

## MICROEPIDEMIA DE HISTOPLASMOSE NA ZONA RURAL DE BRASÍLIA - DF — 1967

### II — Estudos Epidemiológico e Parasitológico da Fonte de Infecção \*

Sydney Schmidt\*\*, Onofre Pereira Machado \*\*\* e  
Archibaldo Bello Galvão\*\*\*\*

*Neste trabalho são relatadas pesquisas parasitológicas e epidemiológicas realizadas numa provável fonte de infecção de Histoplasmosse da área rural do D.F. — Brasília, onde 14 pessoas contraíram a doença.*

*Os estudos clínico, imunológico e radiológico foram anteriormente descritos.*

*Os autores conseguiram isolar o H. capsulatum do solo da caverna e das vísceras e do sangue de morcegos (Phyllostomus hastatus hastatus, Pallas 1767) que nela habitavam.*

*Resultaram negativas as tentativas de isolamento do fungo de animais sentinelas (cobaios), assim como não se obteve neles a viragem dos testes intradérmicos com histoplasmina.*

*Em impressões de vísceras dos morcegos, constataram-se formas semelhantes as do T. gondii que posteriormente foram isoladas, em camundongos jovens, por inoculação de vísceras maceradas e sangue.*

*Foram encontrados 2 ectoparasitos nos morcegos: Boophilus microplus e um díptero da família Streblidae. O ácaro albergava tripomastigotos do tipo cruzi, não sendo porém conseguido seu isolamento.*

*No tubo digestivo dos quirópteros, foram retirados nematódeos (Histiotrongylus octacantus) e cestódeos do gênero Mathevotaenia.*

*Foram capturados, em torno da entrada da caverna, 2 exemplares de Cercomyx cunicularis apereioide não sendo examinados sob o ponto de vista parasitológico.*

*Testes intradérmicos realizados em 826 habitantes da área resultaram positivos em 184 (22,27%).*

*A gruta, fonte da infecção, está localizada em uma formação calcárea, pertencente à série Bambuí, acreditando-se, pelos aspectos tectônicos, ser da idade siluriana.*

*No Brasil, o isolamento de H. capsulatum de solo, guanos de morcegos e vísceras de roedores já tinham sido realizados; contudo, esta foi a primeira vez que se conseguiu isolá-lo do solo de uma caverna, fonte de infecção, e das vísceras e sangue de morcegos.*

*Os resultados obtidos com os testes intradérmicos com histoplasmina demonstraram a prevalência de histoplasmosse na área rural do DF e, conseqüentemente, a possibilidade de ocorrerem outra microepidemia ou aparecimento de casos isolados de histoplasmosse-doença.*

\* Trabalho realizado no Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás com auxílio financeiro do Instituto Oswaldo Cruz.

\*\* Professor Contratado do Departamento de Medicina Preventiva.

\*\*\* Professor Assistente do Departamento de Microbiologia.

\*\*\*\* Professor Contratado do Departamento de Parasitologia.

Recebido para publicação em 20.1.1973

## INTRODUÇÃO

Na parte I foram relatados os dados clínicos, imunológicos e radiológicos dos 14 pacientes que se infectaram na gruta da PERCAL em julho de 1967 (18).

A viragem da intradermo-reação com histoplasmina e a positividade da prova de precipitação em placa de Agar-Gel em 8 pacientes cumpriram critérios para o estabelecimento do diagnóstico definitivo da Doença de Darling nesta microepidemia.

Compreendendo que as formas do fungo encontradas nos cortes de escarro de um dos pacientes (extra-celulares ainda não adaptadas aos tecidos) não são as compendiadas e, por este motivo, talvez pudessem suscitar dúvidas — visto que, daquele material, não se conseguiu isolar o *Histoplasma capsulatum* quer pelos cultivos ou inoculações — os autores resolveram proceder ao estudo da provável fonte de infecção.

## MATERIAL E MÉTODOS

### I — Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo da caverna.

Empregou-se o método de flutuação dos esporos (16). Com tal procedimento, de 15 amostras colhidas, semearam-se 15 placas, inoculando-se 30 camundongos por via intraperitoneal e 15 cobaias por via testicular.

