



## PESQUISA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* E *HISTOPLASMA CAPSULATUM* NA GRUTA LAGO AZUL, BONITO - MS

Célia Cristina de REZENDE \*; Dulcilene Carvalho DUARTE \*\*;  
Wander Fernando de Oliveira FILIÚ \*\*\*  
\* - CECAV/MS; \*\* - UCDB; \*\*\* - UFMS

### RESUMO

Foram analisadas 24 amostras constituídas de material orgânico da ordem dos quirópteros (morcego), a fim de verificar a presença de fungos patogênicos *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Para isolamento de *C. neoformans* as amostras foram semeadas no agar Níger e para isolamento do *H. capsulatum* foram inoculados suspensão de amostras diluídas em solução fisiológica estéril, em camundongos machos de 20 a 30g e sacrificados após 54 dias. Fragmentos do fígado e baço foram semeados no Agar Sabouraud. Não houve crescimento do *C. neoformans* e o *H. capsulatum* foi identificado em duas amostras.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, Criptococose, *Histoplasma capsulatum*, Histoplasmose., Gruta do Lago Azul.

### INTRODUÇÃO

O *Cryptococcus neoformans* é um fungo leveduriforme, capsulado, apresenta duas variedades *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipos A, D e AD, encontrado geralmente em solos contaminados com fezes de pombo (*Columbia livia*) e *neoformans* var. *gatti*, sorotipos B e C, sendo que seu habitat natural é provavelmente de origem vegetal e tem sido correlacionado com *Eucalyptus camaldulensis*<sup>3</sup>.

O *Histoplasma capsulatum* é fungo dimórfico, apresenta duas variedades, o *H. capsulatum* var. *capsulatum* e o *H. capsulatum* var. *duboisii*, sendo a primeira de distribuição universal<sup>12</sup>, sua forma é filamentosa em temperatura inferior a 30°C, composta de hifas hialinas, microconídios e macroconídios, quando cultivado em meio seletivo como Agar Sabouraud a 37°C, apresenta-se como pequenos elementos levedunformes, unibrotante<sup>2</sup>.

Estes fungos têm sido encontrados em fezes de aves e morcegos<sup>12</sup>. A infecção se dá através da inalação de propágulos aerossolizados<sup>7,9</sup>, sendo a porta de entrada da infecção a via pulmonar, onde o microorganismo pode causar infecções assintomática e sintomática, podendo ocorrer disseminação hematogênica para outros órgãos<sup>2,10</sup>.

No hospedeiro saudável, a infecção evolui para cura espontânea, em geral assintomática ou com sintomas inespecíficos<sup>2</sup>. A principal defesa é um sistema imunológico celular intacto, tendo macrófagos, células natural Killer (NK), neutrófilos e linfócitos como elementos de defesa primários importantes contra o fungo<sup>4</sup>.

O *C. neoformans* e o *H. capsulatum* surgem como patógenos oportunistas e emergentes em pacientes imunodeprimidos como, transplantados, leucêmicos, usuários de antibióticos, corticóides e principalmente em pacientes que desenvolvem a Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)<sup>6</sup>.



# ANAIS

## XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia

Januária MG, 04-14 de julho de 2003

Sociedade Brasileira de Espeleologia



A Gruta do Lago Azul está localizada no Município de Bonito a 312 Km da Capital (Campo Grande), sendo a gruta turística mais importante do Estado de Mato Grosso do Sul, que no ano de 2001, recebeu 45.996 visitantes<sup>1</sup>.

O objetivo principal desta pesquisa foi identificar as fontes ambientais de infecções fúngicas no local.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 24 amostras de fezes de morcego em 03 salões da Gruta do Lago Azul denominados: Salão dos Corais, Visão do Sol e Salão dos Morcegos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, identificadas e refrigeradas até o processamento.

Foi pesado em balança eletrônica 1,0 grama de cada amostra e colocado em erlenmeyer esterelizado, adicionando 20 mL de solução fisiológica, e agitado vigorosamente em Vortex por 5 minutos, deixando em repouso por 30 minutos para decantar os resíduos e permitir a flutuação dos elementos fúngicos. Com seringa estéril de 1,0 mL foi aspirado o sobrenadante e semeado em placa de Petri de 15 cm de diâmetro (5 placas de Petri por amostra) contendo agar Niger (NSA), acrescido de 0,6 g/L de clorafenicol e 0,8 g/L de amicacina e mantidas a 26 e 28.5°C para isolamento do *C. neoformans*.

Para isolamento do *H. capsulatum* foi inoculado 1,0 mL na região abdominal (0,5 mL lado direito e 0,5 mL lado esquerdo) via intradérmica de uma suspensão amostra diluída em solução fisiológica estéril, acrescida de 0,5 g/L de clorafenicol, em 49 camundongos machos de 20 a 30 gramas e após 54 dias os animais foram sacrificados, necropsiados e os fragmentos do fígado e baço foram triturados e semeados no agar Sabouraud para cultivo da fase filamentosa (temperatura ambiente) e leveduriforme (37°C).

