

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

**PESQUISA SOROLÓGICA DA INFECÇÃO PELO *Histoplasma capsulatum* EM  
SUÍNOS PELA TÉCNICA DE IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA EM GEL DE  
ÁGAR**

**MÔNICA SANTI**

**PORTO ALEGRE**

**2009**

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

**PESQUISA SOROLÓGICA DA INFECÇÃO PELO *Histoplasma capsulatum* EM  
SUÍNOS PELA TÉCNICA DE IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA EM GEL DE  
ÁGAR**

**MÔNICA SANTI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre junto a Faculdade de Medicina Veterinária  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul na  
área de Micologia Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Laerte Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. David Emilio Santos  
Neves de Barcellos

PORTO ALEGRE

2009

**PESQUISA SOROLÓGICA DA INFECÇÃO PELO *Histoplasma capsulatum* EM SUÍNOS PELA TÉCNICA DE IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA EM GEL DE ÁGAR**

Aprovada em 16 de Fevereiro de 2009

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Laerte Ferreira  
Orientador

---

Prof. Dr. Eliana Knackfuss Vaz  
Membro da Banca de Avaliação

---

Prof. Dr. Flávio de Mattos Oliveira  
Membro da Banca de Avaliação

---

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira  
Membro da Banca de Avaliação

*A esperança adquire-se. Chega-se à  
esperança através da verdade, pagando o  
preço de repetidos esforços e de uma longa  
paciência. Para encontrar a esperança é  
necessário ir além do desespero. Quando  
chegamos ao fim da noite, encontramos a aurora.*

*(Georges Bernanos)*

## AGRADECIMENTOS

O meu eterno agradecimento aos meus pais Sérgio e Jane por me oportunizarem essa conquista. Por me ensinarem que o caráter e a humildade são bens preciosos na vida de um ser humano. Pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis encontrados durante a minha vida.

Ao meu orientador Professor Laerte Ferreiro pela atenção prestada e por não terem medido esforços no repasse das informações.

À amizade e competência do Professor Co-orientador David Emilio Santos Neves de Barcellos por ter sido fundamental em todo processo de realização deste trabalho.

A minha querida segunda mãe Edna Maria Sanches Cavallini que batalhou e suportou junto comigo os meus momentos de aflição. Por ter me auxiliado no desenvolvimento das minhas idéias e em todos os passos da minha dissertação. Pelo carinho e grande amizade que ficará para sempre.

Aos Professores Fernando P. Bortolozzo, Ivo Wentz e Mari Lourdes Bernardi pela amizade e vivência nestes dois anos.

Em especial ao meu colega de Mestrado Neimar, por ter sido um grande companheiro e melhor amigo, pelo respeito recíproco, por sua alegria e seu sorriso estampado todos os dias que fizeram meus dias mais agradáveis. Pelas palavras de confiança que nos fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente. Por ter estado ao meu lado sempre e ter compartilhado os melhores momentos durante estes dois anos de mestrado.

À minha grande colega de mestrado Ana Maria pela bela amizade, pela troca de experiências e pelos inesquecíveis momentos compartilhados juntas.

A minha amiga do coração Dani que além de uma super companheira foi essencial em todas as etapas do meu trabalho. Obrigada pelo carinho e a verdadeira amizade que será guardada a sete chaves para toda vida.

Aos demais colegas de pós-graduação Mores, Rafa, Thomas, Mellagi, Ricardo, Marcelo pela troca de conhecimento e auxílio no meu trabalho.

À amizade e companheirismo dos grandes amigos Laura, Lídia, Jamil, Paola e em especial ao Márcio que a cada dia puderam contribuir com suas idéias tornando o trabalho mais fácil.

A Luiza pela ajuda na realização dos testes de ELISA. Aos setores de Virologia e Patologia da UFRGS que permitiram a realização de parte do meu trabalho.

As empresas que autorizaram e se disponibilizaram para a realização das coletas de todo material necessário o sucesso deste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

## RESUMO

### PESQUISA SOROLÓGICA DA INFECÇÃO PELO *Histoplasma capsulatum* EM SUÍNOS PELA TÉCNICA DE IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA EM GEL DE ÁGAR

A Histoplasmose é uma infecção micótica causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Apresenta especial afinidade patogênica com o Sistema Reticulo Endotelial (S.R.E) e é de gravidade variável. É uma das micoses oportunistas mais importantes em indivíduos com comprometimento imunológico. É endêmica em humanos nos Estados Unidos, principalmente nas regiões dos Grandes Lagos e nos vales dos Rios Mississipi e Ohio, América Latina, parte da Ásia e África. No Brasil, 26 microepidemias foram relatadas em oito Estados. O fungo habita solos úmidos, ricos em substâncias orgânicas de pH ácido, contendo alto teor de nitrogênio, especialmente os que contêm fezes de morcegos e aves. O contágio se dá pela inalação das células reprodutivas do fungo, desenvolvendo inicialmente a infecção no pulmão. É notável que o aumento na intensificação dos métodos de produção na suinocultura levou ao aparecimento de doenças relacionadas com as novas tecnologias introduzidas, que promoveram condições para que, agentes que antes se encontravam em equilíbrio com o hospedeiro, viessem exercer efeito patogênico. Após o aparecimento das doenças virais imunossupressoras nos plantéis suínos de todo o mundo, como a Síndrome Respiratória Reprodutiva Suína (SRRS), Síndrome da Dermatite e Nefropatia (SDN) e a Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), as doenças fúngicas se tornaram mais freqüentes, participando com maior expressão nas perdas econômicas do setor. Nesse novo cenário, fungos passaram a expressar suas potencialidades patogênicas, pois com a imunidade comprometida, os animais não são capazes de se proteger mesmo em baixos níveis de infecção. A escassez de pesquisa sobre histoplasmose em suínos gerou a hipótese de que a falta de diagnóstico desta doença não está sendo colocada como possibilidade de casuística diferencial para outras doenças. Há necessidade de serem conduzidos estudos que possam auxiliar em um diagnóstico adequado e que possa, posteriormente, esclarecer possíveis implicações do agente sobre o desempenho animal. O trabalho desenvolvido propôs utilizar a técnica sorológica de Imunodifusão em gel de agar (IDGA) para detectar a infecção por *H. capsulatum* através da pesquisa de anticorpos em amostras de sangue de suínos provenientes de diferentes unidades produtoras de leitões, no estado do Rio Grande do Sul. A amostragem foi composta por 246 amostras de soro de suínos e dividida em três grupos caracterizados de acordo com a taxa de mortalidade apresentada na creche e um quarto grupo composto por animais de baixo desenvolvimento. A presença de reações de precipitação no teste de IDGA não foi verificada em nenhuma das 246 amostras testadas. Entretanto, não se exclui a possibilidade de resultados falso negativos na prova de imunodifusão, pois outra técnica comparativa não foi utilizada neste estudo. É plausível a suposição da ocorrência da infecção pelo *H. capsulatum* em suínos em regiões constantemente expostas ao risco. É uma linha de pesquisa que ainda carece de muitos estudos principalmente epidemiológicos que auxiliem em um diagnóstico adequado e confiável.

**Palavras-chave:** *H. capsulatum*, infecção, imunodifusão, fungo, suínos.

## ABSTRACT

### SEROLOGICAL ANALYSIS OF HISTOPLASMOSIS IN SWINE THROUGH THE IMMUNODIFFUSION AGAR-GEL TECHNIQUE

*Histoplasmosis is a fungal infection caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. It shows strong pathogenic affinity with the Reticulo Endothelial System (S.R.E) and has variable severity. It is one of the most important opportunistic mycoses in individuals with compromised immune system. It is an endemic mycosis in humans in the United States, mainly in the Great Lakes and in the valleys of the Mississippi and Ohio rivers regions, Latin America and regions of Asia and Africa. In Brazil, 26 microepidemics were reported in eight states. The fungus inhabits moist soil, rich in organic substances with acid pH, containing high content of nitrogen, especially those containing feces of birds and bats. The infection occurs by inhalation of the reproductive cells of the fungus, initially developing the infection in the lungs. It is remarkable that growing application of intensive production methods in the swine industry has facilitated to the arisal of diseases. Some technologies may promote conditions for agents, which before were in harmony with the host, to become pathogenic. After the arisal of immunosuppressive viral diseases in swine herds around the world, such as Porcine Reproductive Respiratory Syndrome (PRRS), Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS) and Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), the fungal diseases have been occurring more frequently, accounting for significative economic losses for the swine industry. In this new scenario, fungi began to express its pathogenic potential and animals with compromised immune system are not able to protect themselves, even under low levels of infection. The shortage of research on swine histoplasmosis has led to the hypothesis that the lack of diagnosis of this disease is due to the fact that it is not being considered as an alternative diagnostic for other diseases. There is a need for studies on more adequate diagnosis methods and also on alternatives that assess the implications of the agent on the subsequent animal performance. This study proposed the application of the serological technique - immunodiffusion agar-gel - to detect infection by *H. capsulatum* through the search for antibodies in blood samples from pigs from different swine herds in the Rio Grande do Sul state, Brazil. A total of 246 serum samples from pigs were harvested. Three groups were characterized according to the weaning mortality rate and the fourth group of animals was characterized by pigs with low performance. The presence of immunoprecipitation in the test was not found in any of the 246 samples tested. The possibility of false negative results may not be excluded, because no other comparative technique was used in this study. It is plausible to suppose the occurrence of infection by *H. capsulatum* in pigs in areas constantly exposed to risk. It is a new line of research that still requires more epidemiological studies to assist in an appropriate and reliable diagnosis.*

**Key-words:** *H.capsulatum*, infection, immunodiffusion, fungal, pigs.

**LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1-** Disposição do soro e dos antígenos no Modelo de Poço de Imunodifusão.....22
- FIGURA 2-** Presença das reações de precipitação do soro controle positivo no gel de ágar pela prova de imunodifusão.....28



## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>H. capsulatum</i> .....	<i>Histoplasma capsulatum</i>
SRRS.....	Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína
SDN.....	Síndrome da Dermatite e Nefropatia
SMDS.....	Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos
PCV2.....	Circovirus Suíno tipo 2
AIDS.....	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
IDGA.....	Imunodifusão em Gel de Ágar
TNF- $\alpha$ .....	Fator de Necrose Tumoral
PAS.....	Periodic Acid Schiff
ELISA.....	Teste de Ensaio Imunoenzimático
FC.....	Fixação do Complemento
$\beta$ -glucosidase.....	Beta-glucosidase
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA.....	Ácido Desoxirribonucléico
DOs.....	Densidades Óticas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Caracterização do agente.....	14
2.2 História do agente.....	15
2.3 Distribuição geográfica .....	16
2.4 Histoplasrose em animais .....	17
2.5 Patogenia .....	18
2.6 Manifestações clínicas .....	19
<b>2.7 Diagnóstico laboratorial.....</b>	<b>20</b>
2.7.1 Exame microscópico, cultivo e identificação .....	20
2.7.2 Diagnóstico sorológico .....	21
2.7.2.1.Detecção de anticorpos.....	21
2.7.2.1.1 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA).....	21
2.7.2.1.2 Testes de ensaios imunoenzimáticos .....	23
2.7.2.2 Detecção de antígenos .....	24
2.7.2.2.1 Imunoensaios, imunoistoquímica e histologia.....	23
2.7.2.3 Prova intradérmica de histoplasmina.....	25
2.7.2.4 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	25
<b>3 MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Local e data .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Delineamento experimental .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Obtenção das amostras .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Processamento laboratorial .....</b>	<b>27</b>
3.4.1 Técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).....	27
3.4.2 Interpretação do exame de IDGA .....	28
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A intensificação nos métodos de produção na suinocultura levou ao aparecimento de doenças relacionadas com as novas tecnologias introduzidas nas instalações, no manejo e na nutrição, as quais promoveram condições para que, agentes que antes se encontravam em equilíbrio com o hospedeiro, viessem a desenvolver seus potenciais de patogenicidade (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998).

Destas doenças, as de maior prevalência são as respiratórias, as quais causam sérios problemas em sistemas intensivos de criação de suínos, causando grandes prejuízos à indústria suinícola no Brasil e no mundo. Estão freqüentemente relacionadas à redução de peso, mortalidade, maior predisposição a doenças entéricas, gastos com vacinas e medicamentos (SILVA et al., 2002; SEGALÉS & DOMINGO, 2002).

Além do caráter multifatorial das doenças respiratórias, vários microorganismos bacterianos, virais e fúngicos podem estar envolvidos e atuando como patógenos oportunistas, comumente associados com imunossupressão (SEGALÉS et al., 2003). Após o aparecimento das doenças virais imunossupressoras nos plantéis suínos de todo o mundo, como a Síndrome Respiratória Reprodutiva Suína (SRRS), Síndrome da Dermatite e Nefropatia (SDN) e a Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), as duas últimas presentes no Brasil, as doenças fúngicas se tornaram mais freqüentes e, conseqüentemente, agravaram as perdas econômicas na suinocultura.

A imunossupressão relatada pela presença do circovírus suíno tipo 2 (PCV2), vem ocasionando grandes perdas na produção de suínos em todo o mundo. Esta síndrome pode acometer suínos de várias faixas etárias, mas usualmente atinge animais entre cinco e doze semanas de vida (animais na fase final de creche e terminação) (CIACCI-ZANELLA, 2005) acarretando um desenvolvimento não uniforme facilitando as infecções pulmonares ou septicêmicas por bactérias tais como *Pasteurella multocida* ou *Haemophilus parasuis*, comumente associadas à presença de fungos oportunistas (CARRASCO et al., 2000).

Animais imunodebilitados, tanto por deficiência no manejo como pela presença desta ou de outras doenças no plantel, são as principais fontes de infecção e disseminação de agentes patogênicos no rebanho (SEGALÉS et al., 2003). Nesse novo cenário, os fungos passaram a expressar suas potencialidades patogênicas, pois com a imunidade comprometida, os animais são incapazes de se proteger mesmo em baixos níveis de infecção. Sanches et al. (2006), registraram a ocorrência de *Pneumocystis* spp. em suínos abatidos no Rio Grande do

Sul e Mato Grosso. Este patógeno está geralmente associado a problemas respiratórios em humanos e em suínos pode constituir um sério problema econômico, uma vez que reduz o ganho de peso e, conseqüentemente, o lucro da cadeia produtiva.

Entretanto, o *Histoplasma capsulatum* vem sendo apontado como patógeno oportunista, sobretudo em hospedeiros com imunidade celular alterada, principalmente naqueles com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (SIDRIN & MOREIRA, 1999; SIDRIN & ROCHA, 2004). Nestes pacientes, constitui um sério problema devido ao quadro agudo e disseminado da doença (ZANCOPE-OLIVEIRA, TAVARES & MUNIZ, 2005), em função da deficiente imunidade celular na defesa contra este agente.

Várias doenças fúngicas ainda são desconhecidas, ou, em grande parte, não diagnosticadas na suinocultura brasileira, fazendo com que o papel das micoses seja pouco conhecido. São raros os relatos demonstrando a importância dos agentes fúngicos na suinocultura. A escassez de pesquisa sobre histoplasmose em suínos gerou a hipótese de que a falta de diagnóstico desta doença não está sendo colocada como diferencial para outras doenças. Assim, há necessidade de serem conduzidos estudos que possam auxiliar em um diagnóstico adequado e confiável e que, posteriormente, esclareçam possíveis implicações do agente sobre o desempenho animal.

Os métodos tradicionais de diagnóstico das diversas micoses são baseados na cultura do agente, na identificação do mesmo em exames citológicos ou histopatológicos e na detecção da resposta sorológica ao agente (DIAL, 2007).

Atualmente, os métodos de detecção de anticorpos são as principais ferramentas em uso para o diagnóstico da histoplasmose, devido a sua rapidez. O uso da sorologia no diagnóstico das doenças fúngicas desafia a habilidade dos clínicos na interpretação dos resultados visando assegurar o tratamento mais adequado para os pacientes (GUIMARÃES et al., 2006). O primeiro passo para a compreensão é a certeza que a metodologia e as suas limitações são compreendidas, pois as características das técnicas disponíveis devem ser consideradas, como seu poder de detecção (sensibilidade) e sua especificidade. A dificuldade em determinar a verdadeira sensibilidade e especificidade de um teste para uma doença fúngica em animais é evidente, devido à ausência de referências em fornecer dados suficientes com base em estudos epidemiológicos veterinários (DIAL, 2007).

A falta de pesquisa e relatos de casos de histoplasmose, assim como, da prevalência da doença em suínos no Brasil torna ainda mais difícil a escolha da melhor técnica para detectar a infecção do agente em questão. Para tal finalidade, existe a necessidade de adaptação de metodologias de diagnóstico, atualmente disponíveis para a doença em humanos.

Desta forma, o trabalho desenvolvido utilizou a técnica sorológica de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para detectar a infecção por *H. capsulatum* através da pesquisa de anticorpos, em amostras de sangue de suínos provenientes de diferentes unidades produtoras de leitões, no estado do Rio Grande do Sul.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caracterização do agente

O *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, na sua fase de reprodução sexuada, é taxonomicamente classificado como um ascomiceto pertencente à família *Arthrodermataceae*. É o agente etiológico da Histoplasmose, uma infecção micótica que se desenvolve principalmente nos órgãos do Sistema Retículo Endotelial (S.R.E), afetando os pulmões, fígado, baço, pele, mucosas, sistema linfático e sistema nervoso central. É uma das micoses oportunistas mais importantes em indivíduos com alterações dos mecanismos de defesa específicos mediados por células, particularmente naqueles infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (JOHNSON & SAROSI, 1994; HAJJEH et al., 2001).

É um fungo termodimórfico que habita solos úmidos, ricos em substâncias orgânicas de pH ácido, contendo alto teor de nitrogênio, especialmente os que contém fezes de morcegos e aves. Os nutrientes das fezes juntamente com outras características do solo, como pH apropriado e condições ambientais de temperatura e umidade, constituem o nicho ecológico deste microorganismo, porém, mais trabalhos devem ser realizados para identificar os principais fatores correlacionados com o crescimento e propagação do microorganismo (CANO & HAJJEH, 2001).

As cavernas, árvores ocas, construções antigas ou abandonadas, forros ou porões de casa, sótãos, locais de pernoites de aves, galinheiros e áreas rurais, são importantes fontes de infecção. Além disso, a própria movimentação do solo proporciona o transporte dos microconídios pelo ar. Um grama de solo contaminado pode conter até 6.000 propágulos fúngicos infectantes (LONDERO & WANKE, 1988).

Estudos sobre a ecologia do agente, realizados durante a década de 50 por Zeidberg et al. (1952), mostraram que o fungo não estava uniformemente distribuído na natureza. Além disso, o processo de isolamento do fungo da natureza é laborioso e caro, pois adequadas amostras de solo devem ser coletadas para que áreas contaminadas não sejam negligenciadas (LENHART et al., 1997). Técnicas moleculares podem fornecer um melhor e mais rápido método para testar amostras do solo e auxiliar no entendimento da ecologia do *H. capsulatum* (REID & SCHAFER, 1999).

Em temperaturas inferiores à 35°C, o *H. capsulatum* adquire uma forma filamentosa de hifas delicadas, hialinas, septadas, ramificadas e de morfologia típica representada por macromicroconídios geralmente esféricos, tuberculados, de parede grossa de 8 a 14 µm de

diâmetro. Ao microscópio óptico pode-se observar facilmente os micromicroconídios ovais, com diâmetros de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , que representam o inóculo infectivo do fungo (TEWARY et al., 1998). Em cultivo a 37°C e nos tecidos de mamíferos adquire uma forma leveduriforme esférica ou ovalada, de paredes finas, medindo entre 2 e 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro (LACAZ, et al., 1998; ROSSINI & GOULART, 2006). O crescimento em cultivo é relativamente lento, exigindo incubação por várias semanas (acima de três semanas).