As placas foram colocadas à temperatura ambiente e examinadas a partir do segundo dia. Os animais que sobreviveram foram sacrificados entre as 4ª e 8ª semanas, retirando-se deles fragmentos de fígado, baço, pulmão e testículos que foram semeados em tubos de Agar-Sabouraud-Antibiótico e tubos com BHI + Antibióticos. Em cada tubo, inocularam-se 3 fragmentos de cada órgão em separado. Os tubos de Agar-Sabouraud foram deixados à temperatura ambiente e os BHI a 37°C.

Fragmentos dos diversos órgãos retirados foram incluídos em parafina e corados pela HE, Methenamina de prata e PAS.

### II — Isolamento de *Histoplasma capsulatum* das vísceras e do sangue de morcego, capturados dentro da caverna.

A captura dos morcegos foi feita com uma rede de malhas finas, em cujo arco se colocaram 2 varas de 3 metros de comprimento, para alcançá-los no teto da caverna; as capturas foram realizadas entre 15 e 18 horas, durante o mês de agosto de 1967.

Os exemplares capturados eram colocados em uma gaiola de arame e alimentados com frutas até 24 horas antes de serem sacrificados. Imobilizados sobre uma placa de cortiça, desinfetava-se a parede anterior do tórax com mertiolate e punccionava-se o coração com agulha 20x8.

Cerca de 5 ml de sangue retirados pela punção eram utilizados na sementeira em BHI, Agar-Sabouraud e na confecção de 2 gotas espessas e 4 esfregaços. Os meios de cultura foram colocados a 37°C (BHI) e à temperatura ambiente (Sabouraud). As lâminas foram coradas pelo corante de Giemsa.

Morto o exemplar, abriam-se as cavidades abdominal e torácica e delas se retirava o baço, o fígado e os pulmões, que eram separados em duas partes: uma colocada imediatamente dentro de uma solução antisséptica de superfície (Cloramina a 5%) e a outra, que seria usada para o estudo de alterações histológicas antes de colocada em solução de formol 10%, era também utilizada para a confecção de impressões em lâminas.

A parte que estava imersa em solução de cloramina era levada à câmara assética, separada em fragmentos menores, colocados em tubos de cultura de BHI e Sabouraud com antibióticos (20 unidades de penicilina + 40 unidades de estreptomina por ml.), conservando-se os mesmos em estufas a 37°C (BHI) ou à temperatura ambiente (Sabouraud).

Todos os tubos foram examinados a partir do primeiro dia; os que apresentaram contaminação eram mantidos em separado, até que todo recipiente fosse tomado pelo contaminante. O total de tubos semeados foi de 208, sendo 104 em BHI e 104 em Sabouraud.

O material incluído foi corado por He, P.A.S. e Methenamina de prata. Esta série de morcegos recebeu a sigla "M".

### III — Colocação de animais sentinelas.

Utilizaram-se 15 cobaios nos quais se praticaram injeções intradérmicas com histoplasmina diluída a 1% (cepa I.O.C. 237) e cujas leituras após 72 horas e até 30 dias posteriores não apresentaram sinais de reação. Dividiu-se o total em 3 lotes de 4 e 1 de 30 cobaios. O primeiro lote foi colocado dentro da caverna durante 24 horas em gaiolas de arame separadas uma das outras por uma distância de 10 passos a partir da entrada; o 2º e 3º lotes foram colocados da mesma maneira com período de 48 e 72 horas respectivamente. Todos os animais receberam água e alimentos durante a exposição. A colocação das sentinelas foi feita no mês de janeiro de 1969.

Após a permanência na caverna, os animais se submeteram a novos testes cutâneos assim como 1 do 4º lote que servira como testemunha, após 21, 30 e 45 dias. No 48º dia foram sacrificados para o estudo micológico.

### IV — Pesquisa de ecto e endoparasitos nos morcegos capturados.

Constou do exame a fresco, confecção de gotas espessas e esfregaços, assim como da inoculação do sangue do animal em camundongos. No tubo digestivo, procuraram-se helmintos adultos, após abertura e exposição do seu conteúdo em placa contendo água morna. De todas as vísceras fizeram-se impressões. Todo o material foi corado pelo Giemsa.

