

Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no município do Rio de Janeiro

* Instituto Oswaldo Cruz
Departamento de Micologia.
Rio de Janeiro – RJ.

Rosely Maria Zancopé-Oliveira*
Bodo Wanke*

Em um estudo realizado em 103 animais silvestres capturados em Rio da Prata, região periurbana do município do Rio de Janeiro, Histoplasma capsulatum foi isolado de fígado e baço de um roedor Rattus rattus e de dois marsupiais Metachirus opossum. Pela primeira vez se descreve a infecção naturalmente adquirida nesta espécie marsupial, popularmente conhecida como cuíca. Os animais infectados não apresentaram sintomas clínicos e alterações histopatológicas.



INTRODUÇÃO

O isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres e domésticos naturalmente infectados tem sido utilizado como método complementar na determinação da distribuição geográfica da histoplasmose indicando a existência de fontes comuns de infecção aos homens e animais em determinada região.

Várias espécies de mamíferos pertencentes às ordens dos roedores, canídeos, felídeos, marsupiais e quirópteros são suscetíveis a esta infecção fúngica^{1, 7, 8}, mas somente os quirópteros parecem participar ativamente no ciclo epidemiológico desta micose sistêmica, porque são suscetíveis à infecção, podendo disseminar o fungo de um local a outro^{1, 4}, além de adubarem os solos com suas fezes. Hoff & Bigler (1981), em recente revisão, demonstraram que, apesar de certas espécies participarem no ciclo do *H. capsulatum* como disseminadores ativos deste microorganismo no ambiente, não significa que todas as espécies de morcegos tenham histoplasmose ou sejam capazes de atuarem como disseminadores; com isso, a importância dos morcegos na dinâmica da transmissão da histoplasmose ainda não está totalmente esclarecida.

No Brasil, a histoplasmose em animais tem sido frequentemente verificada através de estudos direcionados, tanto para a pesquisa do seu agente em animais domésticos e silvestres, como para a pesquisa de agentes de outras parasi-

Recebido para publicação em
04/11/85.

toses, como Leishmaniose e doença de Chagas. Além de espécies já conhecidas como suscetíveis ao *H. capsulatum*, foram encontradas outras nunca descritas na literatura médica, como o *Proechimys dimidiatus*¹⁶. Todas as espécies animais que foram encontradas naturalmente infectadas estão descritas em revisões feitas sobre a histoplasmose animal no Brasil^{16, 17}. Após estas revisões, Naiff et alii¹⁰ demonstraram quatro gambás *Didelphis marsupialis* e duas pacas *Agouti paca* infectados, capturados na região Amazônica.

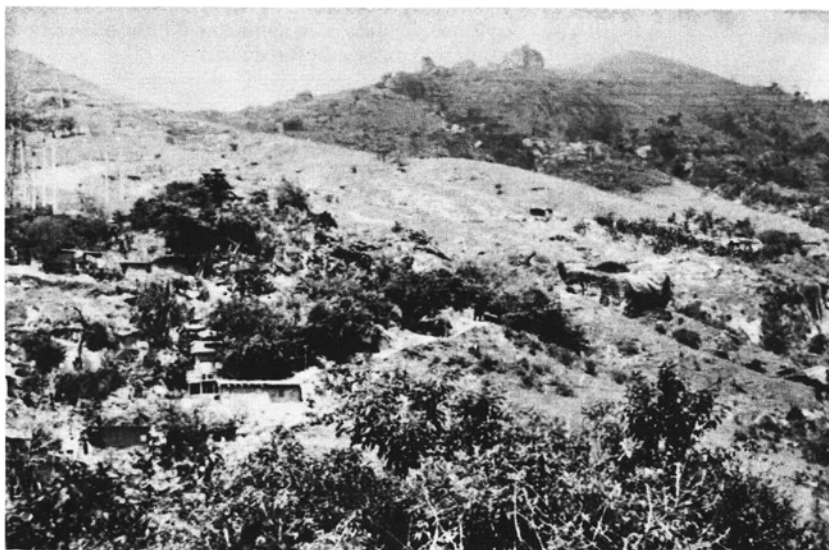
Como contribuição para a determinação da distribuição geográfica da histoplasmose em nosso meio, os autores realizaram um estudo em animais silvestres capturados em região periurbana do município do Rio de Janeiro.

