUM, P.C.; DURIGON, E.L.; MASSAD, E. Experimental rabies infection in haematophagus bat *Desmodus rotundus*. **Epidemiol. Infect.**, v. 133, p. 523-527, 2005.

ALVES, K.S. **Histoplasmose disseminada e síndrome de imunodeficiência adquirida: estudo clínico-laboratorial de 28 casos.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ARELLANO-SOTA, C. Biology, ecology, and control of the vampire bat. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, n. 4, p. S615-S619, 1988.

BARNARD, S. **Bats in captivity.** Sprinville, USA: Wild Ones Animal Books, 1995. 194 p.

BARTLETT, P.C.; VONBEHREN, L.A.; TEWARI, R.P.; MARTIN, R.J.; EAGLETON, L.; ISAAC, M.J.; KULKARNI, P.S. Bats in the belfry: an outbreak of histoplasmosis. **Am. J. Public Health**, v. 72, n. 12, p.1369-72, 1982.

BENEVIDES, C.F.L.; DURAES, R.O.; AQUINO, B.; SCHIAVON, L.L.; NARCISO-SCHIAVON, J.L.; BUZZOLETI, F.C. Histoplasmose adrenal bilateral em um homem imunocompetente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 230-233, 2007.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERLINER, M.D.; BIUNDO JR, N. Effects of continuous light and total darkness on cultures of *Histoplasma capsulatum*. **Sabouraudia**, v. 11, p. 48-51, 1973.

BREDT A.; ARAUJO F.A.H.; CAETANO-JUNIOR J.; RODRIGUES M.G.R.; YOSHIZAWA M.; SILVA M.M.S.; HARMANI N.M.S.; MASSUNAGA P.N.T.; BÜRER S.P.; PORTO V.A.R.; UIEDA W. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 177 p.

CANTEROS, C.E.; IACHINI, R.H.; RIVAS, M.C.; VACCARO, O.; MADARIAGA, J.; GALARZA, R.; SNAIDERMAN, L.; MARTÍNEZ, M.; PALADINO, M.; CICUTTIN, G.; VARELA, E.; ALCOBA, E.; ZUIANI, F.; SAHAZA, J.H.; TAYLOR, M.L.; DAVEL, G. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. **Rev. Argentina Microbiol.**, v. 37, p. 46-56, 2005.

CARVAJAL-ZAMORA, J.R. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from tissues of bats captured in Aguas Buenas Caves, Aguas Buenos, Puerto Rico. **Mycopathologia**, v. 60, n. 3, p. 167-169, 1977.

CASSOTI, J.A.S.; MOTTA, T.Q.R.; FERREIRA-JUNIOR, C.U.G.; CERUTTI-JUNIOR, C. Disseminated histoplasmosis in HIV positive patients in Espírito Santo State, Brazil: a clinical-laboratory study of 12 cases (1999-2001). **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 5, p. 327-330, 2006.

CONSTANTINE, D.G. Health precautions for bat researchers. In: KUNZ, T.H. (Ed.). **Ecological and behavioral methods for the study of bats**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1998. p. 491-528.

CURY, G.C.; FILHO, A.D.; CRUZ, A.G.C.; HOBAIKA, A.B.S. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 483-486, 2001.

Di SALVO, A.F.; AJELLO, L.; PALMER JR, J.W.; WINKLER, W.G. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. **Am. J. Epidemiol.**, v. 89, p. 606-614, 1969.

EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. Histoplasma variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, n. 4, p. 411-421, 1991.

EMMONS, C.W.; KLITE, P.D.; BAER, G.M.; HILL JR, W.B. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the United States. **Am. J. Epidemiol.**, v. 84, n.1, p. 103-9, 1966.

EMMONS, C.W. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **Public Health Rep.**, v. 64, p. 892-896, 1949.

EMMONS, C.W. Association of Bats with Histoplasmosis **Public Health Rep.**, v. 73, n.7, p. 590-595, 1958.