### RESULTADOS

Após sete dias de incubação no meio NSA, não foi observado crescimento do *C. neoformans*, porém, foram identificados fungos filamentosos com características morfológicas fúngicas conforme Atlas de Larone<sup>8</sup> (1987) tabela 1.

Após 15 dias de incubação à temperatura ambiente foram identificados *Histoplasma capsulatum* nas amostras 15 (fragmentos de fígado) e 16 (fragmentos de baço), através de observação microscópica e morfologia fúngica, conforme tabela 2. Não houve alteração no comportamento como prostração ou inapetência dos camundongos inoculados. Foi observado alopecia nas amostras 3, 7, 8, 10, 15 e 16, e inchaço na região lombar no camundongo da amostra 8, e durante necropsia notou-se abscesso no fígado e aumento de volume do baço.



ANAIS  
XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia  
Januária MG, 04-14 de julho de 2003



Sociedade Brasileira de Espeleologia

Amostras	Local	Fungos isolados
01	Salão dos Morcegos	<i>Verticillium</i> sp, <i>Mucor</i> sp, <i>Acremonium</i> sp, <i>Fusarium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp.
02	Salão dos Morcegos	<i>Verticillium</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp, <i>Mucor</i> sp.
03	Salão dos Morcegos	<i>Penicillium</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp, <i>Scopulariopsis</i> sp.
04	Salão dos Morcegos	<i>Penicillium</i> sp, <i>Scopulariopsis</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp.
05	Salão dos Morcegos	<i>Fusarium</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp.
06	Salão dos Morcegos	<i>Fusarium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp.
07	Salão dos Morcegos	<i>Mucor</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp.
08	Salão dos Corais	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp.
09	Salão dos Corais	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp.
10	Salão dos Corais	<i>Penicillium</i> sp.
11	Salão dos Corais	<i>Fusarium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp.
12	Salão dos Corais	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Mucor</i> sp.
13	Salão dos Corais	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp.
14	Salão dos Corais	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Mucor</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp.
15	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp.
16	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Mucor</i> sp.
17	Salão Visão do Sol	<i>Penicillium</i> sp.
18	Salão Visão do Sol	<i>Fusarium</i> sp, <i>Penicillium</i> sp.
19	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp.
20	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp.
21	Salão Visão do Sol	<i>Penicillium</i> sp, <i>Mucor</i> sp.
22	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp.
23	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp.
24	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp.

Tabela 1 - Distribuição de fungos isolados de fezes de morcego, cultivados em meio NSA, coletados na Gruta do Lago Azul, Bonito-MS, em setembro 2001.

Amostras	Local	Fungos isolados
03	Salão Morcegos	<i>Penicillium</i> sp
07	Salão dos Morcegos	<i>Penicillium</i> sp
08	Salão dos Corais	<i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp
10	Salão dos Corais	<i>Aspergillus</i> sp
15	Salão Visão do Sol	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Histoplasma capsulatum</i>
18	Salão Visão do Sol	<i>Histoplasma capsulatum</i>

Tabela 2 - Fungos isolados de fragmentos de fígado e baço, cultivados em Agar Sabouraud, após inoculação em camundongos machos de 20 a 30 gramas, com material coletado na Gruta do Lago Azul, Bonito-MS, em setembro 2001.



# ANAIS

## XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia

Januária MG, 04-14 de julho de 2003

Sociedade Brasileira de Espeleologia



### DISCUSSÃO

As Grutas são uma fonte comum de infecção aos homens e animais, e os quirópteros parecem participar ativamente no eido epidemiológico, porque são susceptíveis à infecção, podendo disseminar o fungo de um local a outro<sup>13</sup>.

Diversos trabalhos apresentados demonstram estreita relação entre o *H. Capsulatum* e *C. neoformans* a um determinado ambiente como: cavernas, casas abandonadas, ocos de árvores e, a prevalência destes fungos está diretamente ligada às condições de temperatura, umidade e pH do meio ambiente<sup>7,14</sup>. A negatividade das amostras quanto à identificação de *C. neoformans* pode ser relacionada à temperatura e umidade, tendo em vista, que a temperatura medida através do termohigrógrafo nos salões pesquisados ficou entre 25 a 27.6°C e a umidade de 77 a 92%, e pH alcalino devido à presença de CaCos. A sobrevivência do *C. neoformans* deve-se a metabolização de nitrogênio de baixo peso molecular, excreta dessecada e capacidade de crescer a 37°C<sup>5</sup>.

O *Histoplasma capsulatum* foi observado em duas amostras de um mesmo salão, que pode estar associada à umidade relativa elevada e temperatura entre 25° e 27.6°C, características que 5 favorecem o crescimento deste fungo . Apesar da baixa positividade, ressalta-se, pelo fato do fungo provocar infecção sistêmica, e o salão estar próximo a trilha percorrida pelos turistas.

