

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

***HISTOPLASMA CAPSULATUM* EM PULMÕES DE MORCEGOS NO ESTADO
DE MATO GROSSO**

Dissertação de Mestrado

SILVANA SALOMÃO CURY VELOSO

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

***HISTOPLASMA CAPSULATUM* EM PULMÕES DE MORCEGOS NO ESTADO
DE MATO GROSSO**

SILVANA SALOMÃO CURY VELOSO

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

***HISTOPLASMA CAPSULATUM* EM PULMÕES DE MORCEGOS NO ESTADO
DE MATO GROSSO.**

SILVANA SALOMÃO CURY VELOSO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias, área de
concentração Microbiologia

Orientador: **Prof. Dr. Laerte Ferreira**

PORTO ALEGRE,

2015

SILVANA SALOMÃO CURY

***HISTOPLASMA CAPSULATUM* DETECTADOS EM PULMÕES DE
MORCEGOS NO ESTADO DE MATO GROSSO.**

Aprovada em 27 de novembro de 2015

APROVADA POR:

Prof.Dr. Laerte Ferreira

Orientador e Presidente da comissão

Dr. Régis Adriel Zanette/UFRGS

Membro da Comissão

Dr. Janio Moraes Santurio/UFSM

Membro da Comissão

Dr. Sérgio Ceroni da Silva/UFRGS

Membro da Comissão

Dra. Edna Maria Cavallini Sanches/UFRGS

Membro da Comissão/Suplente

À minha mãe e ao meu pai (in memorian) que sempre me incentivaram e propiciaram tantas oportunidades de estudo.

Á minha família, em especial meu esposo Marcelo Veloso e meu filho Guilherme Salomão que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado me ajudando com palavras de encorajamento e incansáveis manifestações de apoio, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Laerte Ferreiro, pela oportunidade e por todos os momentos de compreensão, incentivo e dedicação.

À minha amiga Edna Maria Cavallini Sanches, participante desse estudo, pela sua competência e disposição em ajudar, sem esmorecimento.

Aos Programas de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Veterinária (PPGCV/UFRGS) e da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pelos momentos partilhados e aos professores que fizeram parte desse percurso.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que este estudo pudesse ser concluído.

RESUMO

A histoplasmose é uma micose causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, está distribuído em áreas tropicais ou subtropicais e acomete mamíferos, principalmente os morcegos. Os propágulos infectantes do fungo são encontrados nas excretas dos quirópteros e a transmissão ocorre pela inalação dos mesmos, podendo causar infecção primária assintomática, uma infecção pulmonar aguda ou crônica, ou uma forma disseminada tanto em humanos quanto em animais. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Histoplasma capsulatum* em amostras pulmonares de espécies de morcegos provenientes do Estado de Mato Grosso. Foram capturados 75 morcegos entre 2007-2009 em cavernas, florestas e áreas urbanas do Estado de Mato Grosso (MT). Os morcegos foram capturados pelo INDEA/MT, órgão Oficial responsável pelo controle da Raiva dos Herbívoros. O *H. capsulatum* foi detectado pelo nested PCR que amplificou o gene *100kDA*. A amplificação dos produtos da PCR foram sequenciados para confirmação da presença do fungo nos pulmões dos morcegos. *H. capsulatum* foi observado em 16,0% (12) das 75 amostras dos pulmões de morcegos e com maior ocorrência nas espécies *Desmodus rotundus* (25%), *Artibeus lituratus*, *Molossus molossus* (16,7%) e nas espécies: *Artibeus* sp., *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* 8,3%. O presente estudo detecta o primeiro estudo sobre *H. capsulatum* em regiões do Estado de Mato Grosso tanto em área urbana como silvestre. Estes resultados revelaram uma positividade alta de *H. capsulatum* nos morcegos nesta região, comparando com a literatura descrita em amostras também provenientes de áreas urbanas do Estado de São Paulo, além de resultados similares aos achados nas espécies *Eumops glaucinus* e *N. macrotis*. A maior ocorrência nas amostras analisadas no presente estudo podem terem ocorrido devido a

técnica (nested PCR) processada e o órgão utilizado (pulmão). O nested PCR é um método mais sensível para avaliar colonização do agente. Tal colonização nos permite inferir que os quirópteros do Estado de Mato Grosso são reservatórios do *H. capsulatum* e enfatizam o potencial dos morcegos na transmissão do fungo.

Palavras-chave: Histoplasmose. *Histoplasma capsulatum*. Morcegos. Gene 100kDA. Pulmões. Colonização.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a mycosis caused by the dimorphic fungus Histoplasma capsulatum, which is distributed in tropical or subtropical areas affecting mammals especially bats. The infectious propagules are found in the bat guano and transmission occurs by inhalation of the same, allowing either an asymptomatic primary infection, acute or chronic pulmonary infection, or disseminated form in humans or animals. The aim of the present research was to detect the presence of the Histoplasma capsulatum in lung samples of bat species from state of Mato Grosso/Brazil. For this purpose, a highly sensitive nested PCR was used with specific molecular markers for pathogen. Seventy-five bats were captured between 2007 and 2009 in caves, florests, and urban areas of Mato Grosso (MT), located in the Mid-Western region. The bats were captured by the official agency responsible for rabies control of herbivores (INDEA / MT) following the guidelines of rabies control manual, standardized by the Ministry of the Agriculture. Detection of H. capsulatum DNA was amplified the HCp 100 locus. Amplification products were sequenced to confirm fungal presence in bat lungs. The amplifications results for H. capsulatum were positive in 12 (16.0%) samples. The greatest occurrence of Histoplasma capsulatum was observed in Desmodus rotundus (25%), Artibeus lituratus, Molossus molossus (16.7%) and in the species: Artibeus sp., Eumops glaucinus, Glossophaga soricina, Nyctinomops laticaudatus, Nyctinomops macrotis 8,3%. This study detects the first survey of Histoplasma capsulatum in regions of Mato Grosso in both urban and wild. These results revealed a high positivity of H. capsulatum in bats in this region, compared with the literature described in samples also from urban areas of São Paulo, and results similar to those found in species Eumops glaucinus and N. macrotis. The highest occurrence in the samples analyzed in this study may have occurred due to technical (nested PCR) processed and used organ

(lung). The nested PCR is a more sensitive method for assessing agent colonization. Such colonization allows us to infer that the bats in the State of Mato Grosso are reservoirs of H. capsulatum and emphasize the potential of bats in the transmission of the fungus

Keywords: *Histoplasmosis. Histoplasma capsulatum. Bats. Gene 100kDA. Lungs. Colonization.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Histoplasma capsulatum</i> em tecido pulmonar de morcegos provenientes do Estado de Mato Grosso.....	27
Tabela 2 -	<i>Histoplasma capsulatum</i> em espécies de morcegos no Estado de Mato Grosso.....	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Produtos da PCR de DNA extraídos de pulmões de morcegos infectados com *Histoplasma capsulatum*..... 28
- Figura 2** - Sequências de nucleotídeos dos produtos de PCR obtidos por amplificação parcial do gene *100kDA* para *Histoplasma capsulatum*..... 28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1.	Histoplasmose.....	16
2.1.1	Histoplasmose em animais.....	18
2.2	Diagnóstico Laboratorial.....	22
2.2.1	Diagnóstico Micológico.....	23
2.2.2	Diagnóstico Histológico.....	23
2.2.3	Diagnóstico Sorológico.....	24
2.2.4	Diagnóstico Molecular.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Amostras.....	25
3.2	Amplificação do DNA para <i>Histoplasma capsulatum</i>	25
4	RESULTADOS.....	26
5	DISCUSSÃO.....	29
6	CONCLUSÕES.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXOS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Os morcegos são hospedeiros de uma rica diversidade de microorganismos. Alguns trabalhos apontam uma estreita ligação entre quirópteros e fungos com potencial patogênico, principalmente por habitarem ambientes como cavernas, grutas e ocos de árvores, favoráveis à manutenção e propagação dos fungos (REZENDE; DUARTE; FILIÚ, 2003) como: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* (GROSE & TAMSITT, 1965; MOK; LUIZÃO; SILVA, 1982; TENCATE et al., 2012) *Pneumocystis* spp. (AKBAR et al., 2012; CAVALLINI SANCHES et al., 2012; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2012; SANCHES et al., 2009) e *Histoplasma capsulatum* (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2014; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

A primeira interação entre *H. capsulatum*, morcegos e população, foi descrita por Emmons em 1958, após o isolamento de *H. capsulatum*, a partir de amostras de solo contaminado com fezes de morcegos e microepideminas em visitantes de grutas e minas abandonadas (EMMONS, 1958; OLIVEIRA et al., 2006). Nestes ambientes são encontrados materiais de resíduos sob condições de humidade e temperatura, que favorecem o desenvolvimento da fase filamentosa, o qual produz os microconídios que são a forma infecciosa do fungo (EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W. E. 1991; 1994; TAYLOR; GRANADOS; TORIELLO, 1996).

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico de mamífero e a inalação dos propágulos fúngicos em suspensão sob a forma de aerossol, tanto em humanos como em animais, possibilita tanto uma infecção primária assintomática, uma infecção pulmonar aguda ou crônica, ou forma disseminada (LACAZ et al., 2002).

A infecção associada a este patógeno é relevante em áreas geográficas onde a mesma é endêmica ou epidêmica, como em Ohio e no Vale do Mississippi (USA) e algumas regiões da América Latina (Central e Sul) com alta frequência de surtos epidêmicos (TEWARI.; WHEAT; AJELLO, 1998; TAYLOR et al., 2000).

