

## PRIMEIRO ISOLAMENTO DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM* DE SOLO EM MINAS GERAIS

Fausto Gonçalves de ARAUJO (1)

### RESUMO

Descreve-se o isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo de galinheiro proveniente de ambiente rural do Distrito de Fidalgo, Município de Lagôa Santa, Estado de Minas Gerais. A identificação do fungo baseou-se principalmente em estruturas morfológicas observadas em culturas. A 37°C evidenciou-se as formas em leveduras, e em temperatura ambiente os clamidósporos tuberculados típicos de *Histoplasma capsulatum* foram claramente demonstrados.

A técnica utilizada foi a de inoculação de terra, via intraperitoneal, em camundongos e posterior cultivo de baço e fígado dos mesmos em meios próprios.

Indivíduos residentes nas proximidades do local de isolamento mostraram um percentual de reatividade à histoplasmina de 46,1%.

### INTRODUÇÃO

O estudo do fungo *Histoplasma capsulatum* como agente de infecção humana, a Histoplasmosose, inicia-se com DARLING e ROCHA LIMA em 1906 e 1912, respectivamente. Seguem-se os trabalhos de RILEY & WATSON, De MONBREUM, e, principalmente, os estudos de EMMONS, AJELLO, FURCULOW & SCHWARTZ<sup>3</sup>. A grande maioria dos trabalhos sobre o *Histoplasma capsulatum* é proveniente dos Estados Unidos, onde há uma prevalência bastante alta nos estados do sudeste americano.

Neste país a Histoplasmosose passou de infecção rara e fatal a infecção geralmente benigna e muito comum<sup>10</sup>.

No Brasil, segundo LACAZ<sup>13</sup>, o encontro de *Histoplasma capsulatum*, tanto em cortes histológicos como em cultivo de solo e tecidos infetados, reporta desde 1939 com os trabalhos de ALMEIDA & LACAZ, MADUREIRA PARÁ e PAULA e outros. Segundo este mesmo Autor, SILVA e PAULA observaram a pre-

sença do fungo em *Rattus r. norvegicus*, na Bahia. Posteriormente SILVA<sup>20</sup> conseguiu o isolamento de *H. capsulatum* do solo, ainda no Estado da Bahia.

De animais o *Histoplasma* tem sido isolado com frequência, principalmente de ratos, cães e morcegos<sup>4, 7, 8, 12</sup>. Em Minas Gerais LAMAS & col.<sup>15</sup> isolaram o fungo do cão.

Com referência ao solo, os isolamentos de *H. capsulatum* têm sido numerosos<sup>1, 6, 20, 21</sup> e geralmente correlacionados com habitats nos quais são observados presença de excretas de aves e morcegos, em local aberto ou em cavernas<sup>1, 4, 12, 19, 21</sup>.

A associação bastante acentuada, embora não absoluta, entre *Histoplasma capsulatum* e fezes de aves foi assinalada por ZEIDBERG & col.<sup>21</sup>, embora, posteriormente, AJELLO<sup>1</sup> relate que as aves são refratárias à infecção pela forma miceliana do fungo e não o ex-

Trabalho do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG., Brasil. (Chefe do Departamento: Prof. Wilson Mayrink)

(1) Assistente do Departamento de Parasitologia, I.C.B. da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

cretam através da fezes, em contraposição à hipótese levantada por FURCULOW<sup>11</sup> de que as aves possivelmente fossem carreadoras do histoplasma. Relativamente aos morcegos, tudo indica que estes animais se infetam e eliminam o fungo através das fezes e agiriam, pois, como dispersadores do mesmo<sup>12, 16</sup>.

Nosso trabalho referente ao isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo foi iniciado em 1963. Com alguns interregnos e de modo não sistemático tivemos oportunidade de examinar cerca de 43 amostras de terra provenientes das mais variadas localidades, sempre com resultados negativos. Em 1967 fomos novamente estimulados a realizar pesquisas neste sentido, principalmente tendo em vista um achado de necropsia em uma criança de 18 meses falecida no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG. Como houve a princípio uma suspeita de histoplasmose, deliberamos testar alguns indivíduos residentes no mesmo local de onde proviera a criança, utilizando para tal a histoplasmina.