### V — Captura de animais em torno da caverna.

Foram colocadas armadilhas com iscas de carnes e frutas para animais silvestres de pequeno e médio portes. Programou-se estudo parasitológico idêntico ao item anterior.

### VI — Inquérito de sensibilidade cutânea à histoplasmina em moradores da região.

Empregaram-se 850 doses em habitantes de 11 localidades rurais. As idades das

pessoas testadas variaram de menos de um ano até mais de 50 anos. Dados pessoais, incluindo tempo de residência, foram anotados no momento do teste; não houve preocupação quanto à atividade desenvolvida. A histoplasmina utilizada foi preparada de cepa I.O.C. 237 e diluída a 1/100. Aplicou-se 0,1 ml em injeção intradérmica, no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. Utilizou-se seringa *Microstat Tuberculin, USA*, com êmbolo de metal e agulhas de meia polegada *Unicef* nº 26. As leituras foram realizadas 72 horas depois da aplicação do antígeno, com auxílio de uma régua milimetrada e transparente do SNT, delimitando-se por palpação, a zona endurecida e medindo-se em seu maior diâmetro. Foram considerados positivos aqueles testes que resultaram numa zona de endurecimento igual ou superior a 5 mm.

## RESULTADOS

Todos os morcegos examinados eram machos de *Phyllostomus hastatus hastatus*, (Pallas, 1767),

### I — Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo da caverna.

As placas semeadas diretamente com amostras de solo apresentaram-se contaminadas a partir do 2º dia de semeadura e foram desprezadas após o 6º dia.

Dos 30 camundongos inoculados, por via intraperitoneal, 17 morreram dentro da 1ª semana; alguns, logo após a inoculação.

O estudo histológico não se mostrou positivo em nenhum dos fragmentos examinados.

A semeadura de um fragmento de baço positivou-se a partir do 18º dia em meio de Agar-Sabouraud.

Dos 15 cobaios inoculados por via testicular, nenhum demonstrou alterações histológicas ou a presença de *Histoplasma capsulatum*; contudo, um macerado de testículos semeado em Agar-Sabouraud, revelou crescimento do *Histoplasma capsulatum*.

II — *Isolamento de Histoplasma capsulatum das vísceras e do sangue de morcegos capturados dentro da caverna.*

para *Histoplasma capsulatum*, sendo 18 com culturas levediformes (8,65%) e 16 de culturas filamentosas (7,69%), conforme o quadro abaixo:

Resultaram positivos 34 tubos (16,34%)

QUADRO I

MORCEGO Nº	FASES DE CULTURA											
	BAÇO			FÍGADO			PULMÃO			SANGUE		
	L	F	LF	L	F	LF	L	F	LF	L	F	LF
M08 .....			+									
M09 .....		+										
M10 .....	+											
M11 .....	+											
M12 .....			+			+			+			
M13 .....			+			+			+			
M14 .....												
M15 .....	+				+					+		
M16 .....	+							+				
M17 .....					+							
M19 .....				+				+			+	
M20 .....								+				
M21 .....	+				+			+				
M23 .....	+				+				+			

Da cultura de M 19 inoculou-se 0,5 ml em testículos de cobaio

### III — Colocação de animais sentinelas

Do 3º lote, 2 animais foram retirados mortos sem que pudéssemos identificar a causa.

Os testes intradérmicos posteriores foram negativos; as sementeiras dos fragmentos de vísceras não deram crescimento a fungos, após 30 dias de observação.