A histoplasmose é uma das mais comuns micoses sistêmica e endêmica no Brasil, apesar da mesma não estar inserida no sistema oficial de doenças controladas. Devido a tal fato, a disseminação das áreas endêmicas podem ser maiores do que se encontra registrado (ZANCOPÉ OLIVEIRA et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi detectar a ocorrência do *H. capsulatum* em pulmões de morcegos no Estado de Mato Grosso, pelo método de nested PCR do gene *100kDA*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histoplasmose

O fungo é um ascomiceto, que em sua forma sexual é chamado *Emmonsiaella capsulata*. Na forma assexuada, existem três variedades do fungo *H. capsulatum*: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, responsável por causar histoplasmose clássica, a apresentação mais comum da enfermidade no homem, *H. capsulatum* var. *duboisii* responsável pela histoplasmose humana nas regiões centrais e oeste da África (LOULERGUE et al., 2007) e *H. capsulatum* var. *farciminosum* que acomete os equinos (KAUFFMAN, 2007).

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo saprófita do solo, que cresce na forma micelial a temperatura de 25°C, em associação com solos úmidos contendo elevados teores de nitrogênio (ROSSINI & GOULART, 2006).

A histoplasmose é uma micose sistêmica, com características de doença granulomatosa com predileção pelo pulmão e órgãos do sistema imunológico. O espectro da doença varia entre assintomático à doença disseminada, no entanto, a maioria das infecções são subclínicas (AIDÉ, 2009).

A infecção acomete indivíduos saudáveis e se torna um problema sério em hospedeiros imunocomprometidos, como nos pacientes imunocomprometidos que podem desenvolver rapidamente a doença disseminada e requer rápido diagnóstico e tratamento (WHEAT & KAUFFMAN, 2003).

A infecção é causada pela inalação de propágulos fúngicos da fase micelial (fase infectante) do *H. capsulatum*, a qual encontra-se em áreas endêmicas e um conjunto de fatores determinam a distribuição do *Histoplasma capsulatum* no meio ambiente (WHEAT & KAUFFMAN, 2003; LACAZ, 2002; WHEAT et al., 2004). Geralmente ocorre associação de seu isolamento com microambientes fechados, como cavernas,

grutas, construções abandonadas, galinheiros, celeiros, florestas ou qualquer local onde o solo encontre-se enriquecido com excretas de aves e/ou morcegos (CANO & HAJJEH, 2001). Esta disseminação pode ocorrer através da própria movimentação do solo, o qual proporciona formação de aerossóis e conseqüentemente o transporte dos conídios, e contribuindo para que o morcego desempenhe um papel potencial na disseminação do *Histoplasma capsulatum* na natureza (WHEAT & KAUFFMAN, 2003; CANO & HAJJEH, 2001; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

A enfermidade foi descrita em 1906 por Darling em um paciente que trabalhava na construção do Canal do Panamá (TEWARI; WHEAT; AJELLO, 1998). Porém, o agente etiológico foi isolado até 1934 por De Monbreun (DE MONBREUN, 1934) e Emmons o isolou pela primeira vez do solo de uma toca de rato em 1949 (EMMONS, 1949).

Em 1952 o mesmo fungo foi relacionado em solos onde habitavam aves (ZEIDEBERG et al., 1952). Somente em 1958 o *H. capsulatum* é identificado em excretas de morcegos, devido o aparecimento de microepidemias em visitantes de grutas e minas abandonadas (OLIVEIRA; UNIS; SEVERO, 2006).

A doença é de incidência mundial, sendo que a área de maior prevalência é a região Centro-Oeste do território Norte-Americano, correspondente à região dos vales dos grandes rios americanos, Ohio, Mississipi e Missouri (GOODWIN & DES PREZ, 1978).

A histoplasmose por longo tempo foi considerada como uma doença comum recreacional em cavernas da América do Norte, mas recentemente o aumento de casos individuais que se dedicam em outras formas de turismo e ecoturismo da América do Norte para as Américas Central e do Sul, possibilitaram o desenvolvimento de surtos de histoplasmose entre Norte Americanos (PANACKAL et al., 2002).

No Brasil é endêmica em várias regiões sendo que casos de doença e/ou infecção têm sido relatados nos Estados São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Goiás,, Amazonas, Bahia, Pará e Pernambuco (PAULA&AIDÉ, 1985; RODRIGUES, 2004; LACAZ, 2002).

Nos Estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraíba, Amazonas e Bahia foram detectados 26 microepidemias, com isolamento no solo em cinco deles (Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal e Paraíba (UNIS; DROESCH; SEVERO, 2004) e no Estado de Santa Catarina a primeira microepidemia de histoplasmose pulmonar aguda, com isolamento do *H. capsulatum* do foco de infecção (OLIVEIRA; UNIS; SEVERO, 2006).

Em 2012, Vicentini et al., enfatizam o potencial das atividades profissionais praticadas em cavernas no Brasil, possibilitando risco de infecção por *Histoplasma capsulatum*, após analisar um grupo de 15 biólogos que apresentavam anticorpos séricos anti-*Histoplasma capsulatum*. Observou-se que deste grupo 87% relataram visitas à cavernas, 53% utilizaram acampamentos em grutas, 33% realizaram captura de morcegos e 53% fizeram coleta de amostras de solo. A maioria das cavernas se situavam no Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (VICENTINI et al., 2012).

Estudo realizado no Norte do Brasil , no Estado do Ceará em instituições de saúde de Fortaleza evidenciou que a positividade da infecção estava relacionada com presença de morcegos em residências e presença de árvore mangueira (SOARES, 2012)

2.1.1 Histoplasmose em animais

Considerando a endemicidade da histoplasmose humana no Brasil (DAHER et al., 2007), acredita-se que esta doença seja também comum entre os animais (BRILHANTE, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) lista a histoplasmose como zoonose e aponta o homem e diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres como hospedeiros acidentais (ACHA & SZYFRES, 1977).

Estudo conduzido em 479 animais registra 28 amostras de *Histoplasma capsulatum* obtidas de 8 espécies de mamíferos silvestres nos Estados do Amazonas, Pará e Rondonia. As infecções detectadas nestes animais arborícolas podem ser explicadas pelo transporte de conídios do fungo dentro de árvores ocas que tenham uma abertura ao nível do solo e outra a nível próximo das copas (NAIFF et al., 1996).

A histoplasmose em animais é mais comum em cães, gatos e equinos envolvendo o sistema respiratório, gastrointestinal, ou linfoide (JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993; McGAVIN & ZACHARY, 2007).

Dentre dos animais domésticos o cão é o animal que mais frequentemente apresenta manifestações clínicas de Histoplasmose. A afecção acomete preferencialmente animais com menos de cinco anos e de raças classificadas no grupo de caça e apreensão (SHERING, 1999; WOLF, 1998).

Não somente em cães de caça, mas também a infecção foi diagnosticada em um cão doméstico no Estado de Mato Grosso, que adquiriu através da ração contaminada com fezes de aves na vasilha de ração e também solo. Salientando assim a possibilidade de o homem e o animal de companhia adquirirem a infecção da mesma fonte, o solo, onde o fungo vive saprofiticamente (FERNANDES et al., 2003).

Em felinos a histoplasmose é a segunda doença mais comum (BROMEL & SYKES, 2005; DAHER, ET AL., 2007; BRILHANTE et al., 2012) e no Brasil foi encontrado o primeiro relato em gatos no Ceará (BRILHANTE et al., 2012). Nos gatos, a infecção por *Histoplasma capsulatum* é principalmente inaparente ou em muitos casos apresenta como doença clínica pulmonar granulomatosa ou doença disseminada

envolvendo alguns órgãos , incluindo linfonodos e tegumentos (BROMEL & SYKES, 2005; DAHER ET AL., 2007). A doença disseminada também já foi encontrada em felinos silvestres como os Leopardos (*Uncia Uncia*) em zoológico do México (ESPINOSA-AVILÉS et al., 2008).

Em quirópteros a maioria dos estudos sobre esta infecção foram dirigidos a isolar o fungo a partir de morcegos que habitavam cavernas. A percentagem de infecção varia de 0,1 a 66%, dependendo da topografia da caverna, do tamanho da colônia e das espécies capturadas (BRYLES; COZAD; ROBINSON,1969; ZAMORA, 1977; TAYLOR et al., 1999; McMURRAY & RUSSEL, 1982).

O alto risco da infecção natural em morcegos com *Histoplasma capsulatum* em ambientes de cavernas tem sido bem documentado no México (TAYLOR et al., 1999; CHÁVEZ-TAPIA et al., 1998) e juntamente com os primeiros achados moleculares de *H.capsulatum* isolados de morcegos infectados (CHÁVEZ-TAPIA et al., 1998; TAYLOR et al., 2000; KASUGA et al., 2003; TAYLOR; CHÁVEZ-TAPIA; REYES-MONTES, 2000). Em consequencia, a habilidade para distinguir isolados de fungos em morcegos infectados, baseados nos padrões genéticos pode fornecer um marcador biológico para melhor definir a distribuição do polimorfismo do *Histoplasma capsulatum* em áreas geográficas específicas (TAYLOR et al., 2005).

Em outros países como Argentina, Guiana Francesa e incluindo também o México, estudo com 122 morcegos, sendo 5 famílias e nove espécies, foram analisadas a migração, distribuição e tamanho das colônias foi evidenciado que destes 122 morcegos, 98 amostras de tecido pulmonar foram detectados *Histoplasma capsulatum*, utilizando a nested PCR do gene que codifica a proteína 100-kDA (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2014).

Outras duas regiões da França também foram estudados pulmões de morcegos silvestres e de cativeiro para determinar se eram portadores potenciais do *Histoplasma capsulatum*. Foram avaliados 83 morcegos, sendo 61 amostras provenientes do Zoológico de La Palmyre e 22 do Museo de História Natural de Bourges. Detectou-se somente um exemplar positivo nos morcegos de Bourges e este era morcego nativo proveniente de cativeiro utilizando nested PCR (100-kDA) (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2013).

No Brasil, pesquisa relacionada com morcegos, *Histoplasma capsulatum* e gruta, relatando infecção nos animais e presença do fungo nas excretas foi evidenciada na Gruta do Lago Azul em Bonito/Mato Grosso do Sul. A Gruta do Lago Azul, é uma gruta turística mais importante do Estado de Mato Grosso do Sul, que recebe 45.996 visitantes ao ano, possibilitando assim a disseminação deste agente.