METODOLOGIA

Características geográficas da área de estudo

A área escolhida para o estudo é considerada periurbana por apresentar uma região com características exclusivamente rurais (Fig. 1) e uma região urbanizada (Fig. 2), conhecida como Rio da Prata. É considerada distrito periurbano do bairro de Campo Grande, XVII Região Administrativa do município do Rio de Janeiro, situando-se no centro do município, a oeste do maciço da Pedra Branca (Fig. 3), entre os paralelos 22°50' e 23°05' e os meridianos 43°35' e 43°20'.

FIGURA 1 – Vista parcial da serra do Rio da Prata.



Captura dos animais

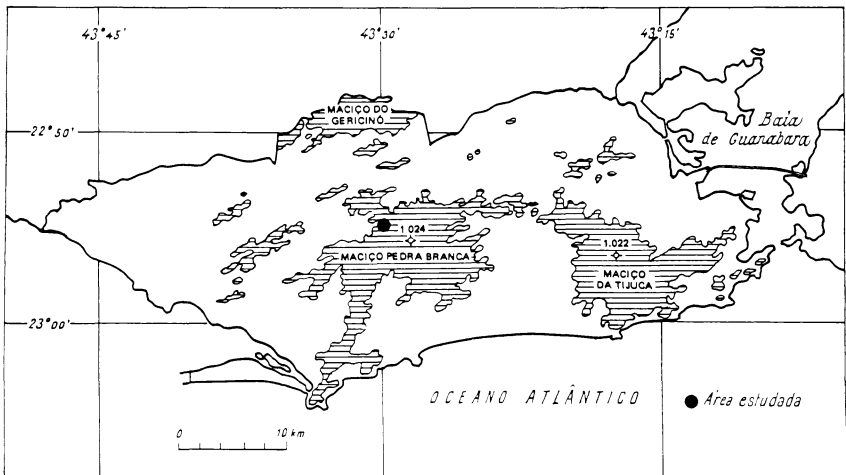
A captura dos animais foi realizada durante 15 meses (maio de 1982 a outubro de 1983) em vários sítios residenciais da serra do Rio da Prata.

Foram utilizados dois tipos de armadilhas: 50 armadilhas de arame, com dimensões de 30cm x 11cm x 9cm, com isca suspensa, para a captura de roedores de pequeno porte, e 5 armadilhas de madeira, com dimensões de 45cm x 30cm

FIGURA 2 – Largo do Rio da Prata.



FIGURA 3 – Aspectos geográficos do município do Rio de Janeiro. Localização da área do Rio da Prata.



x 25cm, também com isca suspensa. Diferentes iscas foram utilizadas, escolhidas segundo as preferências alimentares dos marsupiais e roedores. Para a captura de marsupiais utilizou-se, principalmente, banana d'água, abóbora, aipim e ovos⁶, já para roedores, milho verde e milho de pipoca foram as iscas de escolha, além de pão com manteiga de amendoim⁹.

As armadilhas foram armadas em diferentes ambientes como furnas, bananais e capinzais, geralmente próximos a riachos e corredeiras, e peridomiciliarmente em barracões que servem de depósito de alimentos e de instrumentos utilizados na lavoura, em galinheiros e em pocilgas.

Para facilitar a observação e controle das armadilhas, foram utilizadas bandeirolas vermelhas de plástico, marcadas com o respectivo número da armadilha, presas a suportes de ferro (Fig. 4).

FIGURA 4 — Abrigo de roedores utilizado para a captura dos animais e instrumento utilizado para o mesmo fim.



Procedimentos técnicos

Os animais foram levados vivos ao laboratório (Fig. 5) e necropsiados segundo as normas do Dissection Guides^{1,3}. Todos foram submetidos a exames sorológico, micológico e histopatológico.