### IV — Pesquisa de ecto e endoparasitos nos morcegos capturados.

a) Em impressões de vísceras verificou-se a presença de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceau 1909); posteriormente,

isolou-se este patógeno em camundongos recém-nascidos que foram inoculados com macerados das vísceras. A cepa isolada é mantida nos laboratórios do IPT e reações de Sabin-Feldman realizadas com ela dão títulos idênticos aos da cepa oriunda do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

b) Formas tripomastigotas foram encontradas em esfregaços; contudo, não foram isoladas.

c) Foram encontrados dois ectoparasitos nos morcegos: *Boophilus microplus* (Canestrini, 1890) e um díptero da família *Streblidae*. O ácaro albergava tripomastigotos do tipo *T. cruzi* (Chagas, 1909) não

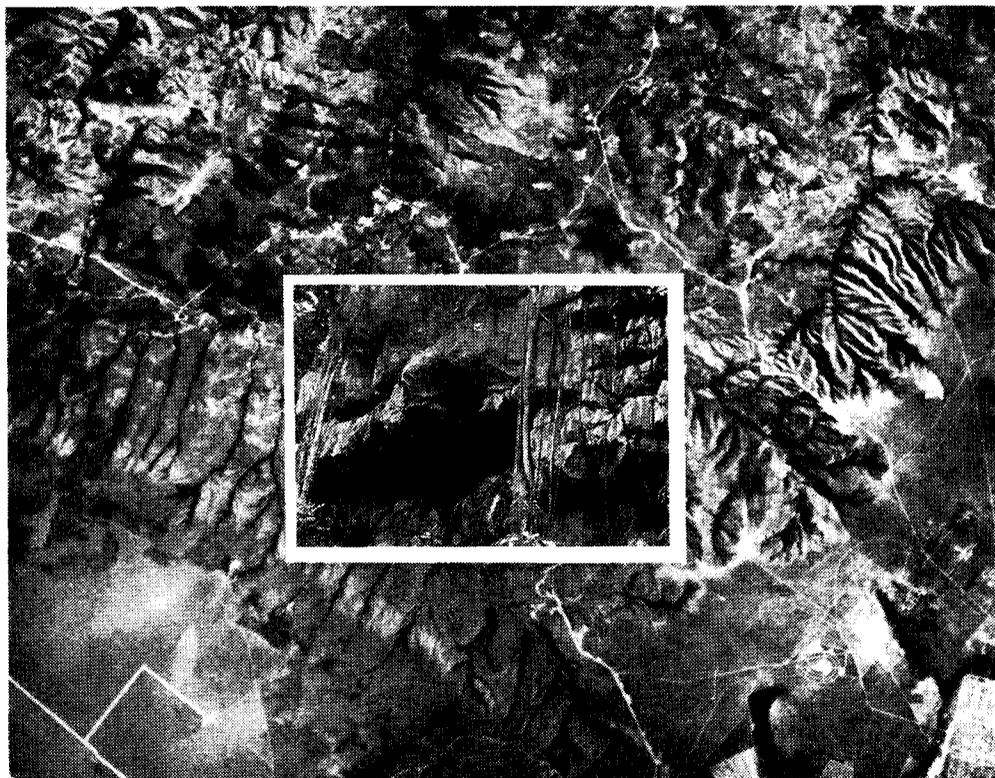


Fig. 1 — Local onde se situa a gruta de cujo solo foi isolado o *H. capsulatum*.

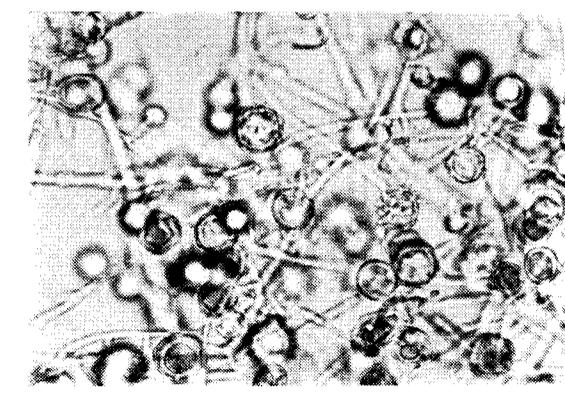
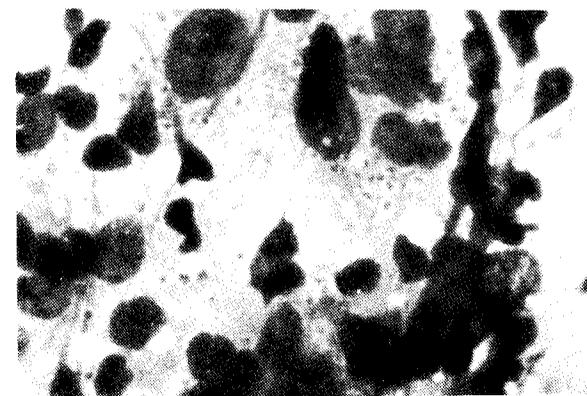
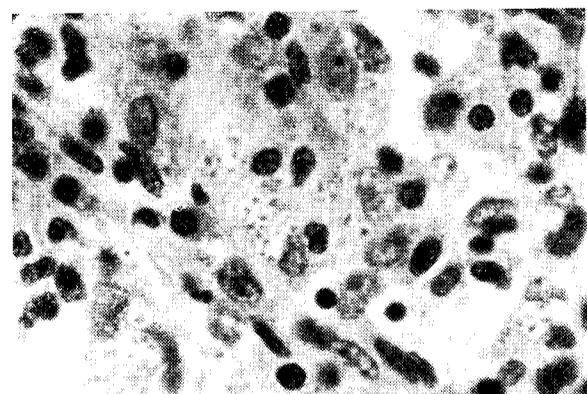