A parede celular do *H. capsulatum* é formada principalmente por  $\alpha$ -1,3 glucano,  $\beta$ -1,3 glucano e quitina. Em comparação com outros fungos dimórficos, a quantidade de quitina é superior neste fungo. Contudo, existem diferenças na composição de glucanos nas duas fases:  $\alpha$ -1,3 glucano é o componente principal da fase leveduriforme, enquanto que na micelial é o  $\beta$ -1,3 glucano (HEARN, 1997). A presença de altos níveis de  $\alpha$ -1,3 glucano está associada com a virulência do isolado (RIPPON, 1988), embora já tenha sido sugerido a possibilidade de um mesmo isolado passar do fenótipo  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(+)</sup> para  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(-)</sup>, o que poderia explicar a existência de formas crônica e latente da histoplasmose. Outro componente importante, porém encontrado em menor quantidade, é o galactomanano situado na parte externa da parede celular, o qual é considerado o principal polissacarídeo antigênico do *H. capsulatum* (HEARN, 1997).

A transformação da fase filamentosa para a leveduriforme requer, em primeiro lugar, a troca de temperatura de 25-30°C para 37°C, processo considerado como necessário para a expressão dos genes de virulência (TAYLOR & REYES-MONTES, 2002). Este processo tem sido dividido em três etapas: a primeira delas se inicia imediatamente após a troca de temperatura com uma rápida diminuição de adenosina trifosfato (ATP) intracelular. Entre as 24-48 horas, as células entram em um período de latência (2ª etapa), que perdura de quatro a seis dias, com diminuição da concentração mitocondrial na célula. A terceira etapa caracteriza-se pela finalização da transição para a forma leveduriforme (MEDOFF, et al., 1986; SAN BLAS, 1992).

## 2.2 História do agente

A histoplasmose foi descoberta por Darling, em 1905, ao efetuar a autópsia de um paciente com hepatomegalia na região do Canal do Panamá, e, no ano seguinte, mais dois casos semelhantes foram relatados. O agente etiológico, inicialmente designado como um protozoário foi considerado um fungo por Da Rocha Lima, em 1912, e sua natureza fúngica foi confirmada após obtenção de cultivos a partir de material clínico por De Monbreum nos

Estados Unidos, em 1934, que comprovou suas características de crescimento. Em 1949, Emmons conseguiu realizar o isolamento do microorganismo do solo e demonstrou que esta é a fonte de infecção mais importante para o homem e os animais e, em 1954, Furcolow, detectou o organismo em amostras de ar, suspeitando que a doença fosse adquirida quando os microconídios da fase filamentosa encontrados no solo eram inalados. Christie e Peterson (1946) demonstraram a positividade pelo teste intradérmico da histoplasmina em crianças saudáveis, estabelecendo a existência da forma benigna da doença. Em 1945, Palmer reportou a distribuição geográfica da histoplasmose nos Estados Unidos e correlacionou a positividade do teste intradérmico com as calcificações pulmonares em indivíduos negativos para o teste da tuberculina, o que correspondia fortemente à histoplasmose. Ajello (1951) e Zeidberg (1952) reconheceram a associação do fungo em ambientes contaminados por excrementos de pássaros (TORRES-RODRÍGUEZ et al., 1993).

### **2.3 Distribuição geográfica**

A histoplasmose é uma micose endêmica em humanos nos Estados Unidos, principalmente nas regiões dos Grandes Lagos e nos vales dos Rios Mississipi e Ohio, América Latina, parte da Ásia e África (FLOR et al., 2003). Entretanto, essa incidência, inicialmente tão circunscrita, começou a ganhar outros continentes no final da década 1960. Atualmente a Histoplasmose possui distribuição mundial, tem sido descrita em mais de 50 países, com maior prevalência nas regiões tropicais e temperadas (SIDRIN & MOREIRA, 1999; SIDRIN & ROCHA, 2004). A histoplasmose é a micose endêmica mais comum em pacientes com AIDS nos Estados Unidos, ocorrendo em 2 a 5 % (WHEAT et al., 2000). Outros países com regiões endêmicas na América do Sul são Argentina, Venezuela, Colômbia e Peru (SIDRIN & ROCHA, 2004).

No Brasil, já foram relatadas 26 microepidemias em oito Estados (Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraíba, Amazonas e Bahia) com isolamento no solo em cinco deles (Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Distrito Federal, Paraíba). Em pacientes com AIDS, no Rio Grande do Sul, o índice de histoplasmose foi de 0,9%, num total de 21.519 amostras analisadas, englobando o período de 1987 a 2002 (SINAN, 2002 apud Unis et al., 2006). Recentemente descreveu-se a primeira microepidemia de Histoplasmose em Santa Catarina com isolamento do foco de infecção (OLIVEIRA et al, 2006).



No Rio Grande do Sul, um estudo realizado por Zembrzuski et al. (1996) em 352 soldados, das cidades de Cachoeira do Sul e Santo Ângelo, determinou a prevalência de histoplasmose através da reação cutânea positiva para histoplasmina e verificou positividade de 48% e 89% na população estudada respectivamente nas regiões citadas, caracterizando o local como foco ambiental do fungo. A histoplasmina é um extrato antigênico de *H. capsulatum* usado em testes imunológicos para histoplasmose, útil para avaliar o grau de endemicidade da micose em diferentes regiões (FAVA & FAVA NETO, 1998).

#### **2.4 Histoplasmose em animais**

Os morcegos desempenham um duplo papel na disseminação do agente na natureza através de suas excretas e dos seus hábitos migratórios (TAMSITT & VALDIVIESO, 1970). Esses animais podem apresentar o desenvolvimento da infecção sistêmica e/ou pulmonar, bem como se tornarem portadores assintomáticos, sendo considerados vetores indiretos (HAGOOD, 2007).

Pássaros não se infectam com histoplasmose, pois sua temperatura corporal é muito elevada, porém, podem carrear o agente em suas asas, e seus excrementos proporcionam um substrato muito rico para o crescimento e desenvolvimento do fungo no solo. O *H. capsulatum* não é encontrado em todos os habitats de morcegos e pássaros. Casos de histoplasmose em humanos foram reportados em algumas áreas sem a associação com pássaros e morcegos na região (CANO & HAJJEH, 2001).

A infecção natural por *H. capsulatum* já foi detectada de várias espécies de animais nos Estados Unidos, dentre eles, quirópteros, marsupiais, insetívoros, primatas, roedores, cães e outros carnívoros (LARSH, 1975; TAYLOR et al., 1996). De acordo com Furcolow & Ruhe (1949) a primeira reação positiva à histoplasmina ocorreu em bovinos no Kansas, em 1949. Após, Cole (1950) e Prior (1954) relataram a reação positiva entre cães em Ohio, utilizando o mesmo teste. Menges (1951) relatou animais reativos para o teste entre bovinos, eqüinos, ovinos, suínos e aves, no Missouri, Estados Unidos. Neste estudo, dentre 129 suínos testados em uma granja, 2 (1,5%) animais, foram reativos. Em outro estudo, determinou também a sensibilidade do teste entre cães, bovinos e seres humanos. As evidências apresentadas indicaram que a histoplasmose é uma doença encontrada entre várias espécies animais. Embora a reatividade pela histoplasmina tenha sido encontrada associada com casos de histoplasmose em humanos, a doença parece não ser transmitida dos animais para o homem.

A provável causa está relacionada com a presença do fungo no solo e disseminação dos propágulos fúngicos pelo ar.

Macola e Font (1977), em Cuba, demonstraram anticorpos anti *H. capsulatum* estudando 11.316 amostras de soro suíno, bovino, eqüino e ovino. Foram obtidos resultados positivos mediante a técnica de imunodifusão em 135 (2,62%) e 4 (0,07%) amostras de suínos e bovinos, respectivamente. Em todos os casos se tratavam de animais sadios e não pode ser afirmado que tipo de bandas de precipitação apareceram.

Rebanhos suínos situados próximos a cavernas ou lugares que possuem grande população de morcegos ou aves migratórias são mais propensos à contaminação por este agente (JUNGERMAN & SCHWARTZMAN, 1972).

## 2.5 Patogenia

O contágio se dá através da inalação de micromicroconídios do fungo, desenvolvendo-se a primoinfecção no pulmão. A partir dos pulmões, por via hematogena, o fungo pode disseminar-se para outros órgãos, sendo a infecção controlada na medida em que se desenvolve a resposta imune mediada por células e a hipersensibilidade a elementos antigênicos do fungo (FLOR, 2001).

Após serem inalados e direcionados aos alvéolos pulmonares, os microconídios são fagocitados por macrófagos pulmonares e células do sistema reticuloendotelial. Com a temperatura corporal (37°C), ocorre a conversão da morfologia micelial para a leveduriforme, multiplicando-se dentro dos fagolisossomos, lisando assim, o macrófago. Uma vez dentro do macrófago, os blastomicroconídios chegam até os linfonodos, onde ganham acesso a circulação sanguínea. A disseminação hematogênica ocorre durante as primeiras duas semanas de infecção, antes da imunidade específica se desenvolver e é assintomática. Após duas a três semanas, desenvolve-se a imunidade celular específica e linfócitos T sensibilizados ativam macrófagos para fagocitarem e lisarem leveduras intracelulares (WHEAT, 2003). Além disso, os linfócitos T induzem os macrófagos a secretarem fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) para auxiliarem na destruição do fungo (FLOR et al., 2003). Os anticorpos séricos específicos são detectáveis a partir de 4 a 6 semanas após a infecção (WHEAT, 2003). A imunidade humoral formada pode não ser suficientemente eficaz para permitir uma proteção adequada, podendo ocorrer reinfecções.

## 2.6 Manifestações clínicas

O quadro clínico da histoplasmose varia em seres humanos, de uma forma de infecção assintomática à disseminada. Estas manifestações são influenciadas principalmente pela magnitude da exposição (número de partículas fúngicas inaladas), do estado imune do hospedeiro e potencialmente pela variação na virulência da partícula infectiva, indicando que fatores genéticos controlam a expressão da doença (GOODWIN et al., 1981). Algumas características como dimorfismo regulado pela temperatura, sobrevivência em fagolisossomos, parasitismo intracelular em macrófagos, habilidade de causar infecção persistente, modulação do pH, diferença na expressão de genes, capacidade de utilização de ferro e cálcio e de formar seu próprio ambiente no hospedeiro são fatores que facilitam a patogênese da histoplasmose (WOODS et al., 2001).