Na Argentina ocorreu em área urbana, o primeiro registro mundial de *H.capsulatum* isolado de *Eumops bonariensis*, e na população de morcegos residentes nesta zona urbana. Esta pesquisa utilizou estudos genéticos que revelaram padrões moleculares relacionados entre os isolamentos *Histoplasma capsulatum* de morcegos e pacientes da mesma cidade, o que sugere uma fonte comum de infecção (CANTEROS et al., 2005).

As áreas urbanas brasileiras abrigam muitas espécies de morcegos, especialmente insectívoros, que são atraídos por uma grande variedade de comidas e abrigos. No Brasil na cidade de São Paulo e cidades vizinhas, foi realizado um levantamento para a detecção de histoplasmose em 2427 morcegos ; observou-se 87 amostras positivas (3,6%) em 23 generos e 42 espécies. Os morcegos infectados ou doentes foram capturados em diversos ambientes como telhados das casas, jardim, área externa das casas e em árvores. A maioria dos morcegos doentes encontrava-se nos

telhados das casas com uma população humana densa, conseqüentemente aumentado o risco de indivíduos nessas áreas para a histoplasmose (GALVÃO DIAS et al., 2011).

2.2 Diagnóstico laboratorial

A histoplasmose é principalmente diagnosticada pela cultura e detecção de antígenos ou anticorpos em espécies clínicas. A cultura do *Histoplasma capsulatum* requer laboratório de segurança nível III, e o diagnóstico imunológico tem sido utilizado, somente por alguns laboratórios especializados. Atualmente as análises da PCR são empregadas no diagnóstico da doença fúngica invasiva devido a sua alta sensibilidade e a redução no tempo de diagnóstico comparado com a cultura (MAKIMURA; MURAYAMA; YAMAGUCHI, 1994).

Detecção de antígeno em urina e/ou soro é um método útil em pacientes com histoplasmose disseminada (WHEAT; KOHLER; TEWARI, 1986; WHEAT et al., 2002) entretanto, este teste não é acessível na maioria das áreas não endêmicas (BUIRAGO et al., 2006).

Em situações onde a carga fúngica é alta, como na histoplasmose pulmonar difusa aguda, a cultura, histopatologia e detecção de antígeno são mais úteis. Em pacientes com doença branda, incluindo pulmonar subaguda, reumatológica, pericardites e síndromes mediastinal, estes testes não são frequentemente positivos, e os testes sorológicos são especialmente mais úteis. Na histoplasmose pulmonar crônica, a cultura das espécies respiratórias (lavado bronquico alveolar) são usualmente positivas, mas requer uso da broncoscopia (AIDÉ, 2002; WANKE; LAZERA; CAPONE, 2002).

2.2.1 Diagnóstico Micológico

O Histoplasma capsulatum var. capsulatum é um fungo dimórfico e saprófita do solo, que cresce na forma miceliar a temperatura de 25°C, em associação com solos úmidos contendo elevados teores de nitrogênio (ROSSINI & GOULART, 2006). Nesta forma, quando cultivadas em estufa laboratorial as colônias apresentam crescimento lento, textura algodonosa e coloração de anverso branca a creme, tornando-se acastanhadas com o passar do tempo, e reverso incolor ou amarelo acastanhado (GUIMARÃES; NOSANCHUK, ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006). Microscopicamente são observadas hifas hialinas septadas ramificadas, com cerca de 1 a 3 µm de diâmetro; observa-se macro e microconídeos em várias fases de desenvolvimento. Os microconídios podem ser piriformes ou esféricos, medindo de 2 a 4 µm de diâmetro, têm parede espessa e inicialmente lisa, apresentando, posteriormente, projeções verrucosas ou digitiformes, conhecidas como macroconídios tuberculados (KAUFFMAN, 2007).

Na fase parasitária, ou quando incubadas à temperatura de 37°C, as colônias são cremosas, lisas, brilhantes e úmidas, e possuem coloração branca, tendendo a escurecer com o tempo. No exame microscópico é possível observar pequenas células leveduriformes com cerca de 1 a 5 µm de diâmetro, ovaladas que, frequentemente, apresentam gemulação única (FERREIRA & BORGES, 2009).

2.2.2 Diagnóstico Histológico

O diagnóstico histopatológico é realizado em poucos dias, mas não é muito específico pois requer um patologista experiente, para o reconhecimento das formas fúngicas, devido estes organismos serem similares morfológicamente com outros patógenos fúngicos (WHEAT, 2006).

Para a coloração do fungo nos tecidos e no sangue, são utilizados corantes como o PAS e/ou prata metenamina Grocott-Gomori, e Giemsa (SHAUGHNESSY; SHEA; WITEBSKY, 2003).

2.2.3 Diagnóstico Sorológico

Para as reações sorológicas, podem ser utilizadas várias técnicas como a Reação de Fixação do Complemento (RFC), Imunodifusão dupla (ID) , Radioimunoensaio (RIA) (ROSSINI & GOULART, 2006) e teste de detecção de antígenos pelo método de ELISA (CASTRO MARTINS et al., 2005). Pela técnica de RFC, pesquisa anticorpos contra o antígeno extraído da fase leveduriforme do *Histoplasma capsulatum*. Os resultados são quanto mais grave o paciente, tanto mais alto o título da reação.

A ID é a técnica mais utilizada para auxiliar no diagnóstico das micoses sistêmicas e se baseia na pesquisa de anticorpos que são produzidos após reagirem com precipitinas específicas (H e M) (CARVALHÃES, 1999; SIDRINI & ROCHA, 2004).

O RIA é o teste mais sensível para detecção de antígenos circulante de *Histsoplasma capsulatum* , mostrando-se positivo para o antígeno no soro ou na urina em quase todos os pacientes com histoplasmose disseminada. Os níveis de antígeno caem após tratamento bem sucedido, porém aparecem durante a recidiva (ROSSINI & GOULART, 2006).

O teste pelo método ELISA apresenta grande sensibilidade na detecção do antígeno, em materiais como urina, líquido, soro e lavado broncoalveolar (CASTRO MARTINS et al., 2005).

2.2.4 Diagnóstico molecular

O DNA ribossomal tem sido frequentemente usado para diagnóstico da PCR devido possuir várias cópias do gene aumentando assim a sensibilidade da análise. Os genes de cópias simples tem sido desenvolvido, como o que codificam o antígeno M e a proteína *100kDA* (BIALEK et al., 2006).

Os ensaios da PCR convencional são usados para diagnóstico da histoplasmose disseminada, detectando o *Histoplasma capsulatum* nas amostras pulmonares, mas não nas amostras sanguíneas (RICKERTS et al., 2002). A PCR quantitativa (Real Time PCR), é utilizado para o diagnóstico da histoplasmose invasiva devido a alta sensibilidade e especificidade comparado com as outras PCRs e em tempo mais curto do que requer a cultura do organismo (MARTAGON-VILLAMIL et al., 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Amostras

As amostras dos quirópteros foram obtidas em sítios como: áreas urbanas, áreas rurais, cavernas e matas, procedentes das áreas de abrangência do Programa de Controle da Raiva no Estado do Mato Grosso pelo Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT) e do Laboratório de Sanidade Animal (LASA/MT).

Foram utilizados os tecidos pulmonares dos quirópteros como órgão alvo e os mesmos foram trituradas para a extração do DNA, para tal foi utilizado o Kit Invitrogen (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Carisbad, CA 92008USA). Após a extração o DNA, o mesmo foi empregado para a amplificação do fungo *Histoplasma capsulatum* pelo método de nested PCR do gene *100kDA* (BIALEK et al., 2002).

3.2) Amplificação DNA para *Histoplasma capsulatum*

Foi amplificado do fragmento do gen *100kDA* (accession number AJ005963) do *Histoplasma capsulatum* pelo nested PCR utilizando os primers:

O outer primer Hc I (5_-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC AAC-3_) e Hc II(5_-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3_).

O inner primers Hc III (5_-GAG ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3_) and Hc IV (5_-AGG AGA GAA CTG TATCGG TGG CTT G-3_) são complementares na posição 2291 para 2314 e 2500 para 2476, respectivamente. O produto do nested PCR é de 210 bp. (BIALEK et al., 2002).

A análise na primeira PCR foi realizada com 50µl de reação, usando 10 ul DNA, 10 nM Tris-HCL, pH 8.3, 1,0 mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (nested 50uM), 100pmol de cada primer e 1.5 U *Taq* polimerase.

As condições de PCR compreenderam: 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de 65°C e 1 minuto de 72°C, para desnaturação do DNA, anelamento do primer e extensão respectivamente. Na nested-PCR ocorreu uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, e 1 minutos a 72°C; Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel agarose (1,5%) em tampão TAE. Os produtos da amplificação da nested PCR foram purificados pelo Kit Invitrogen (PuriLink™ PCR Purification Kit, Cat no.K3100-01), e sequenciados para confirmação da presença do fungo nos pulmões dos morcegos (Setor de Genética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

4 RESULTADOS

Histoplasma capsulatum (Tabela 1) foi observado em 16,0% (12) das 75 amostras dos pulmões de morcegos provenientes do Estado de Mato Grosso, através da nested PCR do gene 100kDA (Figura 1) e os produtos da PCR foram sequenciados e confirmaram as seqüências para *Histoplasma capsulatum* nas amostras (Figura 2).

Foi evidenciada uma maior ocorrência de *Histoplasma capsulatum* nas espécies *Desmodus rotundus* (25%), *Artibeus lituratus*, *Molossus molossus* (16,7%) e nas espécies: *Artibeus sp.*, *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* 8,3% (Tabela 2).

Foram analisadas 11 amostras pulmonares de morcegos provenientes de cavernas monitoradas pelo INDEA/MT, e dentre estas 3 amostras amplificaram o *Histoplasma capsulatum*. As amostras provenientes da zona urbana de Cuiabá foram 64 e destas 9 amostras positivas para *H. capsulatum*. Do total de 75 amostras estudadas, 26 amostras foram de quirópteros fêmea, 32 de machos, 17 sem classificação. Destes foram amplificados o *H. capsulatum* em 3 fêmeas, 6 machos e em 3 sem classificação.