Fig. 2 — Aspectos do fungo em tecido e em cultura.

sendo, entretanto, tentado o isolamento dessas formas.

d) Foram identificados um nematódeo, o *Histioglytus octacantus* (Lent & Freitas, 1940) e cestódeos do gênero *Mathevo-taenia*.

#### V — Captura de animais em torno da caverna.

Em armadilhas com isca de frutas, foram capturados 2 exemplares de *Cercomys cunicularis apereioide*; sacrificados sem a nossa presença, perdeu-se o material para os exames programados.

#### VI — Inquérito de sensibilidade cutânea à histoplasmina em moradores da região

Foram conferidos 826 testes (96,47%) dos quais 184 (22,37%) se mostraram positivos, sendo 114 (13,80%) para o sexo masculino e 70 (8,47%) para o feminino.

#### DISCUSSÃO

1) A gruta objeto do presente estudo está localizada em uma formação calcárea pertencente à série Bambuí.

2) O isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo foi conseguido pela primeira vez no Brasil por Manuel Eugênio da Silva, em 1956 (22), trabalhando com amostras colhidas na cidade de Jacobina, no Estado da Bahia; o solo utilizado foi do interior e vizinhanças de um galinheiro. Em 1966, Fava Neto e col. (10) o isolaram de guanos de morcegos, colhidos em uma casa de veraneio do litoral norte de São Paulo, onde se infectaram 8 pessoas.

Relacionado com o solo de caverna, este é o primeiro isolamento de *Histoplasma capsulatum* relatado no Brasil. De outros países, existem numerosos trabalhos constatando o mesmo fato (3, 8, 14, 16, 17, 20).

3) O fato apresentado pelos autores citados e por nós agora comprovado, vem demonstrar que o *Histoplasma capsulatum* não se desenvolve somente em solos contaminados por fezes de morcegos mas, também, serve-se deles, da mesma forma como se serve de outros animais (4, 6, 7, 9, 11, 12, 19), isto é, como reservatório.

No Brasil, Manuel Eugênio da Silva (21) isolou o *Histoplasma capsulatum* de *Rattus norvegicus* da cidade de Salvador, Bahia, em 1956.

4) Os índices de infecção levantados no Brasil, de 1949 a 1967, variam entre 2,4% e 43,4% (13,23). É difícil estabelecer-se comparação, quando a procedência e a titulação dos antígenos, bem como as amostras escolhidas e a região estudada são diversas. Contudo, se considerarmos que quanto mais perto da linha do Equador, mais altos são os índices de infecção (5), nossos resultados são concordantes com os demais realizados, exceto talvez, com os encontrados em Goiânia (2).

Acreditamos que entre os reatores positivos por nós detectados, existem casos também de infecção por *P. brasiliensis*, pois é possível haver reação cruzada entre pacientes de blastomicose sulamericana e histoplasmoses (1); porém não se pode afastar a possibilidade de serem esses indivíduos portadores das duas infecções.