Diversas formas de classificação da histoplasmose são utilizadas em seres humanos, definindo o hospedeiro como normal ou anormal, conforme a exposição: Normal – leve (assintomática, sintomática, ou reinfecção assintomática) e acentuada; Anormal – disseminada, histoplasmona, crônica (GOODWIN & DePREZ, 1973).

Na maioria dos casos, em indivíduos imunocompetentes, a doença é subclínica ou com manifestações mais brandas (90 a 95%) (FLOR et al., 2003) pelo desenvolvimento da imunidade celular mediada por células (linfócitos T, células CD4 e ativação de macrófagos) (CANO & HAJJEH, 2001). Esta forma é de difícil diagnóstico por apresentar um simples quadro respiratório inespecífico, autolimitado e benigno, que desaparece deixando uma reação de hipersensibilidade aos antígenos do fungo (GURNEY & CONCES, 1996).

A reativação da infecção quiescente pode ocorrer durante a imunossupressão, tanto por cepas virulentas quanto não virulentas (DAVIES, et al., 1978 & WHEAT et al., 1990). Algumas evidências para este fato, incluem a ocorrência de histoplasmose em indivíduos que nasceram em uma área endêmica e não retornaram para aquela área, desenvolvendo a doença anos depois.

A reinfecção também ocorre em indivíduos que tenham tido histoplasmose anteriormente (GOODWIN et al., 1981), isto quase sempre ocorre quando um indivíduo é exposto novamente à uma alta carga infectiva. É menos grave que a infecção primária pelo resíduo de imunidade induzida no episódio inicial (WHEAT, 2003).

## 2.7 Diagnóstico laboratorial

Os testes utilizados para o diagnóstico da histoplasmose possuem papel específico, o qual varia de acordo com o hospedeiro e com as diferentes manifestações clínicas em consideração.

Os principais métodos diagnósticos são: (1) cultura, que é o padrão ouro; (2) coloração do fungo nos tecidos e no sangue, sendo utilizados como corantes o PAS (Periodic Acid Schiff) e/ou prata metenamina Grocott-Gomori e Giemsa; (3) teste de detecção de antígenos como imunistoquímica, histologia e imunoenzimáticos como teste de ELISA; (4) testes sorológicos para detectar anticorpos como a reação de fixação de complemento (FC), teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA); e (5) reações cutâneas com histoplasmina.

As técnicas moleculares constituem promissoras ferramentas alternativas que vêm sendo utilizada para melhorar a rapidez no diagnóstico da histoplasmose, especialmente para indivíduos portadores da AIDS (BUITRAGO et al., 2006).

### 2.7.1 Exame microscópico, cultivo e identificação

A visualização da levedura também pode ser realizada pelo exame direto das amostras clínicas utilizando técnicas específicas de coloração fúngica. A sensibilidade do exame microscópico direto em geral é baixa, mesmo com as colorações específicas e está relacionada com a forma clínica: 10% na histoplasmose pulmonar aguda, 40% na pulmonar crônica e <25% na forma disseminada (WHEAT, 2003).

O diagnóstico definitivo, o qual fornece evidências da infecção pelo fungo, é estabelecido pelo isolamento do agente em meios de cultura específicos, mas possui certas limitações.

As culturas são negativas em muitos pacientes com formas brandas de histoplasmose, limitando sua utilização nestes casos. São positivas primeiramente em pacientes com histoplasmose disseminada e crônica, porém, mesmo nestes casos a cultura pode ser falso-negativa em 20% dos casos disseminados (WHEAT et al., 1997) e 50% dos casos crônicos (WHEAT, 1986). Este procedimento é demorado, requer um tempo mínimo de três semanas para seu crescimento *in vitro* e os cultivos para identificação do fungo devem ser manipulados com extrema precaução, devendo cumprir as medidas gerais de segurança biológica laboratorial nível três. Devido ao fato de que alguns fungos desenvolvem microconídios

similares aos do *H. capsulatum*, é necessário demonstrar a existência de ambas as fases deste fungo para estabelecer o diagnóstico por cultivo (GUIMARÃES et al., 2006).

### **2.7.2 Diagnóstico sorológico**

Dadas as dificuldades citadas pelos métodos de isolamento e identificação, são de grande valor as técnicas laboratoriais que contribuem com um diagnóstico mais rápido, específico e sensível. Estas provas sorológicas são positivas em aproximadamente 71% das formas disseminadas de histoplasmose, em 100% das pulmonares crônicas e em 95% das pulmonares agudas (ELIAS COSTA et al., 2000 & WHEAT, 2003).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos apresentam uma positividade maior que 90% em pacientes imunocompetentes, porém pode haver resultados falso-positivos, devido à reação cruzada, pois muitos agentes fúngicos compartilham as mesmas estruturas antigênicas. Esta reação ocorre em mais de 40% dos indivíduos com paracoccidiodomicose, blastomicose, aspergilose e, menos frequentemente com a coccidiodomicose (16%) e candidose (8%) (WHEAT, 1986)

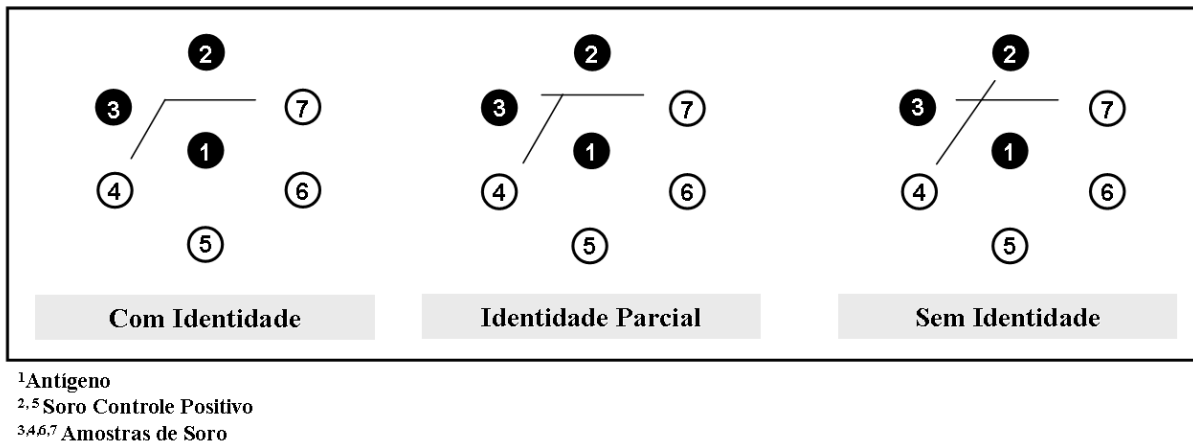
As metodologias mais empregadas são a imunodifusão em gel de ágar e a reação de fixação do complemento, porém recentemente alguns laboratórios vêm utilizando a técnica de ELISA indireta, que de um modo geral, é uma técnica mais sensível, ainda que possam ocorrer resultados falso-negativos na infecção aguda em indivíduos imunodeprimidos e falso-positivos devido a reações cruzadas conforme mencionado anteriormente (HAMILTON, 1998; NEGRONI, 2001).

#### **2.7.2.1 Detecção de anticorpos**

##### **2.7.2.1.1 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)**

O teste de IDGA é baseado na pesquisa de anticorpos anti-H e anti-M que são produzidos após reagirem com estruturas antigênicas específicas (H e M). O complexo antígeno-anticorpo é visualizado sob forma de linha ou arco de precipitação. A velocidade de difusão de cada substância é regida pelas leis da difusão e depende da concentração e do tamanho da molécula, do tamanho dos poros do gel, da temperatura, da concentração do ágar e de sua pureza. Cada linha em um espectro de precipitação corresponde a um par de antígeno-anticorpo (FERREIRA et al., 1996).

O método de Ouchterlony (1953) permite a comparação de vários sistemas antigênicos, desde que colocados em orifícios adjacentes contra um mesmo sistema de anticorpos, formando vários padrões que indicam a existência, ou não, de determinantes antigênicos comuns. As linhas formadas podem ser completamente coalescentes, no caso de antígenos com os mesmos determinantes (identidade imunológica); podem apresentar um “esporão”, como no caso de antígenos parcialmente relacionados (identidade parcial); ou podem formar uma interseção, indicando a ausência de relação entre os antígenos (não-identidade) (Figura 1). Quando os reagentes estão em quantidades balanceadas, a linha de precipitação formada terá a curvatura voltada para o orifício que contém a substância de maior peso molecular, que se difunde mais lentamente (ROITT et al., 1998).



**Figura 1** - Disposição do soro e dos antígenos no Modelo de Poço de Imunodifusão.

Esta técnica emprega como antígeno, extratos antigênicos (histoplasmina) de cultura não purificada, obtidos de meios quimicamente definidos tanto da fase filamentosa quanto da leveduriforme do *H. capsulatum* e limita-se à detecção de reações antígeno-anticorpo em que há formação de precipitados (FAVA & FAVA NETO, 1998). É a técnica diagnóstica mais utilizada entre laboratórios para auxiliar no diagnóstico das micoses sistêmicas em humanos. Ela tem sido mundialmente aceita como o principal método para detecção de anticorpos na histoplasmose humana por ser uma técnica sensível, específica e de fácil e rápida execução. Os resultados apresentam valores que se aproximam de 100% de especificidade e entre 70 a 100% de sensibilidade dependendo da forma clínica (SIDRIN & ROCHA, 2004). A técnica de FC, metodologia extensivamente utilizada no passado é menos específica (70 a 80%) (GUIMARÃES et al., 2006)

Os principais componentes da histoplasmina são os constituintes antigênicos C, M e H. O antígeno C é um carboidrato (galactomanano) que é amplamente responsável pelas

reações cruzadas observadas com outras espécies fúngicas (AZUMA et al., 1974). O antígeno M é uma catalase, glicoproteína de peso molecular 81-kDa, e o antígeno H é uma  $\beta$ -glucosidase, glicoproteína de 93-kDa, que ativam tanto a resposta humoral quanto a resposta mediada por células (DEEPE & DUROSE, 1995).

Em geral, a IDGA é útil para detectar anticorpos 4-6 semanas depois da infecção. O antígeno M é considerado imunodominante, pois anticorpos contra ele são os primeiros a surgirem na infecção aguda e estão comumente presentes durante todas as fases da infecção (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 1999). A banda M é mais frequentemente detectada que a banda H e aparece logo após a infecção e pode indicar infecção prévia, doença ativa ou uma doença crônica progressiva. A reação de precipitina M pode persistir por mais de 3 três anos após a resolução da doença (KAUFMAN, 1992).