Tabela 1. *Histoplasma capsulatum* em tecido pulmonar de morcegos detectados pela nested PCR (gene 100kDA), provenientes do Estado de Mato Grosso.

<i>Histoplasma capsulatum</i>	N.	(%)
Positivo	12	(16,0)
Negativo	63	(84,0)
Total	75	(100,0)

Tabela 2. *Histoplasma capsulatum* em espécies de morcegos no Estado de Mato Grosso .

Espécies	<i>Histoplasma</i> Positivo (%)	<i>capsulatum</i> Negativo (%)	Total N (%)
<i>Artibeus lituratus</i>	2 (16,7)	1 (1,6)	3 (4,0)
<i>Artibeus</i> sp.	1 (8,3)		1 (1,3)
<i>Carollia perspicillata</i>		1 (1,6)	1 (1,3)
<i>Desmodus rotundus</i>	3 (25,0)	14 (22,2)	17 (22,7)
<i>Diaemus yoingu</i>		1 (1,6)	1 (1,3)
<i>Diphylla eucadata</i>		1 (1,6)	1 (1,3)
<i>Eumops glaucinus</i>	1 (8,3)	6 (9,5)	7 (9,3)
<i>Glossophaga soricina</i>	1 (8,3)	3 (4,8)	4 (5,3)
<i>Molossus molossus</i>	2 (16,7)	8 (12,7)	10 (13,3)
<i>Molossus rufus</i>		1 (1,6)	1 (1,3)
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	1 (8,3)	21 (33,3)	22 (29,3)
<i>Nyctinomops macrotis</i>	1 (8,3)	1 (1,6)	2 (2,7)
<i>Rhinophylla puimilio</i>		1 (1,6)	1 (1,3)
<i>Sem classificação</i>		4 (6,3)	4 (5,3)
	12 (16,0)	63 (84,0)	75 (100,0)

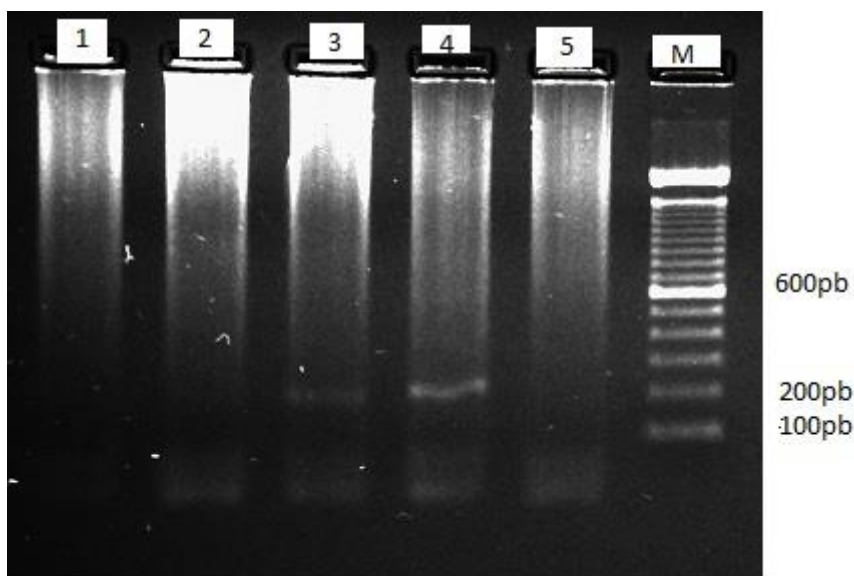


Figura 1 – Produtos da PCR de DNA extraídos de pulmões de morcegos infectados com *Histoplasma capsulatum*. O protocolo da nested PCR foi usado para amplificar um fragmento do gene *100kDA* de acordo com BIALEK et al., 2002. Números 1e 2 foram amostras negativas para *Histoplasma capsulatum*; Números 3 e 4 amostras com DNA extraídos de pulmões positivos para *Histoplasma capsulatum*. Número 5 - Controle negativo (água); M. marcador (*100 bp DNA Ladder-Invitrogen*)

Figura 2- Sequências de nucleotídeos dos produtos da PCR obtidos por amplificação parcial do gene *100kDA* para *Histoplasma capsulatum*.

```

100KDA_B1 : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
100KDA_HI : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
100KDA_I  : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
100KDA_G1 : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
100KDA_C1 : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
100KDA_D1 : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
100KDA_F1 : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
100KDA_E1 : TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT : 60
TCATG9CCTTCACT9GCTGF9GG99GAA9CA9G9ACTTTTAACT9TGAA9AA9TTA9A9TGT

100KDA_B1 : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
100KDA_HI : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
100KDA_I  : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
100KDA_G1 : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
100KDA_C1 : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
100KDA_D1 : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
100KDA_F1 : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
100KDA_E1 : TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC : 120
TC9AA99C999CCTA9GCT99A9TA9CAT9AGCAT99A9TA9AA9A9A9AT9A9G99C9T9G99TTC

100KDA_B1 : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
100KDA_HI : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
100KDA_I  : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
100KDA_G1 : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
100KDA_C1 : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
100KDA_D1 : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
100KDA_F1 : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
100KDA_E1 : TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G : 178
TATTT9GT9GTTTCTA99GAC999CGT9AT9GATTAA9A999A9AGT999999999C9G
    
```

5 DISCUSSÃO

No Estado de Mato Grosso, os estudos visando investigar a diversidade e riqueza de morcegos ainda são escassos (SOUSA; VENERE; FARIA, 2013) e em relação a patologias além da raiva não se tem nenhum caso documentado. Nosso estudo detecta o primeiro levantamento de *Histoplasma capsulatum* em morcegos em regiões do Estado de Mato Grosso tanto em área urbana como silvestre.

No presente estudo os índices de 16,0% de *Histoplasma capsulatum*, foram superiores aos achados de 3,6% por Galvão Dias et al (2011), através da cultura dos órgãos, em morcegos urbanos e foram similares aos achados por eles nas espécies *E. glaucinus* e *N. Macrotis* (GALVÃO-DIAS et al., 2011).

O índice de maior positividade em nossas amostras pode ter ocorrido devido a técnica processada (nested PCR do gene *100kDA*) e o órgão utilizado (pulmão). O nested PCR é um método mais sensível para pesquisa epidemiológica do que a cultura, apesar desta até 2009 ser considerada padrão ouro e ser mais utilizada para diagnosticar a Histoplasmose sistêmica (AIDÉ, 2009). Nosso estudo processou pulmões, sendo estes a porta de entrada do fungo visando detectar colonização e Galvão-Dias et al. (2011) analisaram os fígados e baços evidenciando a infecção (doença).

Estudo prévio feito pela nossa equipe em morcegos com *Histoplasma capsulatum* no Estado do Rio Grande do Sul, evidenciou de 29,1% (VELOSO et al., 2014) e superior os encontramos pela mesma equipe em Mato Grosso. Tal positividade no Estado do Rio Grande do Sul se deve pelas amostras serem provenientes de animais pertencentes à grandes colônias e a maioria de cavernas e que corrobora com o citado

na literatura (TAYLOR et al., 1999), que a maior transmissão de *H. capsulatum* ocorra entre morcegos em grandes colônias gregárias.

Demais estudos sobre *Histoplasma capsulatum* em morcegos em vários países, foram bem documentados em morcegos restritos de cavernas ou de cativeiros por Taylor et al. (1999; 2005) e González et al (2011), tanto na América do Sul como na América Central os quais evidenciaram 80,3% dos morcegos infectados pelo *Histoplasma capsulatum*, através da nested PCR (100kDA) e cultura (TAYLOR et al., 1999; TAYLOR et al., 2005; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2011).

Nossos achados com taxas de 25% se assemelham ao estudo acima referido na espécie *D. Rotundus* o qual detectou positividade de 20,6%. Importante salientar que a espécie *D. rotundus* deste estudo foram capturados em cavernas para o rastreamento da raíva dos herbívoros e a presença do fungo nesta espécie deve estar relacionada ao acúmulo das excretas dos quirópteros nas cavernas que proporcionam a proliferação do fungo e a transmissão através dos aerossóis. A inalação dos conídios pode reinfestar os morcegos e infectar outros animais e humanos que adentram aos locais que abrigam as colônias, como foi devidamente documentado nos trabalhos de Jülg et al (2008) e Taylor et al., (1999) (JÜLG et al., 2008; TAYLOR et al., 1999).

Os dados aqui apresentados evidenciam a presença do *Histoplasma capsulatum* colonizando pulmões de quirópteros do Estado de Mato Grosso, o qual até o presente momento não tinha sido evidenciado e corroborando com transmissão e infecção da Histoplasmose neste Estado.

6 CONCLUSÕES

A positividade de *Histoplasma capsulatum* em tecidos pulmonares de morcegos no Estado de Mato Grosso foi de 16,0%. Foi evidenciada uma maior ocorrência de *H. capsulatum* nas espécies *Desmodus rotundus* (25%), *Artibeus lituratus*, *Molossus molossus* (16,7%) e nas espécies: *Artibeus* sp., *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* 8,3%.

Os dados apresentados evidenciam a presença do *Histoplasma capsulatum* no Estado de Mato Grosso, o qual até o presente momento não tinha sido evidenciado e corroborando com transmissão e infecção da Histoplasmose neste Estado.

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N. & SZYFRES, B. Zoonoses and Communicable Diseases common to man and animals. Third Edition. Scientific and Technical Publication No. 580

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the WORLD HEALTH ORGANIZATION 525, Twenty-third Street, N.W. Washington, D.C. 20037 U.S.A. 2003.

AIDÉ, M.A. Histoplasmose. In: TARANTINO, A.B, editor. **Doenças Pulmonares**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p. 426-34

AIDÉ, M.A. Histoplasmose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n.11, p.1145-1151, 2009.

AKBAR H.; et al. Characterizing *Pneumocystis* in the lungs of bats: Understanding *Pneumocystis* evolution and the spread of *Pneumocystis* organisms in mammal populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8122-8136, 2012.

BIALEK, R.; et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1644-1647, 2006.