Os resultados obtidos demonstraram a prevalência da forma de histoplasmoses-infecção, na região do DF e, conseqüentemente, a possibilidade de ocorrerem outras microepidemias, como a de 1957 ou aparecimento de casos isolados de histoplasmoses-doença.

5) Muitas teorias tentam explicar a maior prevalência da Histoplasmoses em áreas bem delimitadas assim como a disseminação do seu agente etiológico para outras áreas onde, em determinadas épocas, surgem surtos epidêmicos. Todos particularizam como mais importante, um ou mais fatores.

Compreendemos que um biótopo é um complexo de fatores ecológicos que são verdadeiramente essenciais. Deste modo, não podemos analisá-los separadamente. Contudo, referindo-se à disseminação do agente etiológico, alguns fatores não estáticos, como os ventos e cursos d'água podem ser considerados separadamente.

O *Histoplasma capsulatum* cresce no solo saprofiticamente em natureza; seus esporos livres são introduzidos no organismo por inalação ou ingestão. Desde que flutuam, podem, evidentemente, ser levados a grandes distâncias passivamente e, se nas áreas onde foram depositados houver acomodações favoráveis entre eles e o substrato, novos focos surgirão.

Pelo fato de quirópteros se infectarem e, além disso, ser a composição química do seu conteúdo intestinal rica em substância que favorece o crescimento do *Histoplasma capsulatum* no solo, sua importância epidemiológica deve ser enfatizada na detecção das fontes de infecção.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Professores Lauri Bez e Valter Fonseca pelo estudo

geológico da Gruta; Gilberto de Freitas e Gilberto Santa Rosa pelo apoio e sugestões; Maria Alves Queiroz dos Santos e Adriano L. Perachi pelas classificações dos helmintos e dos morcegos; William Barbosa, Diretor do Instituto de Patologia Tropical, pela orientação na interpretação dos resultados das provas realizadas. Aos técnicos Luiz Morato, Enia Vilela e Livia Marques Carvalho, que ajudaram na coleta do material, confecção dos cortes histológicos e captura dos animais.

#### SUMMARY

*Parasitological and epidemiological studies were done in a rural area on histoplasmosis, in Brasilia, D.F. where 14 persons had the disease.*

*The clinical, imunological and radiologic studies were reported in a previous paper. The isolation of H. capsulatum from soil of cave, viscera and blood from bats (Phyllostomus hastatus hastatus) were performed. The isolation of fungi from sentinel animals was negative as well the turn-over of intradermic tests of hystoplasmin carried out previously.*

*Similar forms of T. gondii were observed in "printers" of viscera and subsequent isolation was made by inoculation of viscera macerate and blood, in young mice.*

*Two ectoparasites were found in bats: Boophilus microplus and one diptera from the family Streblidae. In the acaro were found trypomastigotes; however this forms was not isolated.*

*Nematodes (Histiostrongylus octacantus) and Cestodes from the Mathevo-taenia genus were found in the digestive tract of Chyroptera.*

*Two specimens from Cercomys cunicularis apereioide were captured near of cave but no parasitological studies were done.*

*Intradermic test made in 826 peoples in the area gave 184 positives results (22,27%).*

*The cave where the infection occurred is a calcareous formation Bambui type that seems to be from Silurian period based in tectonics aspects.*

*The isolation of H. capsulatum from soil of Brazil, guanos, bats and viscera of rodents was done before. However this is the first time that the isolation of H. capsulatum was made from a cave-source of infection from viscera and from blood of bats.*

*The intradermic tests with hystoplasmin shows the prevalence of hystoplasmosis infection in rural area of Federal District and we point out the possibility of the occurrence of another micro-epidemy and isolated case of hystoplasmosis disease.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S.; MONTEIRO, E. L.; GUSMÃO, H. H.; BRANDÃO, C.; MOURA, R. A. — Alergo-reação Histoplasmática em estudantes de medicina. Rev. Paul. Med., 38: 578-579, 1951.
2. BARBOSA, W. — Blastomicose sul americana; contribuição ao seu estudo no Estado de Goiás. Tese de livre docência para a UFGO, 1968.
3. CAMPINS, H.; ZUBILLAGA, Z. C.; GOMES; LOPEZ, L. & DORANTE, M. — Estudio de una epidemia de histoplasmosis en el Estado Lara, Venezuela. Gaz. Med. Caracas, 62: 85-109, 1955.