Os dados obtidos nos animaram a tentar o isolamento do *Histoplasma capsulatum* e o que conseguimos realizar é o motivo do presente trabalho.

#### MATERIAL E MÉTODOS

**Localização** — As famílias testadas, em número de quatro, residem no Distrito de Fidalgo, Município de Lagôa Santa, Estado de Minas Gerais, zona de solo calcáreo e onde existem numerosas grutas. As residências são de alvenaria, de péssima conservação, estão retiradas cerca de 2.000 metros do centro do distrito e afastadas uma das outras por um mínimo de 500 metros. As amostras de solo foram colhidas principalmente na residência A (Quadro I) onde conviviam 13 pessoas e onde ocorreu a doença na criança que mencionamos atrás.

**Testes intradérmicos** — Como antígeno utilizamos a histoplasmina "batch" HCK 5 que nos foi enviada, em 1963, pelo Dr. Michael L. Furculow, do National Communicable Disease Center, Atlanta, EUA, juntamente com as instruções para a sua utilização<sup>9</sup>. O antígeno diluído a 1/500 em solução salina

estéril e o teste realizado através de inoculação intradérmica de 0,1 ml na face flexora do antebraço. A leitura foi realizada após 48 horas e toda pápula de diâmetro acima de 5 mm, envolvida ou não por eritema, era considerada como resultado positivo, tanto em adultos como em crianças.

**Coleta do solo** — Foram coletadas 10 amostras de terra com a seguinte distribuição: 2 amostras de galinheiro; 2 amostras de curral; 1 amostra de pocilga; 3 amostras de periferia de residência e 2 amostras de periferia de paiol.

Destas 10 amostras, seis foram obtidas na residência A, sendo duas de galinheiro, duas de periferia de casa e duas de periferia de paiol. As amostras foram coletadas em sacos de plástico limpos e nunca utilizados.

Colheu-se uma média de 300 g de terra em cada amostra. Estas eram identificadas de acordo com o local e levadas ao laboratório onde eram mantidas fechadas e em temperatura ambiente. Entre a coleta e a inoculação dos camundongos transcorreram de 2 a 7 dias.

**Técnica de isolamento** — Foi utilizada a técnica de EMMONS<sup>6</sup>, modificada por AJELLO<sup>1</sup>, o qual acrescentou antibióticos ao material a ser inoculado em camundongos. Em resumo, a técnica consta do seguinte: a) Aproximadamente 20 g de terra é dissolvida em 30 ml de salina estéril contendo 5.000 unidades de penicilina e 1.000 unidades de estreptomina por ml. Agitar vigorosamente e deixar em repouso durante 60 minutos; b) Colher 10 ml do sobrenadante e inocular 1 ml em cada camundongo, via intraperitoneal; c) Transcorridas 6 a 8 semanas sacrificar os animais e semear pequenas porções de baço e fígado no seguinte meio de cultura:

Neopeptona .....	1 g
Dextrose .....	1 g
Agar .....	2 g
Cloranfenicol .....	0,005 g
Água destilada .....	100 ml

A este meio acrescentamos ainda o antibiótico Cicloheximida (Actidione, Upjhon),

QUADRO I

Teste de histoplasmina em indivíduos residentes em Fidalgo de acordo com a idade, sexo e o diâmetro da pápula

N.º	Residência	Nome	Idade (anos)	Sexo	Diâmetro da pápula em mm
1	A	LMC	37	F	7
2		APC	52	M	11
3		PPC	10	M	11
4		CPC	9	F	0
5		APC	8	M	12
6		ALPC	2	F	0
7		VPC	5	M	0
8		MMPC	14	F	8
9		LPC	7	F	0
10		HPC	13	F	7
11		JPC	17	M	13
12		GPC	11	M	9
13		MC	30	M	10
14	B	ETL	33	F	0
15		VPT	4	F	0
16		VT	6	F	7
17		VT	2	M	0
18		ET	14	M	9
19		GT	1	M	0
20		JT	8	M	0
21	C	CGR	24	F	0
22		MAR	3	M	0
23		MGR	2	M	0
24	D	JVC	6	M	0
25		MVC	5	F	0
26		MVC	12	F	0

conforme aconselha LARSH<sup>16</sup>. Este material nos foi gentilmente cedido em 1963 pelo Prof. Carlos da Silva Lacaz, da Faculdade de Medicina da U.S.P. e nós o utilizamos na dosagem de 2 mg por ml de meio. O pH do meio de cultura é ajustado para 7 antes da autoclavação a 120°C durante 10 minutos.