BRILHANTE, R.S.N.; et al. Feline Histoplasmosis in Brazil: Clinical and Laboratory aspects and a comparative approach of published reports. **Mycopathologia**, v.173, n. 2-3, p.193-197, 2012.

BROMEL C.; SYKES, J. Histoplasmosis in dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice Journal** v. 20, n. 4, p. 227-232, 2005.

BRYLES, M.C.; COZAD, G.C.; ROBINSON, A. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in Oklahoma. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n.5, p. 791-795, 1969.

BUITRAGO, M.J.; et al. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, n. 10, p. 665-668, 2006.

CANO, M.V.C.; HAJJEH, R.A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. **Seminars in Respiratory Infectious**, v. 16, n.2, jun, p. 109-118, 2001.

CANTEROS, C.E.; et al. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 37, p. 46-56, 2005.

CARVALHÃES, J. *Micologia Médica*. Control- Lab. Rio de Janeiro: 1999.

CASTRO MARTINS, R.; et al. Histoplasmosis pulmonar em clínica privada no Rio de Janeiro, **Pulmão RJ**, v. 14, n.3, jul-ago-set, p.197-201, 2005.

CAVALLINI SANCHES E. M.; et al. *Pneumocystis* sp. in bats evaluated by qPCR. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 23, n. 1, p. 47-52, 2013.

CAVALLINI SANCHES E.M.; et al. 2012. Real-time PCR and Nested-PCR assays for detection of *Pneumocystis* spp. in lung tissues of bats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n.4, p. 1070, 2012.

CHÁVEZ-TAPIA, C.B.; et al. I. El murciélogo como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélogos infectados. **Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias do Mexico**. v. 11, p. 187-191, 1998.

DAHER, E.F.; et al. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis in HIV patients from Brazil. **Tropical Medicine International Health**, v. 12, n 9, p. 1108-1115, 2007.

DE MONBREUN, W.A. Cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Tropical Medicine**, v. 14, n. 2, p. 93-125, 1934.

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

- EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W. E. The interplay between *Histoplasma capsulatum* and its host cells. **Clinical Infectious Diseases**, v. 1, p. 265-283, 1994.
- EMMONS, C.W. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **Public Health Rep.**, v. 64, n. 28, p. 892-896, 1949.
- EMMONS, C.W. Association of bats with histoplasmosis. **Public Health Reports**, v.73, n. 7, p. 590-595, 1958.
- ESPINOSA-AVILÉS, D., TAYLOR, M.L., REYES-MONTES, M.D.R., PÉREZ-TORREZ, A. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*UNCIA UNCIA*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.39, n.3, p. 450-454, 2008.
- FERNANDES, C.G.N., et al. Canine histoplasmosis in the urban area of Cuiabá, Mato Grosso. Case report. Histoplasmosse em cão na área urbana de Cuiabá, Mato Grosso. Relato de caso. **Clínica Veterinária**, n.46, set/out, ano VIII, p. 44-46, 2003.
- FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmosse. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.2, mar-abri, p. 192-198, 2009.
- GALVÃO DIAS, M.A.; et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 10, p. 1642-1644, 2011.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A.; et al. *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis* spp. Co-infection in wild bats from Argentina, French Guyana, and Mexico. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 23, p.1-8, 2014.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A.E.; et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in the lung of a free-rearing common *Noctule* (*Nyctalus noctula*) from France using the *Hcp 100* gene. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n.1, p. 15-20, 2013.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A.E.; et al. An *Hcp 100* gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 11, p. 1955-1963, 2012.

GOODWIN, R.A.; DES PRES, E.M. Histoplasmosis. **American Review Respiratory Disease**, v.117, n. 5, p. 929-956, 1978.

GROSE, E.; TAMSITT, J.E. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus literatus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, n. 2, p. 124-125, 1965.

GUIMARÃES, A.J.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Diagnosis of Histoplasmosis. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 1-13, 2006.

JUBB, K.V.E.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*, 4th ed. Academic Press, San Diego. California.1993.

JÜLG, B., et al. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. **Journal of Travel Medicine**, v. 15, n.2, p. 133-136, 2008.

KASUGA, T.; et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, v.12, n. 12, p. 3383-3401, 2003.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n.1, p. 115-132, 2007.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Histoplasmosis. **Medical Micrology**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p. 464-513.

LACAZ, C.S. Histoplasmosse clássica. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. (9 ed.) São Paulo: Sarvier; 2002. p. 594-614.

LOULERGUE, P., et al. Literature review and case histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*. Infections in HIV-infected patients. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n.11, p. 1647-1652, 2007.

MAcGAVIN, M.C.; ZACHARY, J.F. (eds.). 2007. *Pathology Basis of Veterinary Disease*. Mosby. St. Louis, Missouri.

MAKIMURA, K.; MURAYAMA, S. Y.; YAMAGUCHI, H. Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 358–364, 1994.

MARTAGON-VILLAMIL, J.; et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1295-1298, 2003.

McMURRAY, D.N.; RUSSEL, L.H. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 31, n. 3, p. 527-531, 1982.

MOK, W.I.; LUIZÃO, R.C.C.; SILVA, M.S.B. Isolation of Fungi from bats of the Amazon Basin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 57-575, 1982.

NAIFF, R.D.; et al. New records de *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n.4, p. 273-277, 1996.

OLIVEIRA, F.M.; UNIS, G.; SEVERO, L.C. Microepidemia de histoplasmose em Blumenau, Santa Catarina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n.4, p. 375-378, 2006.

PANACKAL, A.A.; HAJJEH, R.A.; CETRON, M.S.; WARNOCK, D.W. Fungal infections among returning travelers. **Clinical Infectious Disease**, v. 35, n. 9, p. 1088-1095, 2002.

PAULA, A.V.; AIDE, M.A. As microendemias de histoplasmoses do Estado do Rio Janeiro. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 49, n.1, p.18-26, 1985.

REZENDE, C.C.; DUARTE, D.C.; FILIÚ, W.F.O. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* na gruta lago Azul, Bonito - MS. In: *Congresso de Espeleologia*, 27, 2003. Januária. **Anais...** Januária-MG: Sociedade Brasileira de Espeologia, 2003. CD.2003.

RICKERTS, V.; et al. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, p. 821-823, 2002.

RODRIGUES, C.C. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratânia (SP)171p. [Dissertação]. Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, Botucatu, SP. 2004.

ROSSINI, R.F.; GOULART, L.S. Histoplasmoze clássica: Revisão. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v.38, n. 4, p. 275-279, 2006.

SANCHES, E.M.C.; et al. Detection of *Pneumocystis* spp. in lungs of bats from Brazil by PCR amplification. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 469-473, 2009.

SHAUGHNESSY, E.O.; SHEA, Y.M.; WITEBSKY, F.G. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. **Infectious Disease Clinical of North America**, v. 17, n.1, p. 135-158, 2003.

SHERDING, R.G. Systemic Mycoses. *Saunders Manual of Small Animal Practice*, Columbus: W. Saunders, p. 133-140, 1999.

SIDRINI, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2004.

SOARES, A.D. 2012. Infecção por *Histoplasma capsulatum* em profissionais e estudantes de Instituições de Saúde de Fortaleza. [Dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.102f., 2012.

TAYLOR, M. L.; et al. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 451-458, 2005.

TAYLOR, M.L.; CHÁVEZ-TAPIA, C.B.; REYES-MONTES, M.R. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, n. 3, p. 207-212, 2000.

TAYLOR, M.L.; et al. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. In: *Benedik M. ed, Research Advances in Microbiology*. Kerala: Global Research Network, 2000, p.29-35.

TAYLOR, M.L.; et al.. Environmental conditions favoring bat infections with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 61, n. 6, p. 914-919, 1999.

TAYLOR, M.L.; GRANADOS, J.; TORIELLO, C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. **Mycoses**, v. 39, p. 375-379, 1996.

TENCATE L.N.; et al. Study of gastrointestinal fungal flora of bats (Mammalia, Chiroptera) of the northwest region of São Paulo State; zoonotic potential. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 49, n. 2, p. 146-152, 2012.

TEWAI, R.; WHEAT, L.J.; AJELLO, L. Agents of histoplasmosis En: Ajello L, Hay R.J. (Eds), *Medical Mycology, Topless & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections* 9th ed. Arnold, London, p. 373-393, 1998.

UNIS, G.; ROESCH, E.W.; SEVERO, L.C. Histoplasmosse pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**.v. 31, n.1, p. 52-59, 2004

VELOSO, S.S.C.; et al. *Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* detectados em pulmões de morcegos das regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1251, 2014.

VICENTINI, A.P.; et al. Histoplasmose: um risco ocupacional entre pesquisadores que realizam trabalho de campo? **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 747-52, 2012.

WANKE B, LAZERA MS, CAPONE D. Histoplasmose. In: AIDÉ, M.A; CARDOSO ,A.P.; RUFINO, R.; DAVID, F.; CARVALHO, S.R.; LUCAS, V.S.; ZAMBONI, M.M.editors. **Pneumologia: aspectos práticos e atuais**. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 152-57.

WHEAT, L.J. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 274-282, 2006.

WHEAT, L.J.; KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinical of North America**, v. 17, n.1, mar, p. 1-19, 2003.

WHEAT, L.J.; et al. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis and management. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 25, n.2, abr, p. 129-44, 2004.

WHEAT, L.J.; et al. *Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory.* **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 1, p. 29-37, 2002.

WHEAT, L.J. Histoplasmosose. In: SAROSI, G.A.; DAVIES, S.F. editors. **Doenças Fúngicas do Pulmão.** Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 31-46.

WHEAT, L.J.; KOHLER, R.B.; TEWARI, R.P. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 2, p. 83-88, 1986.

WOLF, A.M. Histoplasmosis. In: *Greene. Infectious diseases of the dog and cat.* 2 ed, Philadelphia: W.B. Saunders, p.378-383, 1998.

ZAMORA JR, C. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from tissues of bats captured in the Aguas Buenas caves, Aguas Buenas, Puerto Rico. **Mycopathologia**, v. 60, n. 3, p. 167-169, 1977.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M; TAVARES, P.M.S.; MUNIZ, M.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 443-449, 2005.