ESBÉRARD, C.E.L.; LUZ, E.M.; CHAGAS, A.S. Uso de residências para refúgios por morcegos no Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 21, n.1, p 17-20, 1999.

FAVA-NETTO, C.; SILVA, U.A.; CHAMMAS, F.; LACAZ, C.S. Histoplasmose epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 9, p. 222-232, 1967.

FAVA-NETTO C.; ALMEIDA, N.J.M.; GUERRA, M.; COSTA, E.O. Histoplasmose epidêmica. Novos surtos ocorridos no litoral norte do Estado de São Paulo. Inquérito epidemiológico com histoplasmina e paracoccidioidina. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 18, p. 108-112, 1976.

FRESSATTI, R.; DIAS-SIQUEIRA, V.L.; SVIDZINSKI, T.I.E.; HERRERO, F.; KEMMELMEIER, C. A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* v. *capsulatum* into its yeast-like form. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 87, n.1, p. 53-58, 1992.

GAUR, P.K.; LICHTWARDT, R. W.; HAMRICK, J. L. Isozyme Variation among Soil Isolates of *Histoplasma capsulatum*. **Exp. Mycol.**, v. 5, p. 69-77, 1981.

GOULD, E. The feeding efficiency of insectivorous bats. **J. Mammol.**, v. 6, n.3, p. 399:407, 1955.

GRAYBILL, J.R. Histoplasmosis and AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 623-628, 1988.

GREER, D.L.; MCMURRAY, D.N. Pathogenesis of experimental histoplasmosis in bat, *Artibeus Lituratus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, n. 3, p. 653-659, 1981.

GREENHALL, A.M. **House bat management**. Washington: US Fish and wildlife service, 1982. 33 p. (Resource Publication, 143).

GUIMARÃES, A.J.; NOSANCHUCK, J.D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Diagnosis of histoplasmosis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 1-13, 2006.

HOFF, G.L.; BIGLER, W.J. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. **J. Wildlife Dis.**, v. 17, n. 2, p. 191-196, 1981.

HUHN, G.D.; AUSTIN, C.; CARR, M.; HEYER, D.; BOUDREAU, P.; GILBERT, G.; EIMEN, T.; LINDSLEY, M.D.; CALI, S.; CONOVER, C.S.; DWORKIN, M.S. Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. **Environ. Health Perspect.**, v. 113, n. 5, p. 585-9, 2005.

IMANO, E.C.M. **Variabilidade Genética em *Histoplasma capsulatum*** . 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

JULG, B.; ELIAS, J.; ZAHN, A.; KOPPEN, S.; BECKER-GAAB, C.; BOGNER, J.R. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. **J. Travel. Med.**, v. 15, p. 133–136, 2008.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 115–132, 2007.

KLITE, P.D.; DIERCKS, F.H. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the canal zone. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 14, p. 433-439, 1965.

LACAZ, C.S.; DEL NEGRO, G.M.B.; VIDAL, M.S.M.; HEINS-VACCARI, E.M.; SANTOS, R.F.; MARTINS, M.A.; OZAKI, M.M.; ROMITI, R.; PROENÇA, R.; CASTRO, L.G.M. Histoplasmoze cutânea disseminada atípica em criança imunocompetente, causada por uma variedade “aberrante” de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 1, n. 3, p. 195-202, 1999.

LACAZ, C.S. Histoplasmoze. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. (Ed.). **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 594-617.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação: fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

LEVI, G.C.; POZZI, C.M.; HIRSCHHEIMER, S.M.D.S.; CHAHADE, W.H.; GOMES, H.G.; GRANATO, C. Histoplasmoze do Sistema Nervoso Central como única manifestação da doença em pacientes imunocompetentes: apresentação de dois casos. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 61, n. 3B, p. 859-863, 2003.

LYON, G.M.; BRAVO, A.V.; ESPINO, A.; LINDSLEY, M.D.; GUTIERREZ, R.E.; RODRIGUES, I.; CORELLA, A.; CARRILLO, F.; MCNEIL, M.M.; WARNOCK,

D.W.; HAJJEH, R.A. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, n. 4, p. 438-442, 2004.