A banda H aparece depois da banda M e pode ser encontrada no soro de indivíduos durante a fase aguda e/ou na doença em progressão (WHEAT, 2001). Anticorpos para o antígeno H podem ser detectados 1 a 2 anos após a resolução da doença, porém estes, usualmente desaparecem mais rapidamente do que anticorpos anti-M (DAVIES, 1986).

A presença de ambas as precipitinas é considerada conclusiva para o diagnóstico de histoplasmose em humanos, embora a condição da doença exija a avaliação clínica do paciente (GUIMARÃES et al., 2006).

#### 2.7.2.1.2 Testes de ensaios imunoenzimáticos

Estes ensaios têm sido muito empregados no diagnóstico da histoplasmose, embora de maneira limitada, e têm mostrado boa sensibilidade, embora menor especificidade que as provas de imunoprecipitação (ELIAS COSTA et al., 2000). Desde 1980, imunoenaios com variações nos parâmetros de sensibilidade e especificidade, têm sido desenvolvidos para detecção de anticorpos anti-*H. capsulatum* (BROCK et al., 1983; KUMAR et al., 1985; MAIGA & MARJOLET, 1985; RAMAN et al., 1990; TORRES et al., 1993; ZIMMERMAN et al., 1990; GUIMARÃES et al., 2006). Estas variações são atribuídas a reações cruzadas geradas pelos epítomos dos carboidratos da histoplasmina (GUIMARÃES et al., 2004).

Estes métodos são um atributo útil aos métodos atuais de diagnóstico que podem ser aplicados até mesmo em situações em que os recursos laboratoriais são relativamente limitados (GUIMARÃES et al., 2004).

Anticorpos para *H. capsulatum* podem ser detectados por imunoenaios como Western Blot e ELISA. Western Blot tem sido mais utilizado para avaliar epidemiologicamente a

distribuição da doença. Na técnica de ELISA vários protocolos têm sido descritos para detecção de anticorpos utilizando diversas preparações antigênicas. Um ELISA indireto foi avaliado e validado como um método sensível e específico para a detecção de anticorpos em indivíduos com todas as manifestações clínicas de histoplasmose (GUIMARÃES et al., 2006). É um teste sorológico que utiliza conjugado específico anti-IgG e anti-IgM, fornecendo um resultado definitivo para IgG ou IgM.

### **2.7.2.2 Detecção de antígenos**

Métodos de detecção de antígenos fornecem um diagnóstico rápido e acurado, especialmente quando a detecção de anticorpos é improvável. Pode ser particularmente útil na infecção aguda e especialmente em indivíduos com AIDS, que frequentemente possuem a forma disseminada da doença e falham em montar uma resposta imune (GUIMARÃES et al., 2006).

Na histoplasmose crônica, a detecção do antígeno pode ser negativa devido à baixa quantidade de fungo, sendo o teste sorológico para anticorpos anti-*Histoplasma* positivo na maioria dos casos (WHEAT, 2003).

A interpretação de todas as provas deve ser feita associando os resultados laboratoriais com os dados clínico-epidemiológicos e micológicos (BONIFAZ, 2000). Contudo, métodos para detecção de antígenos não são universalmente disponíveis e não substituem as provas convencionais (exame direto e cultivo) (GUIMARÃES et al., 2006).

#### **2.7.2.2.1 Imunoensaios, imunoistoquímica e histologia.**

A detecção de antígenos fúngicos pelos imunoensaios, tal como ELISA, é valiosa em indivíduos imunocomprometidos e alcançam valores preditivos positivos que variam de 96 a 98% (GUIMARÃES et al., 2006).

A imunoistoquímica se tornou um método de rotina pelos laboratórios veterinários pela quantidade de material submetido para histopatologia. A maior vantagem da imunoistoquímica sobre a cultura e técnicas moleculares é a identificação visual do organismo dentro do contexto da doença tecidual. A avaliação histológica pode fornecer neste contexto, simplesmente uma inflamação que sugere a possibilidade de infecção fúngica (DIAL, 2007).



### 2.7.2.3 Prova intradérmica de histoplasmina

Esta técnica consiste na inoculação por via intradérmica de 0,1mL de histoplasmina e permite avaliar a resposta de hipersensibilidade tipo IV mediada por células. (FAVA & FAVA NETO, 1998). Sua positividade é dada pela formação de uma zona de endurecimento com diâmetro maior que 5mm (NEGRONI, 1982), indicando contato prévio com o *H. capsulatum*. Entretanto, somente pode ser considerado diagnóstico de histoplasmose quando existe a transformação da negatividade para positividade, concomitante com um quadro clínico compatível e antecedentes epidemiológicos sugestivos (ARIAS, 1988).

A reação negativa pode significar ausência de infecção, infecção muito recente ou fase terminal da doença. A resposta celular ocorre habitualmente de 15 a 40 dias após o contato, mantendo-se positiva durante anos. Resultados falso-positivos ocorrem devido às reações cruzadas com outros fungos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*) e falso-negativos em pacientes imunodeprimidos. O teste cutâneo com histoplasmina, apesar de importante nos estudos epidemiológicos, não é recomendado para fins de diagnóstico, devido a uma elevada taxa de positividade entre pessoas que residem em áreas endêmicas. Além disso, pode produzir uma falsa elevação nos títulos de anticorpos séricos. Seu valor diagnóstico é limitado, já que não se pode diferenciar a infecção passada da recente, no entanto, tem sido uma ferramenta importante no conhecimento da epidemiologia da histoplasmose, já que permite delimitar as áreas endêmicas (ZHAO et al., 2001; BULMER & BULMER, 2001).

### 2.7.2.4 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Com a expansão do conhecimento na biologia molecular, novas técnicas de detecção de DNA e RNA espécie-específica e seu sequenciamento, estão apoiando fortemente os métodos tradicionais, assim como, para melhorar a especificidade do diagnóstico. A maioria das técnicas moleculares é desenvolvida para o diagnóstico de doenças bacterianas e virais. Um número crescente de estudos sobre a utilização destes testes em organismos mais complexos como, fungos e protozoários, estão sendo descritos na literatura humana e veterinária (DIAL, 2007).

Ao contrário do isolamento, a técnica de PCR é segura devido à rápida degradação do patógeno pela extração do material genético, o que limita a possibilidade de contaminações

laboratoriais (RICKERTS et al., 2002) e permite diagnóstico precoce antes da cultura se tornar positiva (BUIRAGO et al., 2006).

A detecção de ácidos nucleicos do *H. capsulatum* é uma excelente opção para assegurar um diagnóstico mais acurado e tem sido alvo de muitas pesquisas (BUIRAGO et al., 2006). A amplificação do DNA, utilizando primers específicos, tem mostrado um aumento de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da Histoplasmose. A técnica detecta o DNA do agente em amostras de tecidos e sangue de animais infectados. Considerando que os produtos detectados através da PCR podem ser provenientes da amplificação de DNA não específica de outros fungos, a confirmação da mesma deve ser realizada pelo sequenciamento. Esta técnica não substitui a cultura, mas acrescenta muito ao arsenal diagnóstico (RICKERTS et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2006).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e data**

No período de maio a outubro de 2008 foram coletadas amostras de sangue suíno provenientes de diferentes unidades produtoras de leitões (UPLs), situadas na região do Vale do Taquari, no Estado do Rio Grande do Sul.

#### **3.2 Delineamento experimental**

A amostragem estudada era composta por 246 soros de suínos selecionados aleatoriamente nas granjas. Foi dividida em três grupos caracterizados de acordo com a taxa de mortalidade apresentada na creche e um quarto grupo composto por animais de baixo desenvolvimento.

a) Grupo 1: constituído por 68 leitões saudáveis, com idade média de 55 dias. O percentual de mortalidade na creche era de 1,5%, número este considerado normal dentre os índices zootécnicos atuais.

b) Grupo 2: compreendeu 92 leitões de 45 dias. O percentual de mortalidade na creche era de 2%, índice relativamente alto para mortalidade na creche.

c) Grupo 3: constituído por 48 leitões de baixo desenvolvimento e idade de 50 dias. A taxa de mortalidade na creche era elevada (12%), pois eram procedentes de uma granja que alojava leitões doentes em baias hospital.

d) Grupo 4: compreendeu 40 leitões de várias unidades produtoras de leitões de uma agroindústria do estado do Rio Grande do Sul. Estes animais formavam grupos de monitoria de baixo desenvolvimento da empresa, enviados para necropsia no Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária do Rio Grande do Sul, com idade variando entre 45-100 dias.

### 3.3 Obtenção das amostras

Todas as amostras de sangue foram obtidas do complexo cava-jugular (aproximadamente 5 mL) dos animais vivos. As amostras foram identificadas, acondicionadas em tubos de ensaio e deixadas em temperatura ambiente (25°C) por duas horas, visando a retração do coágulo. Após, foram transportadas em caixa de isopor com gelo até o laboratório do Setor de Micologia da UFRGS. No mesmo dia da coleta, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 3000 g durante 10 minutos. O sobrenadante (soro) de cada amostra foi<sup>1</sup> armazenado em tubo tipo *ependorf* estéril e congelado a temperatura de -20°C até a realização do exame sorológico.

### 3.4 Processamento laboratorial

As amostras de soro foram processadas no laboratório do Setor de Micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O teste sorológico de imunoprecipitação foi escolhido por ser considerado o mais utilizado entre laboratórios para detectar anticorpos na histoplasmose humana e por ser mais específico que outras provas sorológicas (SIDRIN & ROCHA, 2004).

#### 3.4.1 Técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

A técnica de imunodifusão utilizada para o diagnóstico da histoplasmose em suínos seguiu a metodologia descrita por Ouchterlony (1953), com modificações.