ZEIDBERG, L. D.; et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **American Journal of Public Health**, v. 42, p. 930-935, 1952.

ANEXOS



Acta Scientiarum Veterinariae, 2014, 42: 1252.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1252

ISSN 1679-0216

***Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* detectados em pulmões de morcegos das regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil**

Pneumocystis spp. and *Histoplasma capsulatum* in Bats Lungs in Southern and Midwestern Regions of Brazil

Silvana Salomão Cury Veloso¹, Laerte Ferreira², Susi Missel Pacheco³,
Roberto Renato Pinheiro da Silva⁴, Eunice de Conceição Souza⁵, Gustavo Machado⁶,
Gustavo Wissmann⁷, Andréa Spanemberg⁸ & Edna Maria Cavallini Sanches⁹

ABSTRACT

Background: *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis* spp. may cause a host infection through the respiratory airway, mainly affecting the pulmonary tissue. These fungal pathogens affect a wide range of mammalian species, including humans and bats. The co-infection of bats with both organisms above has never been studied in Brazil. The aim of the present research was to detect the presence of the *H. capsulatum* and *Pneumocystis* spp. in lung samples of bat species from two states of Brazil. For this purpose, a highly sensitive nested PCR was used with specific molecular markers for each pathogen.

Materials, Methods & Results: Two hundred and forty-nine bats were captured between 2007 and 2009 in caves, forests, and urban areas of Mato Grosso (MT) and Rio Grande do Sul (RS), located respectively in the Mid-Western and Southern regions. The bats were captured following the guidelines of the rabies control manual for herbivores, standardized by the Ministry of the Agriculture. Detection of *Pneumocystis* spp. DNA was based upon nested PCR, which amplified a portion of the mitochondrial small subunit (mtSSU) of the rRNA gene, whereas the *H. capsulatum* DNA was amplified employing the Hep 100 locus. Amplification products were sequenced to confirm fungal presence in bat lungs. The amplifications results for *H. capsulatum* and *Pneumocystis* spp. were positive in 63 [25.3%, IC95% (20.1%-31.25%)] and 95 [(38.2%, IC95% (32.1%-44.52%)] samples, respectively. The greatest occurrence of *Histoplasma capsulatum* was observed in *Desmodus rotundus* (20.6%), *Tadarida brasiliensis* (20.6%), *Histiotus velatus* (19.0%) and *Molossus molossus* (11.1%), with the detection in the other species being lower than 7.9%, among the 24 studied bat species. For *Pneumocystis* spp., the detection was higher in *Tadarida brasiliensis* (23.1%), *Desmodus rotundus* (18%), *Histiotus velatus* (14.7%), and *Molossus molossus* (11.6%), being lower than 5.3% in the other species. A co-infection with both *Pneumocystis* spp. and *Histoplasma capsulatum* was observed in 14.4% of the samples.

Discussion: Results from this study revealed a high positivity in pulmonary tissue for both studied fungi. Comparing with the current and recent literature, a higher occurrence was observed for *Pneumocystis* spp., being lower for *H. capsulatum* as well as for the co-infection in the lungs of bats from both Brazilian regions. The majority of the analyzed samples were from urban area, where the occurrence of *H. capsulatum* was higher than that observed by the Centro de Zoonose do Estado de São Paulo, which piously described *H. capsulatum* in *N. macrotis*, *E. glaucinus* and *M. Rufus* species. In this study, 1.6% of the samples in those same species were positive for *H. Capsulatum*. Due the larger sample size from urban areas, the species *Tadarida brasiliensis* was the most studied for both fungi. To note, in one colony from the latter species, composed of hundreds of bats, a large amount of bat guano was observed, which favors the dispersion of fungal propaguls of *H. capsulatum* and a subsequent high fungal colonization detected in those animals. However, it is not possible to infer that the bats were developing the disease, since others organs like liver, spleen and intestine were not analyzed. Results from this study corroborate with the literature that report a high transmission of *H. capsulatum* among bats belonging to big colonies, by demonstrating a high occurrence of *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis* spp., individually or in co-infection, in bats from two geographically distant Brazilian states (RS and MT).

Keywords: *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis* spp., bats, lungs, colonization, co-infection.

Descritores: *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis* spp., morcego, quiróptero, pulmão, colonização, coinfeção.

Received: 30 July 2014

Accepted: 9 December 2014

Published: 30 December 2014

¹Hospital Universitário Julio Müller, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil. ²Sector de Micologia Veterinária, Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ³Instituto Saaver, Porto Alegre, RS. ⁴Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT), Cuiabá, MT. ⁵Laboratório de Apoio à Saúde Animal (L.A.S.A.), INDEA/MT, Cuiabá, MT. ⁶Laboratório de Epidemiologia Veterinária (EPI/LAB), FaVet, UFRGS, Porto Alegre, RS. ⁷Unidade de Doenças Infecciosas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HICPA), UFRGS, Porto Alegre, RS. CORRESPONDENCE: E.M. Cavallini Sanches [cavallini.sanches@yahoo.com.br - FAX: +55 (51) 3308-7395]. ⁸Sector de Micologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Av. Bento Gonçalves n. 9090, Bairro Agronomia. CEP 91540-600 Porto Alegre, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

A Ordem Chiroptera é o segundo grupo de mamíferos com 1.120 espécies, das quais 167 (e 64 gêneros) no Brasil [23]. Os morcegos considerados importantes vetores de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* [12,17,28], *Pneumocystis* spp. [1,4,5,11,25] e *Histoplasma capsulatum* [9,10,11], contribuem para manutenção desses patógenos no ambiente e, consequentemente, sua transmissão [27].

O *H. capsulatum* é encontrado preferencialmente em áreas geográficas de clima tropical e subtropical, além de alguns países da Europa [29].

A histoplasmose é uma micose frequentemente diagnosticada em humanos no Brasil e responsável por 4,3% mortalidade causada por micoses sistêmicas em uma década (1996-2006) no Brasil, taxa que aumenta para 10,1 quando associada com a AIDS [21].

Em animais, as características da transmissão e infecção por *H. capsulatum* são similares ao que acontece em humanos. Particularmente em morcegos, a maioria ocorre em fêmeas, as quais permanecem maior tempo nas colônias com sua prole [8,13].

O *Pneumocystis* spp. é um fungo oportunista, principalmente transmitido por via aérea e responsável por severa pneumonia em grande número de mamíferos [1,22]. Nos quirópteros tem sido evidenciado sua presença em diversos países como México, França, Argentina e Brasil [1,4,5,9].

A coinfeção do *Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* foi recentemente avaliada em algumas espécies de quirópteros da Argentina, Guiana Francesa e México [9], possibilitando assim um ponto de partida para a investigação da relação entre eles e sua distribuição na natureza.

O objetivo do trabalho foi detectar a ocorrência do *Histoplasma capsulatum* e *Pneumocystis* spp. e, também, da possível coinfeção dos mesmos em algumas espécies de morcegos obtidas através do programa de controle do vírus da raiva desenvolvido em duas regiões do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais estudados

Os morcegos (n = 249) foram capturados pelo Programa de Controle da Raiva em dois Estados brasileiros: Rio Grande do Sul (RS) e Mato Grosso (MT) entre 2007 e 2009 em cavernas, florestas e áreas

urbanas. As amostras do Estado de Mato Grosso foram procedentes do Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA/MT) e do Laboratório de Sanidade Animal (LASA), enquanto as amostras do Estado do Rio Grande do Sul foram provenientes do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (IPVDF/RS) e Instituto Sauer (RS).

Os morcegos foram capturados segundo as normas padronizadas pelo Ministério da Agricultura preconizada no manual do controle da raiva para herbívoros [6] e classificados pelo Instituto Sauer (RS) [20] e transportados para o Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária/UFRGS.

Extração do DNA dos pulmões dos morcegos

As amostras dos tecidos pulmonares (250 mg) foram trituradas e o DNA foi extraído utilizando o Kit Invitrogen (PureLink™ Genomic DNA Kit, Cat. no. K1820-01)¹.

Amplificação do DNA para *Histoplasma capsulatum*

O DNA foi amplificado do fragmento do gen 100-KDA (accession number AJ005963) através da nested PCR utilizando os primers: outer primer Hc I (5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC AAC-3') e Hc II (5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3'). O inner primers Hc III (5'-GAG ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3') e Hc IV (5'-AGG AGA GAA CTG TATCGG TGG CTT G-3') são complementares na posição 2291 a 2314 e 2500 a 2476 respectivamente. O produto da nested PCR é de 210 bp [2].

A análise da primeira PCR foi realizada com 50 µL de reação, usando 10 µL DNA, 10 mM Tris-HCL, pH 8.3, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (100 µM), 20 pmol de cada primer e 1,5 U de *Taq* polymerase. A mistura (Mix) da nested PCR foi igual a primeira PCR, exceto com 1 µL do produto da primeira PCR.

As condições da PCR compreenderam: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 30 s, 72°C for 1 min; e 72°C for 5 min. Para a nested PCR: 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 72°C por 1 min, e 72°C for 5 min [2].

Amplificação do DNA para *Pneumocystis* spp.

O DNA foi amplificado pela nested PCR, utilizando os seguintes primers: pAZ102 10F (5'-GGG-AAT-TCT-AGA-CGG-TCACAG-AGA-TCA-G-3') e pAZ102 10R (5'-GGGAAT-TCC-AAC-GAT-TAC-TAG-CAA-TCC-C-3') na primeira PCR e pAZ102

S.C.S. Veloso, L. Ferreira, S.M. Pacheco, et al. 2014. *Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* detectados em pulmões de morcegos das regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil. *Acta Scientiarum Veterinariae*, 42: 1252.

13-RI (5'-GGG-AAT-TCG-AAGCAT-GTT-GTT-TAA-TTC-G-3') epAZ10214-RI (5'-GGG-AAT-TCT-TCA-AAG-AAT-CGA-GTTTCA-3') na nested PCR [4,5,25].