Em nosso caso um "pool" de fragmentos de baço e fígado de dois camundongos era semeado em cada 5 tubos contendo 10 ml do meio. Assim, para cada amostra eram semeados 25 tubos os quais eram mantidos em temperatura ambiente durante até 2 meses e observados somente com a intenção de se encontrar um crescimento miceliano, bran-

co, cotonoso e de evolução lenta. Os crescimentos que não apresentassem estas características bem evidentes eram desprezados.

O meio foi utilizado durante toda a fase de isolamento. Posteriormente, quando já havíamos obtido a cultura pura, esta passou a ser mantida em meio de Sabouraud simples.

Para o cultivo da amostra em temperatura de 37°C, como medida auxiliar para sua identificação, utilizamos o meio de Kelly, cuja fórmula nos foi fornecida pelo Dr. J. D. Schneidau, do Departamento de Microbiologia da Tulane Medical School, E.U.A., em 1964, quando tivemos oportunidade de estagiar em seu laboratório.

A composição é a seguinte:

Neopeptona .....	10 g
Dextrose .....	10 g
Cloreto de sódio .....	5 g
Extrato de carne .....	3 g
Ágar bacteriológico ....	15 g
Água destilada .....	980 ml

Esterilizar 15 minutos a 15 libras de pressão. Esfriar a 50°C e adicionar hemoglobina (5 ml de sangue integral em 15 ml de água destilada estéril). Misturar e deixar em banho-maria com temperatura de 50°-60°C durante uma noite. Distribuir em tubos estéreis e inclinar. Testar a esterilidade e manter em refrigerador.

#### RESULTADOS

Através da histoplasmina foram testados 26 indivíduos conforme nos mostra o Quadro I. Considerando como reação positiva toda pápula acima de 5 mm de diâmetro, obtivemos um percentual de reativos, para todos os indivíduos testados, de 46,1%, conforme está no Quadro II.

As inoculações em camundongos foram iniciadas em 21/9/67. A 10/11/67 iniciamos o sacrifício dos mesmos e sementeira de baço e fígado no meio descrito. Nas culturas iniciais alguns tubos mostraram crescimentos vários, os quais rapidamente se diferenciavam e tornavam-se pigmentados. Em

12/12/67, em tubos semeados com material de camundongos que haviam sido inoculados com terra de galinheiro, observamos culturas de aparência cotonosa, brancas e que evoluíam lentamente.

Tôdas estas foram repicadas e notou-se a persistência do mesmo tipo de crescimento, o qual permaneceu ainda quando o repique foi realizado em meio de Sabouraud simples. Para identificação da cultura obtida procuramos visualizar os típicos clamidósporos tuberculados do *Histoplasma capsulatum*. Estas estruturas somente iniciaram o seu aparecimento após transcorridos 18 meses do início do cultivo em meio de Sabouraud, e em culturas velhas com aproximadamente 60 dias de evolução. Os clamidósporos tuberculados surgiram após a evidencição de hifas delicadas e septadas, com ramificação e microconídios arredondados e piriformes, os quais sugeriam a presença de *H. capsulatum* mas eram insuficientes para uma identificação segura, embora, como relate LARSH<sup>16</sup>, muitos isolamentos do fungo falham completamente em formar os clamidósporos tuberculados.

Logo que obtivemos as formas acima iniciamos o cultivo em temperatura de 37°C no meio de Kelly descrito. A reversão da forma cotonosa para forma levedura foi bem demonstrada. Somente após 8 repiques realizados com intervalos de 15 dias é que conseguimos obter a fase leveduriforme típica. Com a obtenção das formas características, mostradas na Fig. 1, e com base na morfologia das mesmas, é que concluímos pela identificação do fungo isolado como *Histoplasma capsulatum*.