MARTINS, E.M.L.; MARCHIORI, E.; DAMATO, S.D.; POZES, A.S.; SILVA, A.C.G.; DALSTON, M. Histoplasmosse pulmonar aguda: relato de uma microepidemia. **Radiol. Bras.**, v. 36, n. 3, p. 147-151, 2003.

MARTINS, R.C.; NIGRI, D.H.; MONTEIRO, A.S.; ADDOR, G.; FRANCO, C.A.B. Histoplasmosse pulmonar em clínica privada no Rio de Janeiro. **Pulmão RJ**, v. 4, n. 3, p. 197-201, 2005.

MCKENNA, M.C.; BELL, S.K. **Classification of mammals - above the species level**. New York: Columbia University Press, 1997. 631 p.

MCMURRAY, D.N.; GREER, D.L. Immune responses in bats following intranasal infection with *Histoplasma capsulatum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 8, p. 1036-1039, 1979.

MCMURRAY, D.N.; RUSSELL L.H. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 31, p. 527-531, 1982.

MUNIZ, M.M.; PIZZINI, C.V.; PERALTA, J.M.; REISS, E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n.12, p. 4487-4494, 2001.

NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; NAIFF, M.F.; FERREIRA, L.C.L.; ARIAS, J.R. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 38, n. 4 p.273-277, 1996.

NOSANCHUK, J.D.; GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. **Microbes Infect.**, v.10, n. 9, p. 973-977, 2008.

NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. 5. ed. Baltimore and London: Johns Hopkins University Press, 1991. v. 2, p. 393.

OLIVEIRA, F.M.; UNIS, G.; SEVERO, L.C. Microepidemia de histoplasmosse em Blumenau, Santa Catarina. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 4, p. 375-8, 2006.

PAULA, A.; AIDÉ M.A. As microepidemias de histoplasmosse do Estado do Rio de Janeiro. **J. Bras. Med.**, v. 49, p. 18-28, 1985.



PRADO, M.; DA SILVA M.B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.

PEÇANHA-MARTINS, A.C.; COSTA-NEVES, M.L.; LOPES, A.A.; QUERINO-SANTOS, N.N.; ARAUJO, N.N.; MATOS-PEREIRA, K. Histoplasmosis presenting as acute respiratory distress syndrome after exposure to bat feces in a home basement. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 103-106, 2000.

REYES-MONTES, M.R.; TAYLOR, M.L.; CURIEL-QUESADA, E.; MESA-ARANGO, A.C., Estado actual de la tipificación del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: una revisión de los hallazgos [review]. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 121-126, 2000.

REIS, N.R.; SHIBATTA, O.A.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Sobre os morcegos brasileiros. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007. p. 17-25.

RIPPON, J.W. Medical Mycology: **Pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1988.

RYDELL, J.; RACEY, P.A. Street lamps and the feeding ecology of insectivorous bats. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, v. 67, p. 291-307, 1995.

ROCHA, M.M.; SEVERO, L.C. Histoplasmoze disseminada em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Estudo de 25 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 36, n. 02, p. 167-170, 1994.

SATHAPATAYAVONGS, B.; BATTEIGER, B.E.; WHEAT, J.; SLAMA, T.G.; WASS, J.L. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis during two large urban outbreaks. **Medicine**, v. 62, p. 263-270, 1983.

SCHMIDT, S.; MACHADO, O.P.; GALVÃO, A.B. Microepidemia de histoplasmoze na zona rural de Brasília, DF, 1967. II. Estudos epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 8, p. 159-165, 1973.

SHACKLETTE, M.H.; DIERKS, F.H.; GALE, N.B. *Histoplasma capsulatum* recovered from bat tissues. **Science**, v. 35, p. 1135, 1962.

SHACKLETTE, M.H.; HASENCLEVER, H.F. Variation of rates of natural infection with *Histoplasma capsulatum* in bats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, p. 53-57, 1969.