4. DIERCKS, F. M.; SHACKLETTE, M. H.; KELLEY, H. B.; JR. KLITE, P. D. THOMPSON, S. W. II & KENNAN, C. M. — Naturally occurring histoplasmosis among 935 bats collected in Panama and the Canal Zone, July, 1961 — Feb. 1963. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 1069-1072, 1965.
5. EDWARD, P. Q. & KLAER, J. H. — World wide geographical distribution of histoplasmosis and sensitivity. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 15: 359-363, 1952.
6. EMMONS, C. W. — Histoplasmosis in Animals — Transactions of New York — Academy of sciences. Série II, vol. 2: 248-254, May, 1949.
7. EMMONS, C. W. — Association of bats with histoplasmosis. *Pub. Health Rept.* 73: 590-595, 1958.
8. EMMONS, C. W. — Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil in Washington, D.C. *Publ. Health Rep. (Wash.)* 76: 591-596, 1961.
9. EMMONS, C. W.; KLITE, P. D.; BAER, G. M. & HILL, W. P. — Isolation of *H. capsulatum* from bats in United States. *Am. J. Epid.*, 84: 103-109, 1966.
10. FAVA NETO, C.; SILVA, V. DE A.; CHAMMAS, F. & LACAZ, C. S. — Histoplasmosse Epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9: 222-232, 1967.
11. KLITE, P. D. and DIERCKS, F. H. — *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the Canal Zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14: 433-439, 1965.
12. KLITE, P. D. — Isolation of *H. capsulatum* from bats of El Salvador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14: 787-788, 1965.
13. LACAZ, C. S. — Compêndio de Micologia Médica, pág. 239. Sarvier. Ed. da Un. de São Paulo, 1967.
14. LAZARUS, A. S. & AJELLO, L. — Aislamiento *Histoplasma capsulatum* del suelo de una cueva en el Peru. *Rev. Med. Exper. (Lima)*, 9: 5-15, 1955.
15. MARINKELLE, C. J. & GROSE, E. — *Histoplasma capsulatum* from liver of a bat in Colombia, *Science*, 147: 1039, 1965.
16. MONTEMAYOR, L.; HEREDIA OSIO, B. & BELLARD PIETRI, E. P. — Aislamiento del *Histoplasma capsulatum* en el suelo de duas cavernas en Venezuela. *Rev. Sanid. Assist. Soc.* 23, 39-54, 1958.
17. MURRAY, J. F.; LURIE, H. I.; KAIE, J.; KOMINS, G.; BOROK, R. & WAY, M. — Benign pulmonary histoplasmosis (cave disease) in South Africa. *S. Afr. Med. J.* 31: 245-253, 1957.
18. SCHMIDT, S.; PEREIRA, O. M.; BARBOSA, M. P. & BRENNER, F. G. — Microepidemia de Histoplasmosse na zona rural de Brasília - DF. Parte I. Estudos clínico, radiológico e imunológico. *Rev. Serv. Nac. Tuberc. in press*, 1971.
19. SHACKLETTE, M. H.; DIERCKS, F. H. and GALE, M. B. — *Histoplasma capsulatum* recovered from bat risues. *Science*, 135: 1135, 1962.
20. SHACKLETTE, M. H.; HASENCLEVER, H. F. & MIRANDA, E. A. — The natural occurrence of *Histoplasma capsulatum* in a cave. *Ecology aspects.* *Am. J. Epidemio.*, 86: 246-252, 1967.
21. SILVA, M. E. & PAULO, LUIZA A. — Infecção natural de ratos pelo *Histoplasma capsulatum* na cidade de Salvador, Bahia, *Bol. Fund. Gonçalo Moniz*, nº 9, Jan., 1956.
22. SILVA, M. E. — Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo, em zona endêmica de Calazar na Bahia. *Bol. Fund. Gonçalo Moniz* nº 10, nov. 1956.
23. TESH, R. and MARQUES, R. J. — *Histoplasma* sensitivity in Brazil. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 5: 235-257, 1966.