#### QUADRO II

Teste da histoplasmina em indivíduos residentes em Fidalgo. Número e percentual de reagentes de acordo com o sexo

Sexo	N.º Testados	Negativos	Positivos	% Positivos
Masculino	14	6	8	57,1
Feminino	12	8	4	33,3
T o t a l	26	14	12	46,1

ARAÚJO, F. G. de — Primeiro isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo em Minas Gerais.  
*Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:185-191, 1970.

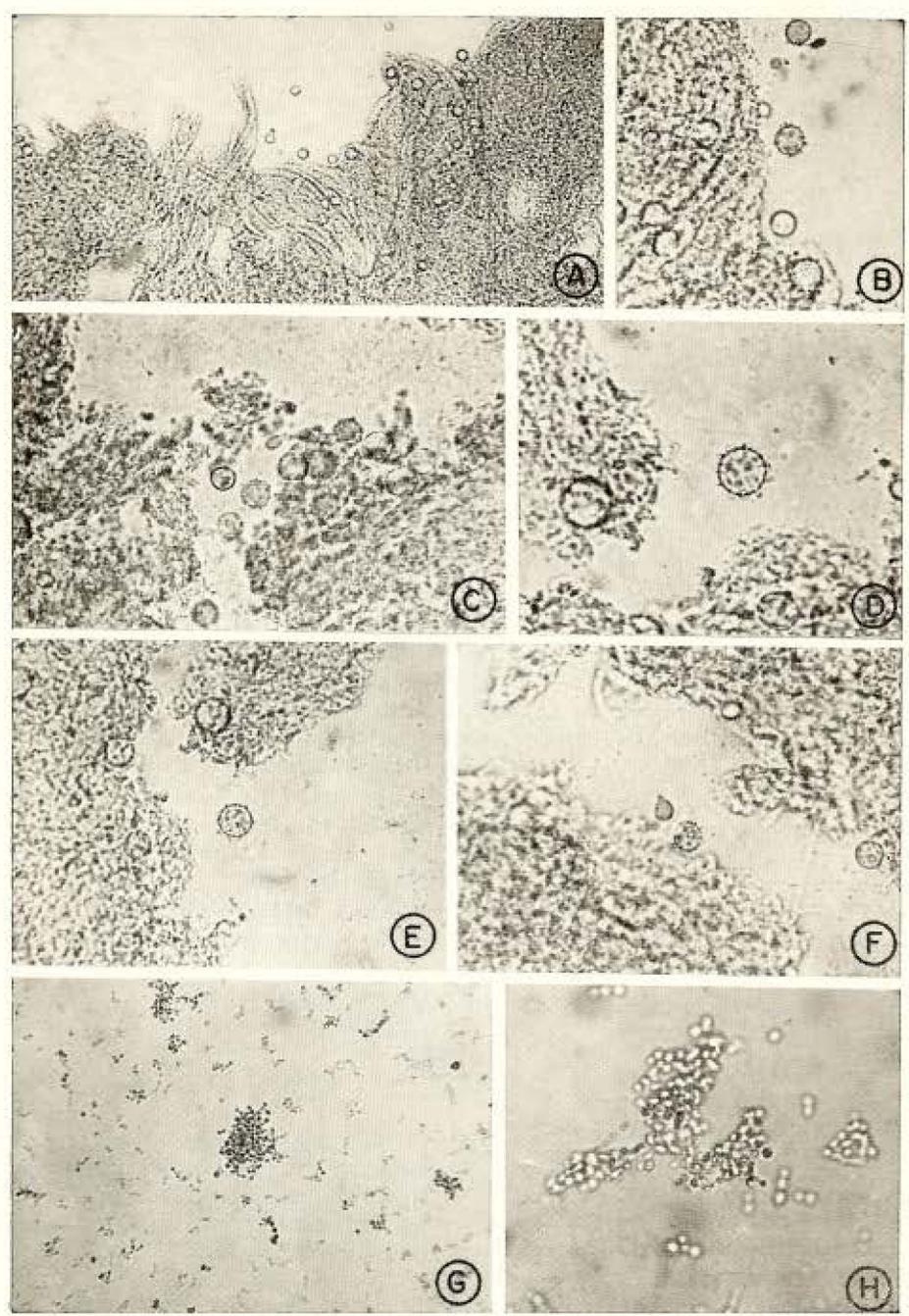


Fig. 1 — A) Aspecto da cultura em temperatura ambiente (60 ×); B e E) Clamidósporos tuberculados (200 ×); C e F) Clamidósporos e microconídios piriformes (200 ×); D) Clamidósporo tuberculado (400 ×); G) Aspecto da cultura a 37°C, com formas em levedura (60 ×); H) Formas em levedura (200 ×)

## DISCUSSÃO

A prevalência de reatores à histoplasmina em nosso país varia de 2,6% até 29,8%, segundo dados apresentados por LACAZ<sup>14</sup>. Em Minas Gerais, com base em testes realizados em estudantes de Medicina, a incidência de reatores é da ordem de 10%. Em outros grupos populacionais representados por indivíduos que realizam trabalhos braçais, lidam com animais e freqüentam os mais variados ambientes com finalidades de captura de insetos e animais silvestres, o percentual de reatores é ligeiramente maior, cerca de 16%<sup>2</sup>. A diferença entre êstes dados e o obtido em Fidalgo é que nos chamou a atenção.

Recentemente OLIVEIRA & col.<sup>17</sup> apresentaram dados relativos ao teste de histoplasmina em soldados da Polícia Militar de Minas Gerais e estudantes de Odontologia.

Encontraram 17,8% e 6,5% de reatores respectivamente. Descrevem ainda a tentativa de isolamento do *H. capsulatum* da gruta da Maquiné em Minas Gerais, e, à semelhança do que ocorreu na gruta da Lapinha, também em Minas, e por nós testada<sup>2</sup>, os resultados foram negativos.