O teste foi realizado após a preparação das lâminas de vidro recobrimo-as previamente com uma fina camada de ágar com solução fenolizada, formando uma camada sólida de 2 a 4 mm de espessura. Após a gelificação, foram realizadas perfurações circulares (orifícios), com cerca de 5 mm de diâmetro e 10 mm de espaçamento entre eles, utilizando um

---

<sup>1</sup> Antígeno comercial purificado Meridien Bioscience® (EUA- 100201) e Anticorpo comercial Meridien Bioscience® (EUA- 100901).

sistema radial de perfurações com uma cavidade central e seis cavidades dispostas perifericamente. Na cavidade central foi adicionado 15µL do antígeno produzido pela Meridien Bioscience<sup>®</sup>; em quatro cavidades periféricas, 15µL de cada amostra de soro suíno a ser testada e em outras duas cavidades opostas acrescentou-se 15µL do soro controle Meridien Bioscience<sup>®</sup>, anti- *H.capsulatum* produzido em caprino. A seguir, o material foi incubado a uma temperatura de 37°C, em câmara úmida com vedação, por 24 horas. A primeira leitura foi realizada 24 horas após incubação, em uma sala escura e a visualização da precipitação foi realizada com incidência de um feixe de luz sob um fundo preto. Logo após, foi recoberta com água destilada e incubada por mais 24 horas. Após esta etapa, a lâmina foi envolvida com papel filtro e incubada mais uma vez por 24 horas. Por fim, foi umedecida para retirada do papel filtro e corada com solução corante (Anexo A), por 10 minutos e utilizada uma solução descorante (Anexo A) para lavar rapidamente cada lâmina.

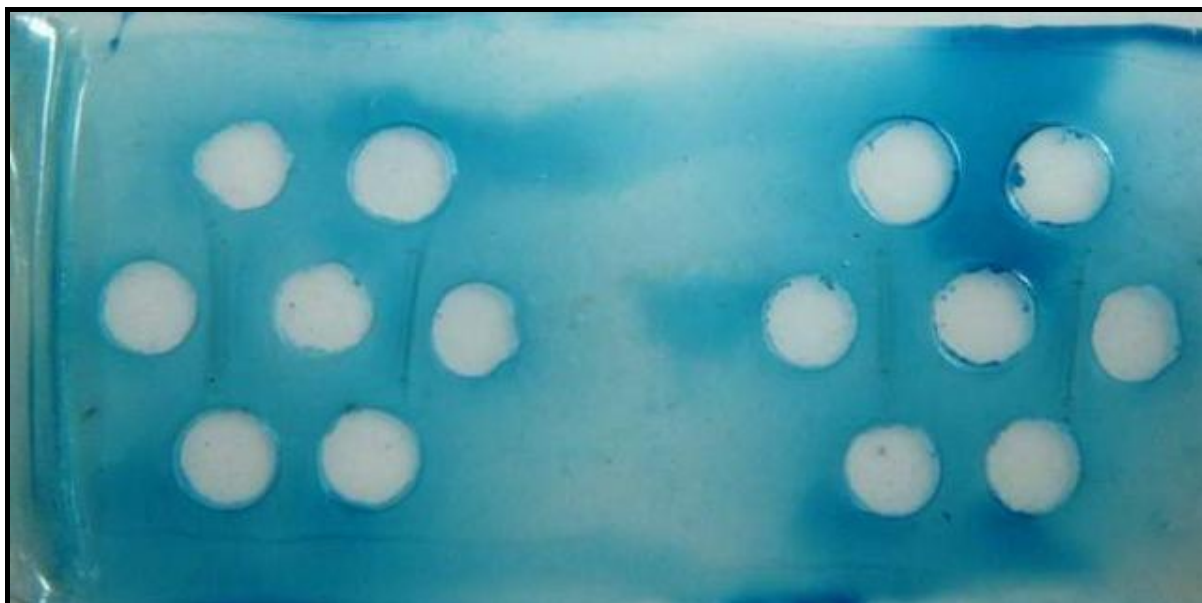
### **3.4.2 Interpretação do exame de IDGA**

A leitura da linha de precipitação dos soros testados é considerada positiva quando obtém identidade com a linha formada pelo antígeno, podendo unir-se e formar uma linha curva contínua. A ausência do antígeno ou do anticorpo é indicada pela ausência da linha (FERREIRA et al., 1996). A banda M tem localização bem próxima ao poço do antígeno, enquanto que a banda H aparece próxima ao poço do anticorpo (LACAZ et al., 1998).

## **4 RESULTADOS**

A presença de reações de precipitação na prova de imunodifusão em gel de ágar não foi verificada em nenhuma das 246 amostras de soro suíno testadas para o *H. capsulatum*.

A Figura 2 representa o adequado funcionamento da técnica de imunodifusão em gel de ágar, validado pela presença das reações de precipitação do soro controle positivo inserido no teste.



**Figura 2** – Presença das reações de precipitação do soro controle positivo no gel de ágar pela prova de imunodifusão (Segue a mesma disposição dos poços demonstrada na Figura 1).

## 5 DISCUSSÃO

A mudança na forma de produção de suínos, de fluxo contínuo para produção em diferentes sítios de acordo com a idade dos animais, tem ajudado a reduzir o impacto causado pelas doenças crônicas. Ao mesmo tempo, algumas alterações no sistema de produção podem ter favorecido a ocorrência de novas doenças e reemergência de outras, assim como, a amplificação de doenças causadas por patógenos comuns, reduzindo a produtividade através de mortalidade, baixo desempenho, não uniformidade dos lotes, má conversão alimentar, condenação de carcaça e gastos com medicação.

Fatores de risco causadores de estresse como densidade elevada, baixa qualidade do ar, água e ração, mistura de lotes com procedência e idades diferentes e presença de enfermidades concomitantes como a circovirose, SRRS, influenza suína, doenças respiratórias, dentre outras, podem favorecer o desenvolvimento de outras doenças ou mesmo exacerbar as manifestações clínicas das já existentes (ROSE et al., 2003; ALLAN et al., 2004).

Com estas alterações no sistema de produção de suínos juntamente com os fatores de risco e o aumento considerável de doenças nos plantéis atualmente, é de suma importância o estabelecimento de novas linhas de pesquisa em suínos, posto que gradativamente, as mesmas têm seu registro aumentado na literatura veterinária em geral nos últimos anos.

Na medicina humana, segundo Colombo (2007), pacientes portadores de diferentes modalidades de imunodepressão e que evoluem para micoses oportunistas representam um grande desafio para o diagnóstico. A histoplasmose é uma doença reconhecidamente endêmica no Rio Grande do Sul (UNIS et al., 2005). Devido ao acréscimo da população com imunidade celular deprimida, o número de casos da forma disseminada da micose sobrepujou as outras formas clínicas (WHEAT et al., 1990). A redução da resposta inflamatória do hospedeiro faz com que sinais clínicos da infecção, assim como suas alterações laboratoriais, sejam muito discretos ao longo da evolução do quadro infeccioso dificultando sobremaneira a suspeita diagnóstica (COLOMBO, 2007).

No que concerne especificamente ao rebanho no Brasil, após a introdução da circovirose, em 2000, as populações suínas ficaram mais suscetíveis a doenças secundárias. Atualmente, é considerada uma doença endêmica devido à elevação do número de casos clínicos com confirmação laboratorial identificados em vários rebanhos suínos brasileiros. No Brasil e em todo mundo, estudos sobre a soroprevalência indicaram que anticorpos para PCV2 estão presentes na maioria dos rebanhos suínos. Embora não esteja ainda comprovado cientificamente que o PCV2 causa imunossupressão nos suínos infectados, todavia sabe-se que uma falha no sistema imune por morte celular de linfócitos ou falha no estímulo desta defesa por erros de síntese ou inativação de substâncias responsáveis por esse estímulo ocorrem. Não apenas o PCV2 como outros fatores não-infecciosos, podem servir como facilitadores da infecção por agentes oportunistas, complicando ainda mais o estado clínico do animal.

No presente estudo, as amostras testadas eram compostas tanto por animais que não apresentavam aparentemente sinais clínicos de nenhuma doença (grupo de animais saudáveis), quanto por animais que apresentavam sinais clínicos de alteração respiratória e que poderiam estar com seu sistema imunológico comprometido.

A amostragem abrangeu uma ampla faixa etária entre os animais (45 – 100 dias) para verificar possíveis diferenças na resposta imune dos animais, em relação a presença da reação de precipitação no teste de imunodifusão. Segundo Wheat (2003), a intensidade da resposta sorológica está relacionada principalmente com a magnitude da exposição e da gravidade da infecção em indivíduos saudáveis.

A exposição de populações suínas em locais possivelmente contaminados ou constantemente expostas ao risco (por coabitarem com grande população de morcegos e pássaros ou na margem de rios) podem representar um grupo com chances maiores de positividade no teste de imunoprecipitação.

Algumas explicações podem ser apresentadas como justificativas para o resultado negativo encontrado em todas as amostras de soro suíno testadas na prova de imunodifusão. Animais naturalmente infectados, com baixos títulos de anticorpos podem não apresentar reações de precipitação, pois não tiveram tempo suficiente para formar anticorpos. Outro fator para explicar tal resultado é o fato do animal realmente não ter a doença ou de ser resistente a mesma.

A escolha do teste de IDGA é mais um fator que pode explicar a negatividade das amostras. De acordo com Corbellini (2007), os testes diagnósticos são imperfeitos, ou seja, podem classificar erroneamente um animal não infectado (falso positivos) ou infectado (falso negativos) e ainda possuem suas peculiaridades (diferentes respostas) em relação a espécie testada. O teste escolhido é bastante específico, porém menos sensível que outras provas como a fixação do complemento, por exemplo, o que poderia explicar a não detecção da presença de anticorpos.

O isolamento do *H. capsulatum* em cultivo é o padrão ouro para o diagnóstico micológico. Segundo Colombo (2007), a sensibilidade das culturas é baixa (muitas vezes  $\leq 50\%$ ) para muitos dos agentes causadores de infecções oportunistas, além da curva de crescimento ser bastante lenta, aspecto que retarda o resultado do diagnóstico. Conseqüentemente, no diagnóstico das micoses, principalmente as invasivas, os métodos convencionais baseados na pesquisa direta de elementos fúngicos à microscopia de material biológico suspeito, cultura e exame anatomopatológico de amostras de tecido, têm limitada aplicabilidade, sensibilidade e especificidade em muitas das micoses oportunistas. Por outro lado, as provas sorológicas servem de bom suporte ao clínico para detecção da infecção pelo *H. capsulatum*, sempre que possível acompanhada de outras ferramentas diagnósticas.