Para os primers 10F e 10R, as condições de PCR compreenderam: 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min 30 s, 55°C por 1 min e 30 s, e 72°C por 2 min. Na nested PCR (primers 13R e 14R) as condições foram: 94°C por 5 min, seguido por 10 ciclos de 94°C por 1 min 30 s, 52°C por 1 min 30 s, e 72°C por 2 min, seguidos por mais 30 ciclos de 94°C por 1 min 30 s, 63°C por 1 min 30 s e 72°C por 2 min.

Os produtos da amplificação da nested PCR de *Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* foram purificados pelo Kit Invitrogen (PuriLink™ PCR Purification Kit, Cat no.K3100-01), e sequenciados para confirmação da presença do fungo nos pulmões dos morcegos.

Análise estatística

Os resultados dos testes diagnósticos foram analisados primeiramente através de estatística descritiva e posteriormente, para análise da associação entre a coinfeção por *Histoplasma capsulatum* e *Pneumocystis* spp. foi utilizado o teste de Qui-quadrado. O nível de significância considerado na análise estatística foi de 5%.

Tabela 1. *Histoplasma capsulatum* e *Pneumocystis* spp. em tecidos pulmonares obtidos de diversas espécies de morcegos capturados entre 2007 e 2009, nos estados do Rio Grande do Sul (RS) e Mato Grosso (MT), Brasil.

Espécie	<i>Histoplasma capsulatum</i>		<i>Pneumocystis</i> spp.		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
<i>Artibeus fimbriatus</i>	5(7.9%)	2(1.1%)	5(5.3%)	2(1.3%)	7
<i>Artibeus lituratus</i>	2(3.2%)	1(0.5%)		3(1.9%)	3
<i>Artibeus</i> sp.	1(1.6%)			1(0.6%)	1
<i>Carollia perspicillata</i>		2(1.1%)	1(1.0%)	1(0.6%)	2
<i>Desmodus rotundus</i>	13(20.6%)	37(19.9%)	18(18.9%)	32(20.6%)	50
<i>Diademus yoingii</i>		1(0.5%)		1(0.6%)	1
<i>Diphylla eucadota</i>		1(0.5%)		1(0.6%)	1
<i>Eumops glaucinus</i>	1(1.6%)	6(3.2%)	1(1.0%)	6(3.9%)	7
<i>Eptesicus fuscus</i>		1(0.5%)	1(1.0%)		1
<i>Glossophaga soricina</i>	1(1.6%)	8(4.3%)	3(3.1%)	6(3.9%)	9
<i>Histiotus velatus</i>	12(19.0%)	24(12.9%)	14(14.7%)	22(14.2%)	36
<i>Lasiurus blaissevilli</i>	1(1.6%)	4(2.1%)	3(3.1%)	2(1.3%)	5
<i>Lasiurus cinereus</i>		1(0.5%)	1(1.0%)		1
<i>Molossus correntium</i>		1(0.5%)	1(1.0%)		1
<i>Molossus molossus</i>	7(11.1%)	23(12.4%)	11(11.6%)	19(12.3%)	30
<i>Molossus rufus</i>	2(3.2%)	3(1.6%)	3(3.1%)	2(1.3%)	5
<i>Myotis levis</i>	1(1.6%)	5(2.7%)	2(2.1%)	4(2.6%)	6
<i>Myotis nigricans</i>	1(1.6%)	1(0.5%)	1(1.0%)	1(0.6%)	2
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	1(1.6%)	21(11.3%)	5(5.3%)	17(10.0%)	22
<i>Nyctinomops macrotis</i>	1(1.6%)	1(0.5%)	1(1.0%)	1(0.6%)	2
<i>Promops nasutus</i>	1(1.6%)	5(2.7%)	1(1.0%)	5(3.2%)	6
<i>Rhinophylla palmito</i>		1(0.5%)	1(1.0%)		1
<i>Tadarida brasiliensis</i>	13(20.6%)	32(17.2%)	22(23.1%)	23(14.9%)	45
<i>Sturmira litam</i>		1(0.5%)		1(0.6%)	1
Sem classificação		4(2.1%)		4(2.6%)	4
	63 (25.3%)	186 (74.7%)	95 (38.2%)	155 (61.8%)	249

S.C.S. Veloso, L. Ferreira, S.M. Pacheco, et al. 2014. *Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* detectados em pulmões de morcegos das regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil. *Acta Scientiarum Veterinariae*, 42: 1252.

RESULTADOS

Histoplasma capsulatum foi observado em 25,3% (63) e *Pneumocystis* spp. em 38,2% (95) das 249 amostras dos pulmões de morcegos provenientes do MT e RS.

Foi evidenciada uma maior ocorrência de *Histoplasma capsulatum* nas espécies *Desmodus rotundus*, *Tadarida brasiliensis* (20,6%), *Histiotus velatus* (19,0%) e *Molossus molossus* (11,1%), enquanto que nas demais espécies a ocorrência foi inferior a 7,9% (Tabela 1).

Histoplasma capsulatum estava presente em 15,9% dos morcegos (espécies *Desmodus rotundus* e *Histiotus velatus*) procedentes de Caçapava do Sul (RS). Já em relação às demais localidades estudadas (RS e MT), o fungo foi detectado em apenas 1,6% a 6,3% dentre um total de 24 espécies de morcegos.

Pneumocystis spp., foi mais detectado em *Tadarida brasiliensis* (23,1%), *Desmodus rotundus* (18,9%), *Histiotus velatus* (14,7%) e *Molossus molossus* (11,6%), enquanto que nas demais espécies, a porcentagem foi inferior a 5,3%. A colonização simultânea por *Pneumocystis* spp. e *H. capsulatum* foi observada em 14,4% dos morcegos capturados e considerada como estatisticamente significativa ($P < 0.001$) [Tabela 2].

As ocorrências de *H. capsulatum* e *Pneumocystis* spp., por estado, foram respectivamente da ordem de 29,1% e 48,0% no Rio Grande do Sul e de 16,2% e 14,9% no Mato Grosso (Tabela 3).

Os produtos de amplificação dos dois fungos foram sequenciados e houve concordância com as sequências comparadas.

Tabela 2. Co-infecção de *Histoplasma capsulatum* e *Pneumocystis* spp. em tecidos pulmonares obtidos de morcegos capturados entre 2007 e 2009, nos estados do Rio Grande do Sul (RS) e Mato Grosso (MT), Brasil.

<i>Pneumocystis</i> spp.	<i>Histoplasma capsulatum</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	36 (14.4%)	59(31.7%)	95(38.2%)
Negativo	27(10.8%)	127(51.0%)	154(61.8%)
Total	63(25.3%)	186(74.7%)	249

χ^2 : 11.83; ($P < 0.001$); Odds Ratio: 2.87 [1.59-5.11]

Tabela 3. Presença de *Histoplasma capsulatum* e *Pneumocystis* spp. em tecidos pulmonares obtidos de morcegos capturados entre 2007 e 2009, nos estados do Rio Grande do Sul (RS) e Mato Grosso (MT), Brasil.

Estado	<i>H. capsulatum</i>		<i>Pneumocystis</i> spp.		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
RS	51(29.1%)	124(70.8%)	84 (48%)	91(52%)	175(70.3%)
MT	12(16.2%)	62(83.8%)	11(14.9%)	63(85.1%)	74(29.7%)
Total	63(25.3%)	186(74.7%)	95(38.1%)	154(61.8%)	249(100%)

DISCUSSÃO

No presente estudo foi detectada a presença 25,3% de *Histoplasma capsulatum* em 249 quirópteros, bem menor que a porcentagem observada por González et al. [9] que encontraram 80,3% em 122 quirópteros provenientes de três países da América do Sul e Central. É muito provável que a menor positividade do *Histoplasma capsulatum* em nosso estudo seja devida a maior quantidade de amostras capturadas em áreas urbanas, diferentemente dos dados referenciados acima que foram exclusivamente de animais capturados em cavernas, onde a concentração de colônias é superior às de áreas urbanas.

Pesquisa similar realizada pelo Centro de Zoonose do Estado de São Paulo com uma expressiva amostragem (2427) detectou apenas 87 (3,6%) morcegos positivos. O mesmo estudo também descreveu casos pioneiros de *H. capsulatum* nas espécies *N. macrotis*, *E. glaucinus* e *M. rufus* [8]. Nas mesmas espécies, o presente trabalho detectou o fungo em 1,6% das amostras, evidenciando assim, a presença do agente e sua disseminação entre morcegos de outras regiões do Brasil.

A espécie *Tadarida brasiliensis* por ser migratória, pode estar tanto em cavernas como em zonas urbanas, forma colônias que pode atingir milhares de

indivíduos e maior produção de excretas. Este acúmulo de excretas proporciona elevada exposição de propágulos *Histoplasma capsulatum*, aumentando assim o risco de infecção fúngica em seus abrigos e dispersão para outros ambientes [27], como foi relatado no México e Argentina com positividade de 81,6% em morcegos de cavernas [11].

No presente estudo, a espécie *Tadarida brasiliensis* foi a mais colonizada pelos dois fungos nas áreas urbanas. Notadamente em uma colônia de *T. brasiliensis*, composta por centenas de morcegos, foi observada uma grande formação de excretas, fator que favoreceu a dispersão dos propágulos fúngicos de *H. capsulatum* e consequente alta colonização detectada nos indivíduos desse nicho, proveniente de uma residência na cidade de Caçapava do Sul (RS). Entretanto, não é possível inferir que os mesmos estavam desenvolvendo a doença pois outros órgãos, como fígado, baço e intestino, não foram analisados. Estes resultados diferem daqueles descritos por Taylor et al. [27], que detectaram o desenvolvimento da histoplasmose em 18,2% dos 208 quirópteros analisados após cultivo do fungo de amostras de fígado, baço e pulmão.

Histoplasma capsulatum foi detectado em 20,6% da espécie *Desmodus rotundus* provenientes das duas regiões brasileiras, enquanto que na Argentina, Guiana Francesa e México não foi evidenciada a presença do mesmo [9,11].