A associação entre *Histoplasma capsulatum* e excretas de aves foi observado em nosso trabalho, desde que, de tôdas as amostras testadas, somente uma coletada em terra de galinheiro mostrou-se positiva. Conforme salienta AJELLO<sup>1</sup>, as aves são refratárias à infecção e não eliminam o *Histoplasma* pelas fezes. Entretanto, com referência aos morcegos, tal não ocorre<sup>19</sup>.

Nas residências por nós testadas os habitantes não relataram a presença dêstes animais como existentes nas mesmas. Porém, em se tratando de zona rural onde existe um grande número de cavernas e grutas nas quais morcegos são assinalados com freqüência, é possível que os mesmos, esporadicamente, tenham acesso às residências e a abrigos de animais. O galinheiro de onde foi isolado o *H. capsulatum* não seria ideal para a instalação de uma colônia de morcegos, todavia, oferece plenas condições de um abrigo temporário para êstes animais.

Infelizmente não tivemos dados seguros que nos permitissem culpar o *Histoplasma* pelo

falecimento da criança que mencionamos. Os dados do teste intradérmico, entretanto, fizeram com que supuséssemos da existência do mesmo no local, o que foi posteriormente comprovado pelo seu isolamento. Ainda não dispomos de informações que nos permitam avaliar a importância dêste achado com relação à Histoplasmosose como doença humana em nosso meio. Esperamos que o presente trabalho chame atenção para o problema em nosso Estado, de maneira que no futuro novos dados possam ser coletados a respeito.

## SUMMARY

*First isolation of Histoplasma capsulatum from soil of Minas Gerais (Brasil)*

*Histoplasma capsulatum* was isolated from soil collected in a chicken yard which was located in the rural area of the District of Fidalgo, Lagoa Santa County, Minas Gerais State, Brazil.

The identification of the fungus was based on its morphology in cultures. Yeast forms were obtained at 37°C, and the typical tuberculated chlamydo-spores were clearly demonstrated at room temperature.

The technic of intraperitoneal inoculation of soil in mice and posterior cultivation of their spleen and liver in specific culture media was used.