Não se exclui neste experimento, a possibilidade de ter ocorrido resultados falso-negativos na prova de imunodifusão, já que outra técnica comparativa não foi utilizada neste estudo. Por este motivo, antes da concretização do presente trabalho, despertou-se o interesse em realizar outra prova sorológica para detecção de anticorpos, o teste de ELISA, uma vez que os avanços nesta técnica ampliaram a sua utilização como ferramenta de implementação no diagnóstico de muitas doenças (BARROW, 2000).

Para a histoplasmose, a técnica de ELISA ainda não constitui uma ferramenta diagnóstica de rotina utilizada dos laboratórios. A detecção de anticorpos por esta técnica, representa uma alternativa mais rápida em comparação aos diagnósticos microbiológicos. Atualmente não existem “kits” comerciais do teste disponíveis para realizar o diagnóstico da histoplasmose em humanos, o que limita de certa forma a sua utilização e ainda mais, sua

utilização em outra espécie (suína) e devido a falta dos soros espécie-específicos de referência (positivos e negativos).

Contudo, devido ao resultado negativo de todas as amostras testadas na técnica de imunodifusão, deu-se continuidade ao trabalho testando as mesmas amostras pela técnica de ELISA, uma vez que é uma metodologia que apresenta uma boa sensibilidade. Entre muitas dificuldades encontradas durante a realização do teste, uma delas e talvez a mais importante, foi o estabelecimento do ponto de corte. A determinação do ponto de corte é sempre um momento crítico da padronização de um teste, uma vez que depende de algumas condições e principalmente dos soros de referência, que são essenciais para definição das populações negativas e positivas.

Embora, o interesse maior na realização desta técnica fosse apenas utilizá-la como uma ferramenta diagnóstica comparativa com a técnica de IDGA, sem o intuito de padronizá-la para o agente em questão, não foi possível obter resultados conclusivos, justamente pela não possibilidade de determinação do ponto de corte. Esta nova metodologia utilizada para a pesquisa da infecção pelo *H. capsulatum* em suínos, está passando por várias modificações até que possa, posteriormente, gerar resultados conclusivos e auxiliar no diagnóstico da mesma.



## CONCLUSÃO

Neste trabalho, sob as condições utilizadas, não foi detectada a presença de imunoprecipitados anti-*Histoplasma capsulatum* no teste de imunodifusão em gel de ágar na população testada. É plausível a suposição de possível ocorrência da infecção pelo fungo em suínos que habitam regiões constantemente expostas ao risco.

O resultado obtido não exclui a possibilidade de existência da infecção pelo *H. capsulatum* em suínos, já que foi utilizada inicialmente somente uma técnica diagnóstica bem como é uma linha de pesquisa que ainda carece de muitos estudos principalmente epidemiológicos que auxiliem em um diagnóstico adequado e confiável.

## REFEÊNCIAS

- ALLAN, G.M. et al. Experimental model and co-infections. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 165-168, 2004.
- ARIAS, F.R. Histoplasmosis. **Mecanuscrito de el Grupo Espeleológico Mexicano y de la Escuela Nacional de Montaña del Instituto Politécnico Nacional**. México, 1988, p.57-59.
- AZUMA, I. et al. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. **Mycopathology Mycology Applied**, v. 54, p. 11-125, 1974.
- BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J. Princípios gerais para escolha de um antimicrobiano. **Uso de antimicrobianos em suinocultura**. Goiânia: 1998, p. 10.
- BARROW, P.A. Diagnosis of Salmonella by ELISA and other tests. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds). **Salmonella in domestic animals**. New York: CABI, 2000, p. 407- 429.
- BONIFAZ, A. Histoplasmosis. In: Méndez, S.A.; Méndez , C.V. (Eds). **Micología Médica Básica**. 2. ed. México: DF, 2000. p. 257-273.
- BROCK, E.G. et al. Effect of periodate oxidation on the detection of antibodies against M antigen of histoplasmin by enzyme immunoassay (EIA) inhibition. **Current Microbiology**, v. 10, p. 177–180, 1983.
- 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 and Infectious Disease**, v. 25, p. 665-668, 2006.
- BULMER, A.C.; BULMER, G.S. Incidence of histoplasmin hypersensitivity in ther Philippines. **Mycopathologia**, v. 149, p. 69-71, 2001.
- CANO, M.V.C.; HAJJEH, R.A. The epidemiology of Histoplasmosis: A Review. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 16, p 109-118, 2001.
- CARRASCO, M.J. et al. Intestinal chlamydial infection concurrent with postweaning multisystemic wasting síndrome in pigs. **Veterinary Record** , v. 146, p. 21-23, 2000.
- CIACCI-ZANELLA, J. Circovirose suína: reflexos e ações. In: VII SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA E II SIMPÓSIO GOIANO DE SUINOCULTURA - AVESUI. **Seminários Técnicos de Suinocultura**, Goiânia, 2005, p. 42-45.
- COLE, C.R.; PRIOR, J.A.; SASLAW, S. Histoplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 116, p. 135, 1950.
- COLOMBO, A.L. Diagnóstico de doenças fúngicas oportunistas: o grande desafio para os centros médicos de atendimento terciário. **Prática Hospitalar**, n. 52, p. 50-55, 2007.
- CORBELLINI, L.G. O uso da epidemiologia no diagnóstico populacional e implicações no comércio internacional: determinação de zona livre de doença. **Acta Scientiae Veterinariae**,

v. 35, p. s183-s191, 2007.

DAVIES, S.F. Serodiagnosis of histoplasmosis. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 1, p. 9-15, 1986.

DAVIES, S.F.; KHAN, M.; SAROSI, G.A. Disseminated histoplasmosis in immunologically suppressed patients. **American Journal of Medicine**, v. 64, p. 94–100, 1978.

DEEPE Jr, G.S.; DUROSE, G.G. Immunobiological activity recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 3151-3157, 1995.

DIAL, S.M. Fungal Diagnostics: Current Techniques and Future Trends. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 37, p. 373-392, 2007.

ELIAS COSTA, M.R. et al. Conventional versus molecular diagnostic tests. **Medical Mycology**, v. 38, p. 139-145, 2000.

FAVA, S.D.C.; FAVA NETTO, C. Epidemiologic survey of histoplasmin and paracoccidioidin in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 155-164, 1998.

FERREIRA, A.; WATTER, A.; SANDRA L.M. **Diagnóstico Laboratorial**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996, p. 78-82.

FLOR, A. et al. Histoplasmosis Pulmonar Aguda En Un Viajero Espanõl a Nicarõgua: Ejemplo de Enfermedad Importada. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 20, p. 24-28, 2003.

FURCOLOW, M.L.; RUHE, J.S. **American Journal of Public Health**, v. 39, p. 719, 1949.

GOODWIN, R.A. & Des PREZ, R.M.. Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis. **Southern Medical Journal**, v. 66, p. 13-25, 1973.

GOODWIN, R.A.; LOYD, J.E.; Des PREZ, R.M. Histoplasmosis in normal hosts. **Medicine**, v. 60, p. 231-266, 1981.

GUIMARÃES, A.J. et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 509-514, 2004.

GUIMARÃES, A.J.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Diagnosis of histoplasmosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 1-13. 2006.

GURNEY, J.W.; CONCES, D.J. Pulmonary histoplasmosis. **Radiology**, v. 1996, p. 297-306. 1996.

HAGOOD, J. Histoplasmosis. **American Thoracic Society**, 2007.

Disponível em: <<http://www.emedicine.com>>.

Acesso em: 23 jul. 2007.

HAIJEH, R.A. et al. Multicenter case-control study of risks factors for histoplasmosis in

human immunodeficiency virus-infected persons. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32: p. 1215-1220, 2001

HAMILTON, A.J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. **Medical Mycology**, v. 36. p. 351-364, 1998.

HEARN, V.M. Structure and function of the fungal cell wall. In: Jacobs, P.H.; Nall, L. (Eds). **Fungal Diseases: Biology, immunology and diagnosis**. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 27-60.

JOHNSON, P.C.; SAROSI, G.A. Progressive disseminated histoplasmosis in patients with AIDS: HIV. **Advances in Behaviour Research and Therapy**, v. 4, p. 15-21, 1994.

JUNGERMAN, P.F.; SCHWARTZMAN, R.M. Confirmed histoplasmosis in an Australian dog. **Veterinary Medical Mycology**, v. 37, p. 106, 1972.

KAUFMAN, L. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. **Clinical Infectious Disease**, v. 14, p. s23-s29, 1992.

KOUTIALA, A.A.; KOUTIALA, I. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgM, IgG and IgA class antibodies against *Candida albicans* antigens: development and comparison with other methods. **Sabouraudia**, v. 19, p. 123-134, 1981.

KUMAR, B.V. et al. Cross-reacting human and rabbit antibodies to antigens of *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Infection and Immunity**, v. 48, p. 806-812, 1985.

LACAZ, C.S. et al. Guia para identificação. **Fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier. 1998, p. 250-256.

LARSH, H.W. The epidemiology of histoplasmosis. In: The Epidemiology of Human. **Mycotic Diseases**. Springfield: Y. Al-Doory, 1975, p. 52-73.

LENHART, S.W. et al. Histoplasmosis: Protecting workers at risk. **DHSS (NIOSH) Publication**, v. 97, p. 146, 1997.

LONDERO, A.T.; WANKE, B. Histoplasmosse *capsulata*. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 55, p. 94-109, 1988.

MACOLA, O.S.; FONT D'ESCOUBET, E. Valor de la prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la histoplasmosis animal. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 29, p. 81-84, 1977.

MAIGA, Y.I.; MARJOLET, M. Value and limits of serological methods: electrosyneresis and ELISA for the study of the prevalence of histoplasmosis in Mali. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, v. 78, p. 585-593, 1985.

MEDOFF, G. et al. Irreversible block of mycelial to yeast transition of *Histoplasma capsulatum*. **Science**, v. 231, p. 476-479. 1986.

MENGES, R.W. Histoplasmin Sensitivity in Animals. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 119, p. 69, 1951.