SCHÖNIAN, G.; GRÄSER, Y.; MEUSEL, O.; MEYER, W.; BUCHHOLZ, P.; PRESBER, W.; MITCHELL, T. G. "Application of PCR fingerprinting to epidemiological analysis of bacterial and fungal pathogens." In: ROLFS, A. et al. (Ed.). **Usage of PCR and alternative methods in infectious and genetic diseases.** [S.l.: s.n.], 1993.

SIMMONS, N.B. Order Chiroptera. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (Ed.). **Mammals species of the world.** 3<sup>rd</sup> ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. v. 1, p. 312-529.

SPITZER, E.D.; LASKER, B.A.; TRAVIS, S.J.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1409-1412, 1989.

SODRÉ, M.M. Morcegos e saúde pública - biologia e manejo de quirópteros no município de São Paulo. In: SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE. COVISA, CCZ. **Boletim Informativo:** Controle de Fauna Sinantropica 1998-2002. São Paulo: COVISA, CCZ, 2003.

SUZAKI, A.; KIMURA, M.; KIMURA, S.; SHIMADA, K.; MIYAJI, M.; KAUFMAN, L. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. **J. Mycol. Med.**, v. 5, p. 40-43, 1995.

TADDEI, V.A. Sistemática de quirópteros. **Bol. Inst. Pasteur São Paulo**, v. 1, n. 2, p. 3-15, 1996.

TAYLOR, M.L.; CHAVES-TAPIA, C.B.; VARGAS-YANEZ, R.; RODRIGUES-ARELLANE, PENA-SANDOVAL GR, TORIELLO C, PEREZ A, REYES-MONTES MR. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 1999.

TAYLOR, M.L.; CHÁVEZ-TAPIA, C.B.; REYES-MONTES, M.R. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. **Fungal Genet. Biol.**, v.30, p. 207-212, 2000.

TAYLOR, M.L.; CHAVES-TAPIA, C.B.; ROJAS-MARTÍNEZ, A.; REYES-MONTES, M.R.; VALLE, M.B.; ZÚNIGA, G. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.45, p. 451-458, 2005.

VARGAS-YAÑEZ, R.; PEÑA-SANDOVAL, G.R.; CHÁVEZ-TAPIA, C.B.; TAYLOR, M.L. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. **Rev. Inst. Nac. Enf. Resp.**, Mexico, v. 11: 192-194, 1998.

VICENTINI-MOREIRA, A.P.; KOHARA, V. S.; PASSOS, A. N.; FELICIANO, R. S.; BARRETO L. C.; FREITAS, R. S., SANTOS M. A. B.D. V.; GARCIA, M.C.A. Microepidemia de histoplasmose no município de Arapeí, São Paulo. *Histoplasmosis microepidemics in the city of Arapeí, São Paulo.* **Bepa**, v. 5, n. 58, out. 2008.

VIZOTTO, L.D.; TADDEI, V.A. Chave para a determinação de quirópteros brasileiros. **Bol. Cienc.**, São José do Rio Preto, v. 1, p. 1-72, 1973.

WHEAT, L.J. et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and a review of the literature. **Medicine**, v. 69: p. 361-374, 1990.

WHEAT, L.J. Histoplasmosis and coccidioidomycosis in individuals with AIDS. A clinical review, **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 8, p. 467–482, 1994.

WHEAT, L.J. Histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome. **Curr. Topics Med. Mycol.**, v. 7: p. 7-18, 1996.

WHEAT, L.J.; KAUFFMAN C.A. Histoplasmosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 17, p. 1-19, 2003.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylo- genetics. In: INNIS, M.A.; GELFAUD, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: A guide to methods and applications.** San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILSON, D.E. **Bats in question.** Washington and London: The Smithsonian Institution Press, 1997. p. 168.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; WANKE, B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no município do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 45-52, 1986.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; TAVARES, P.M.S.; MUNIZ, M.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 45, p. 443–449, 2005.