Estudo sorológico – A obtenção do sangue se deu através das vias cardíaca e intraorbital. O sangue total foi utilizado para a realização de esfregaço e gota espessa corados pelo Giemsa para posterior pesquisa de hemozoários, e o soro foi utilizado em teste sorológico específico para fungos, imunodifusão dupla em gel^{1,1}. Todos os soros foram testados frente a extratos protéicos solúveis do *H. capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* e antígeno filtrado de *Aspergillus fumigatus*, produzidos no Instituto Oswaldo Cruz³.

Estudo micológico – Após a obtenção do sangue, os animais foram necropsiados e fragmentos de fígado, baço, pulmão e intestino foram retirados, semeados em tubo de ensaio contendo meio de Mycosel e Sabouraud e deixados à temperatura ambiente (25–30°C) durante 70 dias. Todos os órgãos restantes, excetuando o cérebro e aparelho gênito-urinário, foram extraídos e fixados em formalina tamponada neutra de Lillie.

O estudo das colônias desenvolvidas sobre os fragmentos de órgãos semeados foi realizado através da observação dos aspectos macro e micromorfológicos do fungo. Após a

FIGURA 5 – Gaiola utilizada para a captura. *Metachirus opossum* aprisionado.



verificação do tipo de colônia (filamentosa ou leveduriforme) e observação da termotolerância, foram realizadas técnica de montagem em lâmina com lactofenol azul de algodão e técnica de cultivo em lâmina de Ridde^{1,2}. Colônias termotolerantes, morfológicamente similares ao *H. capsulatum*, foram repicadas para Agar Infusão-Cérebro-Coração (BHI-Difco), acrescidas de 10 g/l de glicose e 1 g/l de L-cisteína⁴ em tubos posteriormente selados com parafina. Além disso, 10⁸ células destas colônias foram inoculadas intraperitonealmente em hamsters dourados machos de 115g (*Mesocricetus auratus*) para a verificação da patogenicidade da cepa isolada.

Estudo histopatológico – Os espécimens fixados foram preparados segundo técnicas rotineiramente utilizadas em histopatologia. Para a observação dos aspectos teciduais, as secções histológicas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE) e para evidênciação dos fungos foi empregada a coloração de Grocott, método de impregnação argêntica. Cortes histológicos dos animais de onde *H. capsulatum* foi isolado em cultura também foram corados pela reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS).

RESULTADOS

Foram estudados 103 animais, incluindo 77 roedores, dos quais 12 ratos da cana *Akodon arviculoides*, 01 porco-espinho *Coendou prehensilis*, 18 ratos do milho *Oryzomys eliurus*, 02 ratazanas *Rattus norvegicus* e 44 ratos-pretos *Rattus rattus*; 24 marsupiais, dos quais 06 gambás *Didelphis marsupialis* e 18 cuicas *Metachirus opossum*. *H. capsulatum* foi isolado de 01 *Rattus rattus* e de 02 *Metachirus opossum*, identificados como cepas RP44, RP74 e RP93 (Tabela 1).

TABELA 1

HISTOPLASMA CAPSULATUM EM ANIMAIS SILVESTRES CAPTURADOS EM RIO DA PRATA, RJ. MAIO/1982 a OUTUBRO/1983.

