

Título da experiência: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO-REAL (QPCR) PARA DETECÇÃO DE HISTOPLASMA CAPSULATUM EM AMOSTRAS DE FEZES DE MORCEGO NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO

Tema da experiência: Vigilância em Saúde

Autores

Adriana Araujo Reis Menezes ¹, Lilian Dias Orico ¹, Juliana Amorim Conselheiro ¹, Maria Adelaide Galvão Dias ¹, Iraci Martins Grigorio ¹, Hildebrando Montenegro Netto ¹, Adriana Ruckert Rosa ¹, Débora Cardoso de Oliveira ¹, Carlos Pelleschi Taborda ¹

Instituição

¹ PMSP/SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SÃO PAULO - PMSP/SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SÃO PAULO

Resumo

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dentre as atribuições do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) está a vigilância da população de morcegos no ambiente urbano, quanto ao seu potencial zoonótico. O acúmulo de fezes de morcegos em locais fechados pode propiciar o crescimento de *Histoplasma capsulatum*, fungo patogênico causador da histoplasmose. A severidade da infecção está relacionada à quantidade inalada de conídios. (Galvão-Dias et al, 2011). O diagnóstico atualmente é baseado em isolamento em meio Sabouraud seguido de observação em microscópio. Entretanto, a cultura de *H.capsulatum* leva mais de 30 dias para se desenvolver. Esta limitação levou ao desenvolvimento de técnicas moleculares para detecção deste patógeno, e nos últimos anos diferentes protocolos de PCR foram testados (BUITRAGO et al, 2013). Este projeto tem como objetivo identificar *Histoplasma capsulatum* em amostras de fezes de morcegos da área urbana de São Paulo, utilizando a técnica de PCR em tempo real, contribuindo dessa forma para o estudo da epidemiologia e prevalência desse microrganismo neste ambiente.

OBJETIVOS

Identificar, por meio da padronização do método de PCR em Tempo Real, o fungo patogênico *Histoplasma capsulatum* em amostras de fezes de morcegos coletadas em residências na cidade de São Paulo, identificando as áreas potenciais na transmissão dessa doença.

METODOLOGIA

Na padronização da técnica foram testadas 20 amostras de fezes coletadas pelo Setor de Quirópteros entre 2014 e 2015. Como controle positivo, foi selecionado o isolado de *H.capsulatum* MIC1408/14, da coleção de culturas do Setor de Micologia. A extração de DNA, tanto das amostras de fezes como da cultura utilizada como controle positivo, foi feita usando o PowerSoil Isolation Kit (MoBio), segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado pela técnica convencional de PCR, sendo adicionado a uma reação contendo H₂O DEPC, PCR Buffer 1x; 5mM MgCl₂; 200µM DNTPmix; 0,5µM de cada iniciador ITS1 e ITS4; 2,5% DMSO; 2,5U Taq Platinum. Em seguida os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose. O alvo para o ensaio Taqman® de qPCR foi a região ITS1 do DNA ribossomal. Foram usados os seguintes iniciadores: primers HcITS-54F e HcITS-204R e a sonda HcITS-155. Como controle da reação foi usado o ensaio inventariado Taqman® Gene Expression Assay que utiliza como alvo o gene da β-actina presentes nas células sanguíneas de cavalo. Este ensaio foi executado no Aparelho StepOne PCR System (Applied Biosystems).

RESULTADOS

Comparando os resultados das duas técnicas de PCR utilizados para detecção de *H. capsulatum* em amostras de fezes de morcego, pode-se observar que a técnica de qPCR mostrou ser mais sensível quando comparada com a convencional. Das 20 amostras de fezes coletadas em residências no

município de São Paulo, pelo Setor de Quirópteros, duas foram positivas. Pelo método convencional, pode ser visto em gel de agarose, uma banda muito fraca referente a um produto de PCR em torno de 180 pb para as amostras F20 e F23. A visualização dos resultados é uma das limitações dessa técnica. Se a amostra contém pouco DNA o produto de PCR gerado produz uma banda fraca no gel de agarose podendo gerar dúvidas nas análises posteriores. Quando as mesmas amostras foram analisadas por qPCR, puderam ser vistas claramente as curvas de amplificação do DNA dessas amostras que confirmaram que a amostra é positiva para *H. capsulatum*. Pelo método tradicional de crescimento em meio de cultura, apenas uma amostra de fezes de morcegos entregue ao Setor de Micologia desde 2003, foi positiva para *H. capsulatum*. Devido à natureza desse material, a taxa de contaminação da cultura é alta, e outros fungos ou bactérias, com crescimento mais rápido acabam inviabilizando o crescimento de *H. capsulatum*, que possui um crescimento muito lento. A técnica de qPCR para detecção de DNA de *H. capsulatum* em amostras de fezes de morcego pode ser considerada padronizada no LabZoo e, atualmente, um Banco de Dados exclusivo para o diagnóstico por PCR está sendo desenvolvido. A aprovação do projeto financiado pela FAPESP (2014/06571-2), com duração até julho de 2016, permitiu que essa nova técnica pudesse ser estabelecida no Setor de Micologia, agilizando dessa forma a liberação de resultados. A partir desse momento, as amostra de fezes serão processadas apenas pelo método de qPCR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta técnica mostrou ser uma importante ferramenta na detecção deste patógeno em amostras de fezes de morcegos. Em apenas um dia podemos obter informações que permitirão que ações de prevenção e controle da histoplasmose sejam desencadeadas evitando assim uma possível transmissão para a população. A implementação dessa técnica abre novas perspectivas de desenvolvimentos de ensaios de PCR em Tempo Real para detecção de outros agentes de interesse em Saúde Pública.

Referências Bibliográficas

- Buitrago, M.J.; Canteros, C.E.; Frías de León, G.; Gonzales, A.; de Oliveira, M.M.E.; Muñoz, C.O.; Ramirez, J.A.; Toranzo, A.I.; Zancopé-Oliveira, R.; Cuenca-Estrella, M. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev. Iberoam Micol.* 30(4):256-260, 2013.
- Galvão-Dias, M.A.; Zancopé-Oliveira, R.M.; Giudice, M.C.; Montenegro, H.; Jordão, L.R.; Grigorio, I.M.; Rosa, A.R.; Amorim, J.; Nosanchuk, J.D.; Travassos, L.R.; Taborda, C.P. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. *Epidemiol. Infect.* 139 (10):1642-1644, 2011.