Os fungos estão associados diretamente a saúde pública. Cury<sup>6</sup> relata um surto de histoplasmose, na cidade de São Leopoldo-MG, onde quatro indivíduos entraram em uma caverna, habitada por morcegos, após diagnóstico sorológico foi constatado um quadro de infecção primária, a progressão da doença foi evitada através do medicamento cetoconazol.

Das 24 amostras isoladas, foram observados os predomínios dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo identificadas 19 amostras (79,16%), como *Aspergillus* sp e 15 amostras (62,5%) como *Penicillium* sp. Estes gêneros são de distribuição universal, seus esporos disseminados por via aérea podem causar infecções pulmonares, geralmente diagnosticados em indivíduos imunodeprimidos<sup>10,11</sup>.

O turismo é a atividade mais importante do Município de Bonito, e a gruta do Lago Azul tem uma grande função social, gerando oportunidade de trabalho para a comunidade. A visitação na gruta está aumentando gradativamente, e com isto, aumenta a probabilidade de infecção em indivíduos imunodeprimidos. Os salões pesquisados na Gruta do Lago Azul não são visitados pelos turistas, porém, os esporos infectantes do *H. capsulatum*, *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp podem ser carregados pelo ar a longas distâncias.

Esta pesquisa mostra as fontes ambientais infectantes existentes na Gruta do Lago Azul e, ressalta que compreendendo o processo dinâmico que envolve a ecologia do agente infeccioso e a resposta celular do hospedeiro seja um ponto de partida para o controle da infecção, pois, quando a imunidade celular age adequadamente a infecção regride para cura espontânea.

Em indivíduos normais o risco de infecção é muito pequeno e, como não há vacina disponível a prevenção deverá ser, instruir as agências de turismo e guias sobre o perigo da exposição a estes agentes patogênicos, principalmente para pessoas imunodeprimidas, transplantados, aidéticos e usuárias de antibióticos e corticóides.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-BOGGIANI, P.C. **Plano de Manejo e Avaliação do Impacto Ambiental da Visitação Turística das Grutas do Lago Azul e N.S. Aparecida.** Bonito-MS. p. 45-49, 1999.



ANAIS  
XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia

Januária MG, 04-14 de julho de 2003

Sociedade Brasileira de Espeleologia



- 2-BROOKS G; BUTEL J; MORSE S. **Microbiologia Médica**, Guanabara, Rio de Janeiro, p. 435, 2000.
- 3-CORRÊA MPS. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, 32(5): 505-508, set-out, 1999.
- 4-COTRAN RS, KUNAR V, COILINS T. **Patologia Estrutural e Funcional**, Guanabara, Rio de Janeiro, p. 263, 2000.
- 5-CURKIER A, NAKATANI J. **Pneumologia-Atualização e Reciclagem**, Atheneu, São Paulo, p. 249-264, 1997.
- 6-CURY GC. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 34(5): 483-486, set-out, 2001. 2001.
- 7- FILIÚ WFO. **Cryptococcus neoformans de origem saprofítica da cidade de Campo Grande-MS**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Fundação Oswaldo Cruz, RJ, 2000.
- 8-LARONE DH. **Guidé to identification**, Elsevier Science Publishers, New York-London, 1987.
- 9-NETO RP, GUIMARÃES MC, MOYA MJ, OLIVEIRA FR, JÚNIOR PL, MARTINEZ R. Hypogamaglobulemia como fator de risco para infecção por *Cryptococcus neoformans*: a propósito de dois casos. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, 33(6): 603-608, nov-dez, 2000.
- 10-NUFÍO CG, ALFONSO PPP, RODRIGUEZ V, GÓMEZ MMR, PRATS IP, GONZÁIEZ JG. A propósito de las micosis pulmonares. **ACTA Médica** 2000;9(1-2):59-66.
- 11-OLIVEIRA LCL, ARANTES AÃ, CAIUBY MJM. Utilidade da investigação rotineira de infecção fúngica pela broncoscopia em pacientes infectados ou não pelo HIV em um hospital geral, referência para SIDA. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, 32(3): 255-261, mai-jun, 1999.
- 12-THIAGO PTS, SANTOS JL, STEINDEL M. Histoplasmose em região de palato duro simulando lesão causada por Leishmania. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, 31(2): 225-229, mar-abr, 1998.
- 13-ZANCOPE OR. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no Município do Rio de Janeiro. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 2 (1): 42-52,1986.
- 14-\_\_\_\_\_ Rosely. Distribuição das Fontes de Infecção do *Histoplasma capsulatum* Var. *capsulatum* em Rio da Prata, Município do Rio de Janeiro. **Revista do Instituto Medicina Tropical**, São Paulo 29 (4): 243-250, 1987.