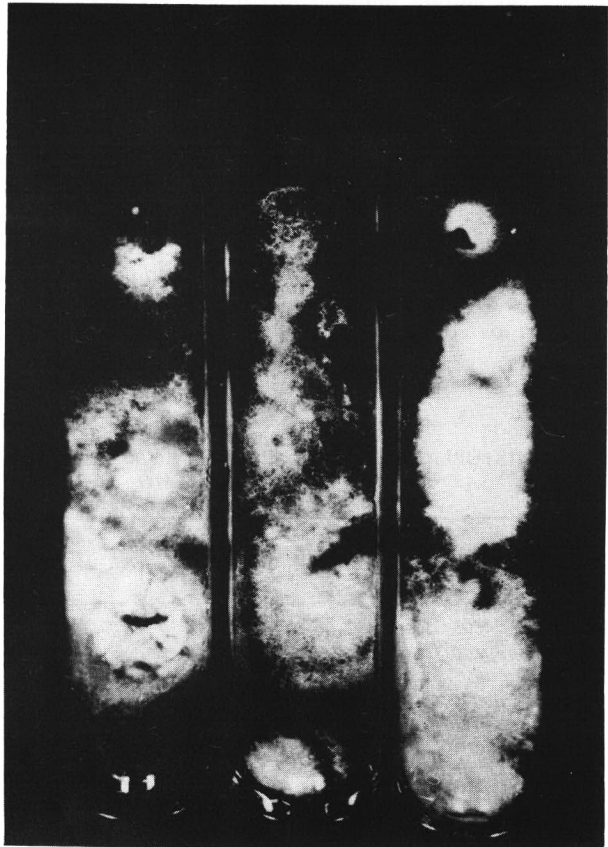
ESPÉCIE	Nº	<i>H. capsulatum</i>	
		Nº	%
<i>Akodon arviculoides</i>	12	—	—
<i>Artibeus lituratus</i>	02	—	—
<i>Coendou prehensilis</i>	01	—	—
<i>Didelphis marsupialis</i>	06	—	—
<i>Metachirus opossum</i>	18	02	11,1
<i>Oryzomys eliurus</i>	18	—	—
<i>Rattus norvegicus</i>	02	—	—
<i>Rattus rattus</i>	44	01	2,8
TOTAL	103	03	2,9

Todas as três cepas isoladas iniciaram seu crescimento entre 7 e 15 dias sobre fragmentos de fígado e baço, apresentando-se sob forma de colônia filamentososa (Fig. 6), sem elementos que caracterizassem a espécie. Após 2 a 3 dias do crescimento inicial, verificou-se, além de hifas septadas, macroconídios tuberculados e microconídios de paredes lisas (Fig. 7).

A observação da conversão da fase filamentososa à fase leveduriforme, que levaria ao diagnóstico final do *H. capsulatum*, não foi obtida em nenhuma das cepas, e a identificação final foi realizada por gentileza do Dr. Libero Ajello, na Division of Mycotic Diseases, Center for Disease Control, Atlanta, USA, através da técnica dos exoantígenos.

Todos os animais capturados apresentavam aspecto saudável, sem lesões macroscópicas que chamassem atenção. Não foram visualizados elementos fúngicos característicos

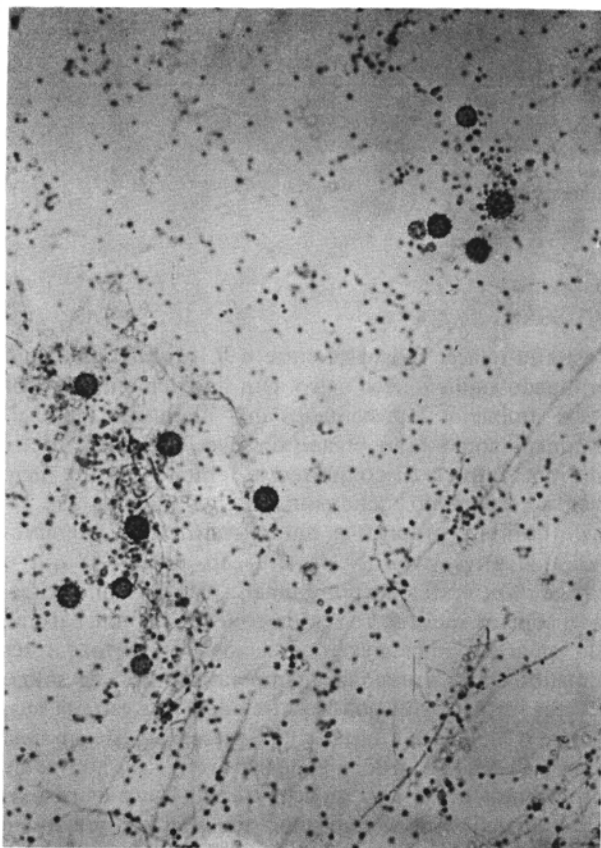
FIGURA 6 – *Histoplasma capsulatum*. Aspecto macroscópico de cultivo à temperatura ambiente (colônia finamentosa).



em nenhum dos animais, inclusive naqueles de onde *H. capsulatum* foi isolado.