People living around the point of isolation of the fungus were tested through the histoplasmin intradermal test, and 46.1 per cent showed a positive reaction.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Amilcar Vianna Martins pelo estímulo que sempre nos proporcionou não só para a realização do presente trabalho, como também para tôdas as nossas atividades de ensino e pesquisa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJELLO, L. — *Histoplasma capsulatum* soil studies. Separata de trabalho apresentado no IX International Botanical Congress, Montreal, Canadá, 1959.
2. ARAUJO, F. G. — Dados não publicados.

3. BAUM, G. L. — The history of Histoplasmosis. In *Histoplasmosis*. Ed. by H. C. Sweany. Springfield, Charles C. Thomas, 1960, pp. 14.
4. EMMONS, C. W. — Association of bats with Histoplasmosis. *Pub. Health Rep.* 73: 590-595, 1958.
5. EMMONS, C. W. — Saphrophytic reservoirs of Histoplasma. In *Histoplasmosis*. Ed. by H. C. Sweany. Springfield, C. C. Thomas Publ., 1960, pp. 81.
6. EMMONS, C. W. — Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Pub. Health Rep.* 64:892-896, 1949.
7. EMMONS, C. W.; BELL, J. A. & OLSON, B. J. — Naturally occurring Histoplasmosis in *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. *Pub. Health Rep.* 62:1642-1646, 1947.
8. EMMONS, C. W.; ROWLEY, D. A.; OLSON, B. J.; MATTERN, C. F.; BELL, J. A.; POWELL, E. & MARCEY, E. A. — Histoplasmosis. Proved occurrence of inapparent infection in dogs, cats and other animals. *Amer. J. Hyg.* 61:40-44, 1955.
9. FURCULOW, M. L. — Instructions for dilution and administration of skin test antigens. National Communicable Disease Center. Kansas City Field Station, Kansas, U.S.A., 1963. (Separata mimeografada).
10. FURCULOW, M. L. — Histoplasmosis. *C. P.* 18:117-127, 1958.
11. FURCULOW, M. L. — Recent studies on the epidemiology of Histoplasmosis. *Ann. New York Acad. Sci.* 72:127-164, 1958.
12. KLITE, P. D. & DIERKES, F. H. — *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the Canal Zone. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 14:433-439, 1965.
13. LACAZ, C. da S. — *Manual de Micologia Médica*. 3.<sup>a</sup> Edição, São Paulo, Atheneu, 1960.
14. LACAZ, C. da S. — *Compêndio de Micologia Médica*. São Paulo, Sarvier, 1967.
15. LAMAS, J. M.; BARBOSA, M. & HIPÓLITO, O. — Um caso de Histoplasmosose em cão em Minas Gerais. *Arq. Escola Superior Vet. Minas Gerais* 13:101-106, 1960.
16. LARSH, H. W. — Diagnostic procedures in the study of *Histoplasma capsulatum*. In *Histoplasmosis*. Ed. by H. C. Sweany. Springfield, C. C. Thomas Publ. 1960, pp. 149.
17. OLIVEIRA, L. G.; DAMASCENO, C. A. V.; NOGUEIRA, F. S.; NEVES, L.; MELO, G. R. & CARVALHO, M. A. R. — Prova de sensibilidade à histoplasmina em indivíduos de várias regiões, principalmente do Estado de Minas Gerais. *Rev. Ass. Méd. Minas Gerais* 20:93-98, 1969.
18. SCHNEIDAU, J. D. — Informação ao Autor.
19. SHACKLETTE, M. H.; HASENCLEVER, H. F. & MIRANDA, E. A. — The natural occurrence of *Histoplasma capsulatum* in a cave. *Amer. J. Epidemiol.* 86:246-252, 1967.
20. SILVA, M. E. — Isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo de zona endêmica de calazar na Bahia. *Bol. Fund. Gonçalo Moniz* 10:1-15, 1956.
21. ZEIDBERG, L. D.; AJELLO, L.; DILLON, A. & RUNYON, L. C. — Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Amer. J. Public Health* 42:930-935, 1952.

Recebido para publicação em 19/12/1969.