Em relação ao *Pneumocystis* spp., os resultados encontrados na presente pesquisa (38,2%) foram similares aos encontrados por González-González et al. (41,8%) [9]. Estes autores também descreveram coabitação de *Histoplasma capsulatum* e *Pneumocystis* spp. em 35,2% das amostras, enquanto que o presente estudo encontrou apenas 14,4% casos de coinfeção.

Pesquisadores relatam que as condições físicas dos abrigos (aglomeração) dos morcegos, comportamentais (migração) podem representar um fator de risco tanto para humanos como para morcegos [14,27]. Especificamente em relação à espécie *Tadarida brasiliensis*, alguns fatores ambientais já foram analisados: em localidades situadas abaixo de 800 m de altitude, o total de morcegos portadores de DNA de *Pneumocystis* encontrado foi 5 vezes maior em comparação com morcegos provenientes de localidades situadas acima de 800 m. Os mesmo autores concluíram que o clima (calor e umidade) parece não influenciar a taxa de indivíduos portadores de DNA de *Pneumocystis* [11].

As localidades dos dois estados brasileiros onde foram capturadas as amostras, estão situadas a uma altitude inferior a 300 m, e os resultados obtidos são similares ao estado supra citado.

É importante salientar que na amostragem obtida de morcegos capturados no Estado de Mato Grosso, os índices de positividade foram menores em comparação os do RS, tanto de *Histoplasma capsulatum* como de *Pneumocystis* spp., devido as amostras terem sido aleatórias, animais capturados separadamente ou por busca passiva e, consequentemente, eles não pertenciam a mesma colônia, corroborando com o citado da literatura [27], que a maior transmissão de *H. capsulatum* ocorre entre morcegos em grandes colônias gregárias.

Os dados aqui apresentados evidenciam a presença destes dois patógenos e a coabitação dos mesmos em quirópteros no Brasil situação que, até o momento, não tinha sido comprovada no país. Além disso, os resultados encontrados corroboram dados previamente obtidos de morcegos no continente europeu (França) e em alguns países das Américas do Norte e do Sul, os quais destacam o papel deste hospedeiro como reservatório e dispersador destes fungos [7,9,10].

CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados mostram uma alta ocorrência tanto de *H. capsulatum* quanto de *Pneumocystis* spp. A comprovação de coabitação desses fungos em morcegos provenientes de dois estados brasileiros distantes (RS e MT), destaca a importância dos mesmos na cadeia epidemiológica e alerta para o alto risco de infecção entre os morcegos e dispersão de propágulos fúngicos no ambiente.

MANUFACTURER

¹Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

Acknowledgements. Este trabalho teve o suporte do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (470206/2007/CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (002.036/2007/FAPEMAT) e da Red Iberoamericana sobre Pneumocystosis, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), Spain.

Ethical approval. O presente estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética do Instituto de Defesa Agropecuária do Estado do Mato Grosso (INDEA/MT) e Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF/RS).

Declaration of interest. Os autores relatam não existir conflito de interesse e são responsáveis pelos dados e informações neste artigo.

REFERENCES

- 1 Akbar H, Pinçon C, Aliouat-Denis C.M., Derouiche S., Taylor M.L., Pottier M., Carreto-Binaghi L. H., González-González A.E., Courpon A., Barriol V., Guillot J., Chabé M., Suarez-Alvarez R., Aliouat E.M., Dei-Cas E. & Demanche C. 2012. Characterizing *Pneumocystis* in the lungs of bats: Understanding *Pneumocystis* evolution and the spread of *Pneumocystis* organisms in mammal populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(22): 8122-8136.
- 2 Bialek R., Feucht A., Aepinus C., Just-Nübling G., Robertson V.J., Knobloch J., & Hohle R. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(5): 1644-1647.
- 3 Cano M. & Hajjeh R.A. 2001. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Seminars in Respiratory Infection*. 16(2): 109-118.
- 4 Cavallini Sanches E.M., Ferreira L., Andrade C.O., Pacheco S.M., Almeida L.L., Spanemberg A. & Wissmann G. 2013. *Pneumocystis* sp. in bats evaluated by qPCR. *Journal de Mycologie Médicale*. 23(1): 47-52.
- 5 Cavallini Sanches E.M., Ferreira L., Andrade C.O., Pacheco S.M., Santurio J.M., Almeida L.L., Spanemberg A. & Wissmann G. 2012. Real-time PCR and Nested-PCR assays for detection of *Pneumocystis* sp. in lung tissues of bats. *Acta Scientiarum Veterinariae*. 40(4): 1070.
- 6 Controle para a raiva de Herbívoros. 2009. www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/programas/area_animal/CRHE/PNCRH/MT_Para_controle_da_raivaherbivoros_o.PDF.2009.
- 7 Derouiche S., Deville M., Taylor M.L., Akbar H., Guillot J., Carreto-Binaghi L.E., Pottier M., Aliouat E.M., Aliouat-Denis C.M., Dei-Cas E. & Demanche C. 2009. *Pneumocystis* diversity as a phylogeographic tool. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104(1): 112-117.
- 8 Galvão Dias M.A., Zancopé Oliveira R.M., Giudice M.C., Montenegro Netto H., Jordão L.R., Grigorio L.M., Rosa A.R., Amorim J., Nosanchuk J.D., Travassos L.R., Taborda C.P. 2011. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. *Epidemiology and Infection*. 139(10): 1642-1644.
- 9 González-González A.E., Aliouat-Denis C.M., Ramírez-Bárceñas J.A., Demanche C., Pottier M., Carreto-Binaghi L.E., Akbar H., Derouiche S., Chabé M., Aliouat E.M., Dei-Cas E. & Taylor M.L. 2014. *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis* spp. co-infection in wild bats from Argentina, French Guyana, and Mexico. *BMC Microbiology*. 14: 23(1-8).
- 10 González-González A.E., Ramírez J.A., Aliouat-Denis C.M., Demanche C., Aliouat E.M., Dei-Cas E., Chabé M. & Taylor M.L. 2013. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in the lung of a free-ranging common noctule (*Nyctale noctula*) from France using the Hcp 100 gene. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 44(1): 15-20.
- 11 González-González A.E., Aliouat-Denis C.M., Carreto-Binaghi L.H., Ramírez J.A., Rodríguez-Arellanes G., Demanche C., Chabé M., Aliouat E.M., Dei-Cas E. & Taylor M.L. 2012. Na Hcp 100 gene fragmente reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. *Epidemiology and Infection*. 140(11): 1955-1963.
- 12 Grose E. & Tamsitt J.E. 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia*. 4(2): 124-125.
- 13 Hoff G.L. & Bigler W.J. 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *Journal of Wildlife Diseases*. 17(2): 191-196.
- 14 Jülg B., Elias J., Zahan A., Köppen S., Becker-Gaeb C. & Rogner J.R. 2008. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. *Journal of Travel Medicine*. 15(2): 133-136.
- 15 Kobayashi Y., Sato G., Kato M., Ito T., Cunha E.M., Silva M.V. Mota C.S., Ito F.H. & Sakai T. 2007. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Archives of Virology*. 152(11): 1995-2004.
- 16 McMurray D.N. & Russel L.H. 1982. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 31(3): 527-531.
- 17 Mok W.L., Luizão R.C.C. & Silva M.S.B. 1982. Isolation of Fungi from bats of the Amazon Basin. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(3): 57-575.
- 18 Muniz M.M., Pizzini C.V., Peralta J.M., Reis E. & Zancopé-Oliveira R.M. 2001. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(12): 4487-4494.
- 19 Nadin-Davis S.A., Huang W., Armstrong J., Casey G.A., Bahloul C., Tordo N. & Wandeler A.I. 2001. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada. *Virus Research*. 74(1-2): 139-156.

S.C.S. Veloso, L. Ferreira, S.M. Pacheco, et al. 2014. *Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* detectados em pulmões de morcegos das regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil. *Acta Scientiarum Veterinarias*, 42: 1252.

- 20 Pacheco S.M. 2005. Técnicas de campo empregadas no estudo de quirópteros. *Canoas: Cadernos La Salle XI*. 2(1): 193-205.
- 21 Padro M., Silva M.B., Laurenti R., Travassos L.R. & Taborda C.P. 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104(3): 513-521.
- 22 Redhead S.C., Cushion M.T. & Frenkel J. 2006. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53(1): 2-11.
- 23 Reis N.R., Shibatta A.O., Peracchi A.L., Pedro W.A. & Lima I.P. 2007. Sobre os Morcegos Brasileiros. In: Reis N.R., Peracchi A.L., Pedro W.A. & Lima I.P. (Eds). *Morcegos do Brasil*. Londrina: EDIFURB, pp.17-25.
- 24 Rodrigues C.C. 2004. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Prata (SP). 171f. Botucatu, SP: Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) - Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.
- 25 Sanches E.M.C., Pacheco S.M., Cericatto A.S., Melo R.M., Colodel E.M., Hummel J., Bianchi S.P., Spanemberg A., Santurio J.M. & Ferreira L. 2009. Detection of *Pneumocystis* in lungs of bats from Brazil by PCR amplification. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(6): 469-473.
- 26 Sodré M.M., Gama A.R. & Almeida M.F. 2010. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 52(2): 75-81.
- 27 Taylor M.L., Chávez-Tapia C.B., Vargas-Yañez R., Rodríguez-Arellanes G., Peña-Sandoval G.R., Toriello C., Pérez A. & Reyes-Montes M.R. 1999. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61(6): 914-919.
- 28 Tencate L.N., Táparo C.V., Carvalho C., Bosco S.M.G., Queiroz L.H., Silva D.C., Perri, S.H.V. & Marinho M. 2012. Study of gastrointestinal fungal flora of bats (Mammalia, Chiroptera) of the northwest region of São Paulo State: zoonotic potential. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*. 49(2): 146-152.
- 29 Tewari R., Wheat L.J. & Ajello L. 1988. Agents of histoplasmosis. In: Ajello L. & Hay R.J. (Eds). *Medical Mycology. Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections*. 9th edn. New York: Arnold and Oxford University Press, pp.373-407.