O estudo histopatológico dos hamsters experimentalmente infectados com as cepas isoladas evidenciou lesões que freqüentemente são observadas na histoplasmose humana. O fígado apresentou-se com granulomas epitelióides compostos por linfócitos, macrófagos, neutrófilos e raramente células gigantes do tipo de Langhans, sendo visualizadas, também, nas preparações com impregnação argêntica, várias células fúngicas de aspecto leveduriforme, sem brotamento, de tamanho uniforme.

FIGURA 7 – *Histoplasma capsulatum* com 7 dias de crescimento. Cultivo em lâmina com hifas, macroconídios e microconídios. Lactofenol aul de algodão (400x).



Dos 103 animais, 61 (59,2%) foram estudados sorologicamente e não foram identificadas linhas de identidade em nenhum dos soros quando testados frente aos antígenos fúngicos (Tabela 2), sugerindo não haver doença em atividade na época de estudo destes animais.

TABELA 2

RESULTADO DO TESTE SOROLÓGICO FRENTE A ANTÍGENOS DE *H. CAPSULATUM*, *P. BRASILIENSIS* e *A. FUMIGATUS* NOS ANIMAIS CAPTURADOS, RIO DA PRATA, RJ, 1982-1983.

ESPÉCIE	N ^t	N ^s	Imunodifusão dupla			
			%	A _g ^u HC	A _g Pb	A _g AF
<i>Artibeus lituratus</i>	02	—	—	—	—	—
<i>Akodon arviculoides</i>	12	04	33	—	—	—
<i>Coendou prehensilis</i>	01	01	100	—	—	—
<i>Didelphis marsupialis</i>	06	05	83	—	—	—
<i>Metachirus opossum</i>	18	13	72	—	—	—
<i>Oryzomis eliurus</i>	18	05	28	—	—	—
<i>Rattus norvegicus</i>	02	02	100	—	—	—
<i>Rattus rattus</i>	44	31	70	—	—	—
TOTAL	103	61	59			

- N^t — N^o total de animais estudados
 N^s — N^o de animais testados sorologicamente
 A_gHc — Antígeno de *H. capsulatum*
 A_gPb — Antígeno de *P. brasiliensis*
 A_gAf — Antígeno de *A. fumigatus*

DISCUSSÃO

A estreita relação existente entre o *H. capsulatum* e um determinado ambiente ecológico, tem sido demonstrada por diversos trabalhos apresentados na literatura mundial. Este fungo, como todo organismo vivo, é afetado diretamente por fatores físico-químicos e biológicos do meio ambiente, fenômeno condicionante, na maioria das vezes, de habitats próprios e muito restritos às diferentes espécies de seres vivos. Nesta situação, observa-se que o *H. capsulatum* é afetado por animais, plantas e microorganismos com os quais se relaciona com seu habitat natural, o solo, além de também estar condicionado a certos fatores inanimados como a umidade, temperatura, tipo de solo e substratos nutritivos disponíveis. Devido a essa estreita relação entre o ambiente e o parasita, a presença deste em uma determinada área geográfica pode ser averiguada através de seu isolamento do solo, ar ou água ou pela busca de pessoas ou animais infectados, indicando um contato prévio ou atual com o agente infectante.

A demonstração de três espécimes animais naturalmente infectados capturados na serra do Rio da Prata indicou-nos a existência de focos de solo contaminado no local, os quais foram posteriormente demonstrados através da pesquisa do *H. capsulatum* em seu ambiente natural¹⁷. Este

resultado confirma o papel dos animais como marcadores geográficos da histoplasmose, permitindo, antes da realização de estudos das fontes de infecção e da população, a sugestão de que áreas que apresentam animais infectados sejam endêmicas de histoplasmose.

O isolamento do *H. capsulatum* de um roedor e dois marsupiais deve-se principalmente aos hábitos destes animais viverem em locais abrigados, como tocas e/ou ocos de árvores. O maior número de isolamento ocorrido nos marsupiais deve-se possivelmente ao fato destes animais não restringirem suas atividades a uma área particular, percorrendo grandes distâncias⁶, estando sujeitos, portanto, a maior contato com as fontes infectantes. Os roedores, por outro lado, têm seu habitat restrito normalmente às áreas peridomiciliares.