NEGRONI, R. Inmunología de las micosis. In: Margni R.A. **Inmunología e Inmunoquímica**. La Habana: Ed. Científico-Técnica, 1982, p. 340-362.

NEGRONI, R. **Micosis asociada al SIDA**. VITAE, 2001, 9.

Disponível em:

<<http://caibco.ucb.vc/vitae/VitaeNueve/Articulos/Micologia/Micosis/Archivos/Histoplasma>>

Acesso em: 20 out. 2008.

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

OUTCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gel. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 32, p. 231-240. 1953.

PRIOR, J.A.; SASLAW, S.; COLE, C.L. Experiences with histoplasmosis. **Annual International Medicine**, v. 40, p. 221-244, 1954.

RAMAN, C. et al. Evaluation of an ELISA for the detection of anti-Histoplasma ribosomal and antihistoplasmin antibodies in histoplasmosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 4, p. 199-207, 1990.

REID, T.M.; SCHAFFER M.P. Direct detection of Histoplasma capsulatum in soil suspensions by two-stage PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 269-273, 1999.

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

RIPPON, J.W. Medical Mycology. **The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1988: p. 381-432.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. Mosby: London, UK. 5. ed., 1998, p. 423.

ROSE, N. et al. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 61, p. 209-225, 2003.

ROSSINI, T.F.; GOULART, L.S. Histoplasmosose Clássica: Revisão. **RBCA**, v .38. p. 275-279, 2006.

SAN-BLAS, G. Regulaciones bioquímicas en el dimorfismo y la virulencia de hongos patógenos para humanos. **Acta Scientiae Venezuelana**, v. 43, p. 3-10, 1992

SANCHES, E.M.C. et al. Coinfection of pneumocystis carinii sp. suis and Porcine Circovirus (PCV2) in pigs lungs obtained from slaughterhouses in Southern and Midwestern regions of

Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. s92-s94, 2006.

SEGALÉS, J. et al. Pulmonary aspergillosis in a postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. **The Pig Journal**, v. 52, p. 41-47, 2003.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Porcine circovirus type 2 infection: Postweaning multisystemic wasting syndrome and other conditions. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 17, 2002, Ames, Iowa. **Proceedings**, Ames, Iowa, 2002, p. 3-8.

SIDRIN, J.J.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 327-341.

SIDRIN, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais de Micologia Médica**. Diagnóstico imunológico das infecções fúngicas. Eds: Camargo, Z.P. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 118-126.

SILVA, A.F. et al. Prevalence of respiratory diseases in swine at slaughterhouses in Brazil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 17, 2002, Ames, Iowa, USA **Proceedings**, Iowa, USA, v. 2, 2002, p. 332.

TAMSITT, J.R.; VALDIVIESO, D. Los murciélagos y la salud pública. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 69, p. 122-139, 1970.

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

TAYLOR, M.L.; REYES-MONTES, M.R. Novos aportes sobre la epidemiología de la histoplasmosis en México. **VITAE**, 2002, 10.

Disponível em:

<<http://caibco.ucb.vc/vitae/VitaeNueve/Articulos/Micologia/Micosis/Archivos/Histoplasm>>

Acesso em: 20 out. 2008.

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

TORRES, M. et al. Evaluation of enzyme linked immunosorbent-assay and western blot for diagnosis of histoplasmosis. **Revista de Investigación Clínica**, v. 45, p. 155-160, 1993.

TORRES-RODRÍGUEZ, J.M. et al. **Micologia Médica**. In: Negroni-Briz, R. (Ed.). **Histoplasmosis**. Barcelona: Ed: Masson, 1993, p. 247.

UNIS, G.; ROESCH, E.W.; SEVERO, L.C. Histoplasmosis pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro Pneumologia**, v.31, p. 52-9, 2005.

WHEAT, L.J. Current diagnosis of histoplasmosis. **Trends Microbiology**, v. 11, p. 488-494, 2003.

WHEAT, L.J. et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. **Medicine**,

v. 69, p. 361-374, 1990.

WHEAT, L.J. et al. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p. 493–499, 1986.

WHEAT, L.J. et al. Factors associated with severe manifestations of histoplasmosis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 877-881, 2000.

WHEAT, L.J. et al. Treatment of histoplasmosis with fluconazole in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Medicine**, v. 103, p. 223–232, 1997.

WHEAT, L.J. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: update 2000. **Seminars Respiratory Infectious**, v. 16, p.131-140, 2001.

WOODS, J.P. et al. Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 16, p. 91-101, 2001.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. et al. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1947- 1953, 1999.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; TAVARES, P.M.S.; MUNIZ, M.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **Advances in Molecular Mycology**, v.45, p. 443-449, 2005.

ZEIDBERG, L.D. et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **American Journal Public Health**, v. 42, p. 930-395, 1952.

ZEMBRZUSKI, M.M.; BASSANESI, M.C.; WAGNER, L.C.; SEVERO, L.C. Inquérito intradérmico com histoplasmina e paracoccidioidina em duas regiões do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 1-3, 1996.

ZHAO, B. et al. Epidemiological investigation of *histoplasma capsulatum* infection in China. **Chinese Medical Journal**, v.114, p.743-746, 2001.

ZIMMERMAN, S.E. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses ferrous metal beads for determination of antihistoplasmal immunoglobulins G and M. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 59-64, 1990.

**ANEXO A** – Formulação das soluções utilizadas para a técnica de IDGA (Oliveira – Comunicação Pessoal)

- Meio Fenolizado – Composição:

NaCL.....	0,90 g
Citrato de sódio.....	0,40 g
Fenol*.....	88%
Glicina.....	7,50 g
Agar.....	1,70 g
Água destilada.....	100 mL

Modo de Preparo: Dissolver os reativos em banho–Maria ou microonda. Conservar em temperatura ambiente em frasco bem fechado.

\* Dissolvido em água destilada

- Solução Corante – Composição:

Amido Schwarz.....	0,10g
Ácido acético glacial.....	20 mL
Água destilada.....	1000 mL

Modo de Preparo: Dissolver todos os reativos em um frasco. Conservar em temperatura ambiente em frasco bem fechado.

- Solução Descorante – Composição:

Álcool etílico 96° GL.....	400 mL
Ácido acético glacial.....	100 mL
Água destilada.....	1000 mL

Modo de Preparo: Dissolver todos os reativos em um frasco. Conservar em temperatura ambiente em frasco bem fechado.



## ANEXO B – Metodologia utilizada para realização do teste de ELISA

A técnica de ELISA utilizada para o diagnóstico da infecção por *H. capsulatum* em suínos, seguiu a metodologia previamente descrita por (Koutiala & Koutiala, 1981), com modificações.

**1. Condições do teste:** as concentrações preliminares dos componentes do teste foram estabelecidas através da avaliação das densidades óticas (DOs) obtidas para um soro controle positivo de humanos (Meridien Bioscience<sup>®</sup>, EUA- 100901) e um soro controle negativo proveniente de um sistema de produção *Specific Pathogen Free* (SPF), gentilmente cedido pelo pesquisador Nelson Mores, EMBRAPA-Suínos e Aves. Os componentes foram testados nas seguintes diluições: soro (1:50 até 1:200); antígeno (1:100 até 1:400) e conjugado (1:2000 até 1:8000). Os resultados que permitiram mais discriminação entre os soros positivo e negativo foram escolhidos para testar as amostras de soro suíno.

**2. Protocolo do teste de ELISA:** placas de (Falcon 3912 – Microtest III<sup>TM</sup> Flexible Assay Plate) foram impregnadas com 100 µL, por cavidade, do antígeno diluído (1:100) em tampão carbonato de sódio (0,2M e pH 9,2), permanecendo durante a noite à 4° C. Nesta etapa, as placas podem ser congeladas à -80° C, para posterior utilização. O bloqueio foi realizado com 200 µL de soro albumina bovina (BSA 1% em 100 mL de PBS) por poço, durante duas horas. As amostras de soro a serem testadas foram adicionadas (100 µL/poço), em duplicata na placa, na diluição de 1:100 em PBS e incubadas por 2 horas, à 37° C. As placas foram incubadas com 100 µL do soro contra IgG de suíno conjugado com peroxidase (A 5670 Sigma Aldrich) na diluição de 1:5000 em PBS nas amostras testadas e com 100 µL do soro contra IgG de humanos, produzido em caprinos, conjugado com peroxidase (A 5670 Sigma Aldrich) na diluição de 1:5000 em PBS, por 30 minutos, à 37° C. Em seguida, foi adicionado 150 µL de solução reveladora (Liquid Substrate System – TMB-8665 Sigma-Aldrich). Após 15 min de incubação em temperatura ambiente, a intensificação da cor foi bloqueada com o acréscimo de 50 µL de ácido sulfúrico (2 M) por cavidade. A DO foi lida em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

Entre cada uma das etapas, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (solução PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,6) (Anexo C), bem como todas as incubações foram realizadas em câmara úmida.

**3. Ponto de Corte:** Não pode ser estabelecido pela falta de soros suínos sabidamente positivos e negativos. No presente estudo, utilizou-se o soro controle positivo de humanos (Meridien Bioscience<sup>®</sup>, EUA- 100901) e soro SPF de suínos, como controle negativo.

**ANEXO C - Formulações das soluções utilizadas na técnica de ELISA (Castro – Comunicação Pessoal)**

- Solução Tampão Carbonato de Sódio 0,2 M pH 9,2

Composição:

Solução A: 0,2 M Carbonato de sódio anidro..... 21,20 g / L

Solução B: 0,2 M Bicarbonato de Sódio..... 16,80 g / L

Modo de Preparo: Preparar as soluções separadamente. Conservar na geladeira em frasco bem fechado.

- Solução PBS (1 Litro)

Composição:

Fosfato de sódio dibásico anidro..... 1,48g

Fosfato de sódio monobásico..... 0,43g

Cloreto sódio..... 7,20g

Água destilada..... 1 L

Modo de Preparo: Misturar todos os componentes em 1 L de água destilada. Conservar na geladeira em frasco bem fechado.

- Solução de Lavagem

Composição:

PBS..... 1L

Tween 20 (pH 7,6)..... 0,1%

Modo de Preparo: Misturar todos os componentes.

Conservar na geladeira.