ZEIDBERG, L. D.; AJELLO, L.; DILLON, A.; RUNYON, L. C. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **Am. J. Pub. Health**, v. 42: p. 930-935, 1952.

## ANEXOS

## Anexo A – Tabela A.3 (CANTEROS et al., 2005)

Tabla 3. Especies de murciélagos con aislamiento positivo de *H. capsulatum*

Familias / género y especies	País de origen
<i>Mormoopidae</i>	
<i>Mormoops blainvillii</i>	Cuba
<i>Mormoops megalophylla</i>	México
<i>Pteronotus davyi</i>	México
<i>Pteronotus parnellii</i> ( <i>Chilonycteris rubiginosa</i> )	Panamá, Belice, México
<i>Pteronotus gymnotus</i> ( <i>P. suapurensis</i> )	Panamá
<i>Phyllostomidae</i>	
<i>Artibeus hirsutus</i>	México
<i>Artibeus jamaicensis</i>	El Salvador, Cuba
<i>Brachyphylla cavernarum</i>	Puerto Rico
<i>Brachyphylla nana</i>	Cuba
<i>Carollia perspicillata</i>	Panamá, Colombia, Ecuador
<i>Desmodus rotundus</i>	Panamá, Colombia
<i>Glossophaga soricina</i>	Panamá, Colombia
<i>Leptonycteris curasoae</i> ( <i>L. sanborni</i> )	EUA, México
<i>Leptonycteris nivalis</i>	México
<i>Lonchophylla robusta</i>	Panamá
<i>Lonchorhina aurita</i>	Panamá
<i>Macrotus waterhousii</i>	Cuba
<i>Micronycteris megalotis</i>	Panamá
<i>Phyllostomus discolor</i>	Panamá, El Salvador
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Panamá
<i>Tonatia bidens</i>	Panamá
<i>Vespertilionidae</i>	
<i>Eptesicus brasiliensis</i>	Colombia
<i>Eptesicus fuscus</i>	EUA, Cuba
<i>Myotis austroriparius</i>	EUA
<i>Myotis californicus</i>	México
<i>Myotis grisescens</i>	EUA
<i>Myotis lucifugus</i>	EUA
<i>Myotis myotis</i>	Israel
<i>Myotis sodalis</i>	EUA
<i>Nycticeius humeralis</i>	EUA
<i>Pipistrellus subflavus</i>	EUA
<i>Molossidae</i>	
<b><i>Eumops bonariensis</i></b>	<b>Argentina</b>
<i>Molossus molossus</i>	Panamá, Ecuador
<i>Molossus</i> sp.	Panamá
<i>Nyctinomops laticaudatus</i> ( <i>Tadarida yucatanica</i> )	Panamá
<i>Tadarida brasiliensis</i> ( <i>T. cynocephala</i> )	EUA
<i>Noctilionidae</i>	
<i>Noctilio albiventris</i> ( <i>N. labialis</i> )	Panamá
<i>Natalidae</i>	
<i>Natalus stramineus</i>	México

Las especies de murciélagos incluidas en esta tabla corresponden a las referencias de Constantine (10), Di Salvo (13), Hoff (19), Klite (22), Vargas Yañez (55), e incluyen el actual informe. La nomenclatura de la cita original aparece entre paréntesis en el caso de que las especies hayan pasado a sinonimia (58).

**Anexo B – Tabela B.8 (PRADO et al., 2009)**

TABLE VIII

Number and frequency of mentions to systemic mycoses in deaths with underlying cause of AIDS in Brazil from 1996-2006<sup>a</sup>

Mention (3C - ICD - 10)	n	%	Number per 1,000 deaths of AIDS
B45 Cryptococcosis	3001	50.9	23.89
B37 Candidiasis	1780	30.2	4.17
B39 Histoplasmosis	594	10.1	4.73
B44 Aspergillosis	427	7.2	3.40
B40 e B41 (Blastomycosis/Paracoccidioidomycosis)	84	1.4	0.67
B38 Coccidioidomycosis	11	0.2	0.09
B46 Zygomycosis	1	0.0	0.01
Total (systemic mycoses)	5.898	100.0	46.95

*a*: preliminary data for 2006. Obits by AIDS as basic cause of death (Cod B20-24 - Chapter I - same infectious and parasitic disease - ICD - 10). Mention to systemic mycosis anywhere in part I or II of obit declaration with AIDS as the basic cause of death.

**Anexo C - Meios de Cultura, Soluções e Reagentes****Meio Ágar-BHI**

Infusão de coração.....	250 g
Infusão de cérebro.....	200 g
Peptona.....	10 g
Dextrose.....	2 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Fosfato de sódio.....	2,5 g
Água destilada.....	1.000 mL
pH: 7,2 - 7,4	

**Meio Ágar Sabouraud – pH: 7,0**

Glicose .....	40 g
Peptona caseína.....	10 g
Gelose (Ágar).....	15 g
Água destilada.....	1000 mL

**Meio Ágar Sabouraud com Ciclohexamida e Cloranfenicol (Mycosel<sup>®</sup>)**

Dextrose.....	20 g
Peptona.....	10 g
Ágar.....	20 g
Ciclohexamida.....	500 mg

Cloranfenicol.....	50 mg
Água destilada.....	1000 mL

O meio foi esterilizado e resfriado até 60°C, acrescentando em seguida os antibióticos, previamente dissolvidos e esterilizados em filtro “Millipore”. A ciclohexamida foi dissolvida em 10 mL de acetona e o Cloranfenicol em 10 mL de álcool a 95 °C.

### **Meio ML-Gema**

Müeller-Hinton Broth (MHB).....	2,1 g
Ágar.....	1,0 g
Dextrose.....	2,0 g
L-cisteína (sol. a 1%).....	0,5 mL
Gema de ovo.....	15 mL
Água destilada.....	100 mL

PH: 7,0 - 7,2

### **SOLUÇÕES E REAGENTES**

#### **Corante Azul de Algodão (CRUZ, 1981)**

Ácido Lático.....	20,0 g
Cristais de fenol.....	20,0 g
Glicerina.....	20,0 g
Azul de algodão (Methyl Blue Difco).....	0,05 g
Água destilada.....	p/ 20,0 mL

**Solução de L-cisteína a 1%**

L-cisteína.....1 g

Água deionizada.....100 mL

**Solução Cisteína**

840 mg de cisteína

50 mL HCl 1 N

Completar H<sub>2</sub>O destilada p/ 100 mL

A solução de cisteína 1% foi preparada e esterilizada por filtração em membrana a 0,22 µ e estocada em frascos de vidro âmbar esterilizados.

**Solução Salina 0,85% (p/v)**

NaCl.....8,5 g

H<sub>2</sub>O destilada.....1000 mL



### Anexo D - Procedimento da reação

#### M13

Reagentes	Concentração dos reagentes	Volume para cada reação	Volume para o master mix
Buffer 10X + 1.5 mM MgCl <sub>2</sub>		5 ul	
dNTP	2 mM	5 ul	
Primer M13	10 ng/ul	3 ul	
MgAc	50 mM	3 ul	
Taq DNA polimerase	2.5 U/ul	0.5 ul	
H <sub>2</sub> O		31 ul	
<b>DNA</b>	<b>10 ng/ul</b>	<b>2.5 ul</b>	Acrescentado por último.
Volume final		50 ul	

#### GACA<sub>4</sub>

Reagentes	Concentração dos reagentes	Volume para cada reação	Volume para o master mix
Buffer 10X + 1.5 mM MgCl <sub>2</sub>		5 ul	
dNTP	2 mM	5 ul	
Primer GACA <sub>4</sub>	30 ng/ul	3 ul	
MgAc	50 mM	3 ul	
Taq DNA polimerase	2.5 U/ul	0.5 ul	
H <sub>2</sub> O		31 ul	
<b>DNA</b>	<b>25 ng/ul</b>	<b>2.5 ul</b>	Acrescentado por último.
Volume final		25 ul	