A análise conjunta dos resultados verificados através dos exames histopatológico e sorológico leva-nos a acreditar que a histoplasmose em animais silvestres desenvolve-se como uma infecção subclínica, mas sugere que testes diagnósticos mais sensíveis devam ser aplicados a estes estudos.

A reversibilidade da fase filamentosa à fase leveduriforme do *H. capsulatum* nas cepas isoladas foi difícil e laboriosa, corroborando dados da literatura mundial, indicando a necessidade de estudos mais aprofundados sobre os fatores participantes nesta reversão.

A presença de *H. capsulatum* em marsupiais tem sido freqüentemente demonstrada, principalmente em *Didelphis marsupialis*^{2, 10} e *Philander opossum*^{1, 5}, mas ainda não foi descrita em marsupiais do gênero *Metachirus*. A demonstração de dois *Metachirus opossum* naturalmente infectados registra uma nova espécie suscetível ao *H. capsulatum*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Libero Ajello pela identificação das cepas de *H. capsulatum*, ao Dr. Alexandre A. Alencar pela orientação nos estudos histopatológicos, ao Dr. Luis Edmundo Moojen pela classificação das espécies animais e ao Sr. Mauro de Medeiros Muniz pelo auxílio técnico.



In a survey of 103 sylvatic animals captured from Rio da Prata a rural area situated near the city of Rio de Janeiro, Histoplasma capsulatum was isolated from liver and spleen of one rat Rattus rattus and two marsupials Metachirus opossum, commonly known as cuíca. The infected animals did not show any clinical symptoms or histopathological

alterations. The fungus has not previously been reported in the marsupial's specie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJELLO, L. Comparative ecology of respiratory mycotic disease agents. *Bacteriol. Rev.*, 31 : 6-24, 1967.
2. EMMONS, C.W. Histoplasmosis: animal reservoirs and other sources in nature of the pathogenic fungus, *Histoplasma*. *Am. J. Publ. Health*, 40 : 436-40, 1950.
3. FERREIRA DA CRUZ, M.F. *A importância das técnicas de imunoprecipitação na triagem e no diagnóstico da paracoccidiodomicose, histoplasmose e aspergilose*. Estudo em população hospitalar do Rio de Janeiro, 1984. (Tese de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz).
4. GAUR, P.K. & LICHTWARDT, R.W. Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*, 18 : 105-14, 1980.
5. HOFF, G.L. & BIGLER, W.J. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J. Wildl. Dis.*, 17 : 191-6, 1981.
6. HUNSAKER II, D. Ecology of New World marsupials. In : THE BIOLOGY of marsupials. New York. *Academic Press*, 1977. p. 95-153.
7. MENGES, R.W. et alii Epidemiologic studies on histoplasmosis in Wild-life. *Environmental Research*, 1 : 129-44, 1967.
8. MENGES, R.W. et alii A review and recent findings on histoplasmosis in animals. *Vet. Med.*, 58 : 331-8, 1963.
9. MOOJEN, J. *Os roedores do Brasil*. Rio de Janeiro. Ministério da Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro, 1952. 214 p. (Biblioteca Científica Brasileira, série A.II).
10. NAIFF, R.D. et alii Distribution of *Histoplasma capsulatum* in Amazonian wildlife. *Mycopathologia*, 89 : 165-8, 1985.
11. OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reaction in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 26 : 507-17, 1949.
12. RIDDEL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*, 42 : 265-70, 1950.
13. ROWETT, H.G.Q. *Dissection Guides*. III - The rat with notes on the mouse. 3ª ed. London, John Murray, 1972. 64p.
14. SHACKLETTE, M.H. et alii *Histoplasma capsulatum* recovered from bat tissues. *Science*, 135 : 1135, 1962.
15. TAYLOR, R.L. & SHACKLETTE, M.H. Naturally acquired histoplasmosis in the mammals of the Panama Canal Zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 11 : 796-9, 1962.
16. WANKE, B. *Histoplasmose*. Estudo epidemiológico, clínico e experimental. Rio de Janeiro, 1985. (Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina UFRJ).
17. ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. *Histoplasmose*. Estudo epidemiológico em área periurbana do município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1985. (Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz).