

INCIDÊNCIA DE HISTOPLASMOSE EM ESPELEÓLOGOS E MONITORES AMBIENTAIS DO PARQUE ESTADUAL TURÍSTICO DO ALTO RIBEIRA (PETAR)

Daniela Tomochigue dos ANJOS^{1,2,3,4}; Érica NUNES^{1,2}; Renê de SOUZA²; Adriana Vicentini MOREIRA³ e Marta Cristina SOUZA¹.

¹Universidade Metodista de São Paulo (UMESP)

²Grupo de Estudos da Serra do Mar (GESMAR)

³Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL)

⁴danieladosanjos@yahoo.com.br

Abstract

*The histoplasmosis is a mycosis caused by dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* and it grows in rich soils in nitrogen like the ones found on bat guano. The infection happens through the inhalation of spores (microconidia) found in contaminated soil.*

The histoplasmosis is generally an asymptomatic disease, although, depending on the body's immunity, the symptoms can be since a common cold to disseminated lesions.

The diagnostic of histoplasmosis is essentially clinic and diagnostics tests like immunodiffusion and immunoblotting evaluate the amount of antibodies against the fungus.

This research, aimed to evaluate histoplasmosis in speleologists and ambient monitors from PETAR (Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira).

The results of the research were: 11% positive cases in immunodiffusion, 100% positive cases in M band and 33,3% positive in H band in immunoblotting.

However, this studies are predominantly laboratories research and we are not able to affirm if the volunteers have histoplasmosis, but that they have been in contact with the fungus in some point of their lives

1 - Introdução

A histoplasmoze clássica ou Doença de Darling como também é conhecida, é uma micose sistêmica, ou seja, é uma infecção fúngica que acomete os órgãos internos. É provocada pela inalação de microconídios da fase micelial do fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Unis *et al.*, 2004). Foi observada pela primeira vez em dezembro de 1905 por Samuel Taylor Darling, durante uma necropsia realizada no Ancor Hospital no Panamá, sendo classificada entre os fungos por Rocha Lima em 1912 (Lacaz *et al.*, 2002).

O *H. capsulatum* se desenvolve em solos ricos em nitrogênio presentes nas fezes de aves e morcegos, portanto, árvores ocas, construções antigas e cavernas habitadas por esses animais são importantes fontes de infecção (Cury *et al.*, 2001). Uma outra fonte de infecção ocorre pela suspensão e propagação das partículas infectantes no solo contaminado pelo vento, ou ainda, pela remoção do solo ou guano contaminado (Kern *et al.*, 1999).

À temperatura ambiente, cultivado em BHI ou SABHI, as colônias da forma filamentosa tornam-se maduras de 15 a 25 dias. Apresentam coloração creme, castanha ou rosa, textura úmida ou espinhosa e de topografia elevada ou enrugada, no aspecto microscópico onde se visualiza hifas finas,

septadas e hialinas com microconídios sobre as hifas ou sobre curtos conidióforos (Fischer *et al.*, 2001).

A 37°C, as colônias leveduriformes surge depois de 10 a 15 dias em SABHI, são brancas a castanho claras, mucóides e de textura grosseiramente membranosa. Microscopicamente as leveduras assemelham-se às de leveduras do gênero *Candida*, com blastoconídios pequenos (2 a 5 µm) globosos e ovóides.

Em pacientes imunocompetentes, a histoplasmoze é benigna, assintomática ou subclínica, apresentando sintomas gripais que espontaneamente se resolvem (Kern *et al.*, 1999), mas de acordo com a exposição às formas infectantes do fungo, pode ocorrer uma forma pulmonar aguda, podendo agravar-se se o tempo de exposição com essas formas infectantes for muito grande (Unis *et al.*, 2005) acarretando à disseminação da histoplasmoze (Fortaleza *et al.*, 2004).

Na histoplasmoze pulmonar aguda os pacientes podem apresentar quadro de febre alta persistente, tosse seca, astenia e anorexia. Em exames de imagem como radiografias e tomografia computadorizada, esses pacientes apresentam infiltrados retículos nodulares grosseiros, nódulos difusos e bilaterais e linfonodomegalia (Martins *et*

al., 2003). A pulmonar crônica apresenta nos pulmões nódulos que variam de 0,7 a 2,7 cm de diâmetro, sob a forma de granuloma com necrose caseosa, denominado histoplasmona (Unis *et al.*, 2005).

A forma disseminada apresenta febre, anorexia, emagrecimento e sudorese (92,7%); tosse, expectoração, dispnéia (92,7%); comprometimento pulmonar (29,3%), de mucosas (29,3%), sistema monocítico-macrofágico (22%), adrenal (22%), sistema nervoso central (17,1%), cutâneo (14,6%) e laringe (12,2%) (Unis *et al.*, 2004).

Em pacientes com extremos etários e imunodeprimidos como doentes neoplásicos, HIV positivos e transplantados, a histoplasmose se dissemina via hematogênica, podendo acometer a pele (38,8%), medula óssea (27,7%), mucosa nasofaríngea (22,2%), pulmão, cólon e SNC. Esses pacientes também podem apresentar adenomegalia, hepatomegalia (77,7%), esplenomegalia (61,1%) e pancytopenia (Borges *et al.*, 1997).

O diagnóstico da histoplasmose é realizado através do exame direto, utilizando escarro, lavado broncoalveolar, biópsias de tecido acometido, necropsia ou pus aspirados de locais de drenagem com auxílios de corantes. As reações intradérmicas têm de pequeno valor diagnóstico, mas são úteis como ferramentas epidemiológicas, pois indicam uma exposição tanto recente quanto passada ao fungo, mas apresentam limitações devido à produção de anticorpos. Por isso, em caso de confirmação por testes sorológicos, é necessário que as coletas de amostras sejam realizadas antes da aplicação do teste intradérmico (Fischer *et al.*, 2001). A imunodifusão dupla é a prova mais empregada para o diagnóstico devido à sua sensibilidade e especificidade. A prova positiva mostra duas faixas de precipitação (no encontro do antígeno com o anticorpo) na histoplasmose ativa, denominadas: H e M. Após a recuperação do doente, a faixa H pode persistir e a M aparece mais precocemente, isso também pode ocorrer após a prova intradérmica em indivíduos mais sensíveis (Lacaz *et al.*, 2002).

A histoplasmose é uma doença cosmopolita, prevalecendo na região central dos Estados Unidos, México (Taylor *et al.*, 1997), Venezuela e Guatemala (Garcia-Vazquez *et al.*, 2005). No Brasil sua incidência difere nas regiões: Centro-Oeste (9,6-63,1%), Nordeste (2,6-61,5%), Norte (12,8-50,1%), Sudeste (4,6-93,2%) e Sul (6,3-89%) (Sidrim *et al.*, 2004).

O tratamento da histoplasmose se faz pela anfotericina B (Martins *et al.*, 2003), itraconazol,

cetoconazol (Cury *et al.*, 2001) e fluconazol (Kucharski *et al.*, 2000)

2. Relevância

O Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) representa uma região de conservação ambiental que abrange cerca de 250 cavernas cadastradas (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2007), muitas das quais habitadas por morcegos (ordem Chiroptera). No local estão representados 50% da fauna total da Mata Atlântica (Taddei *et al.*, 1998). Este rico patrimônio subterrâneo atrai muitos pesquisadores espeleólogos (arqueólogos, biólogos, geólogos, químicos, etc.) e turistas, proporcionando a prática do turismo como uma das principais fontes de renda da região. (Karmann *et al.*, 2000).

Uma das normas de visitação do Parque é a obrigatoriedade de acompanhamento de um monitor ambiental local durante a visitação às cavidades. Portanto, a exposição constante destes pesquisadores, monitores e turistas ao ambiente cavernícola, possivelmente acarretaria a inalação de microconídeos de *Histoplasma capsulatum*, aumentando a suscetibilidade desses indivíduos desenvolverem a infecção.

A região é deficiente ao acesso de serviços de saúde, não contando com hospitais, laboratórios ou clínicas, dependendo apenas das unidades de saúde básica.

Os espeleólogos por sua vez, desenvolvem diversas atividades no interior das cavernas, tais como exploração, topografia, fotografia e também mergulho. Nestas cavernas existe possibilidade de inalação por suspensão dos esporos de *Histoplasma capsulatum*, devido à permanência dos espeleólogos por longos períodos no interior das cavidades, propiciando um maior risco de inalação de microconídeos.

3. Objetivos

Fazer o levantamento através de métodos imunológicos da incidência de histoplasmose em espeleólogos e monitores ambientais do PETAR.

4. Metodologia

4.1. Área de estudo

Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), conta com 250 cavernas catalogadas, cachoeiras e trilhas pela Mata Atlântica, localizado ao sul do Estado de São Paulo, abrangendo parte dos municípios de Iporanga e Apiaí. Partindo de São Paulo, seus acessos principais são através das rodovias SP 280 (passando por Apiaí) ou BR 116

(Régis Bittencourt), por Jacupiranga e Iporanga. O PETAR é dividido em duas áreas principais de visitação, denominados núcleo Santana (setor sul do parque) e Cablocos (setor norte) onde os monitores locais seguem roteiros elaborados nesses núcleos e acompanham os visitantes (Karmann *et al.*, 2000).

O Centro Integrado de Estudos Multidisciplinares (CIEM), localizado na cidade de Apiaí, é uma unidade pertencente ao Serviço Geológico do Brasil (CPRM). No local, ocorrem diversas atividades como cursos, exposições e eventos científicos (CPRM, 2007). Um importante evento científico sediado no CIEM em 2007 foi o Encontro Paulista de Espeleologia (EPELEO), promovido anualmente pela Sociedade Brasileira de Espeleologia (SBE), cujo princípio é interagir os diferentes espeleólogos, grupos de espeleologia e profissionais que atuam na área, promovendo cursos, palestras, saídas a campo, dentre outras atividades. (SBE-Notícias, 2007).

Participaram deste estudo os espeleólogos presentes no XVI Encontro Paulista de Espeleologia em Apiaí e monitores ambientais da cidade de Iporanga, totalizando 37 voluntários, sendo 32 deles espeleólogos e 5 deles, monitores ambientais do PETAR.

Os voluntários que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos (TCLE), onde foram expostos os objetivos da pesquisa e a atuação do voluntário na mesma; preencheram o questionário com informações epidemiológicas relacionadas à histoplasmose e doaram uma amostra de sangue para a pesquisa de anticorpos contra o *Histoplasma capsulatum*.

4.2. Testes imunológicos

Imunodifusão

É uma técnica de precipitação realizada num gel de agarose sobre uma lâmina de vidro, onde antígeno (proteína produzida pelo fungo) e anticorpo se difundem um em direção ao outro formando linhas de precipitação (Freitas, 2004).

Immunoblotting

É uma técnica que utiliza como suporte uma membrana de nitrocelulose onde se encontra o antígeno já fixado e separado por peso molecular. Em seguida, é incubado o soro com os possíveis anticorpos contra o fungo. Na presença de anticorpos, há ligação entre antígeno-anticorpo, que ao ser revelada, é visualizada pela presença das bandas M e/ou H que correspondem às proteínas M e/ou H produzidas pelo fungo.

O immunoblotting é um teste altamente sensível, utilizado para confirmar casos de histoplasmose quando se têm fortes indícios como uma biópsia positiva, ou cultura do fungo positiva e que sejam negativos no teste de imunodifusão. É utilizado também em testes para avaliação e antígenos e em estudos epidemiológicos. Este teste tem por objetivo identificar as bandas que caracterizam a infecção pelo *Histoplasma capsulatum*, a banda M e banda H (Guimarães *et al.*, 2006).

5. Resultados parciais e discussão

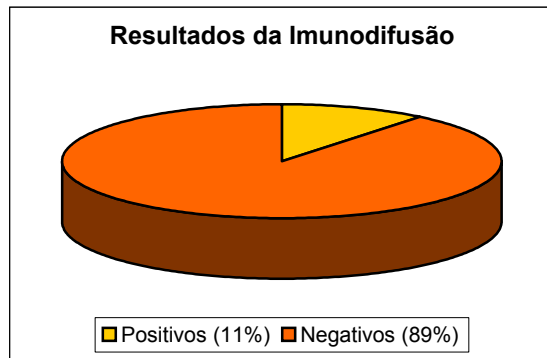
5.1. Perfil dos avaliados pelos questionários

- A faixa etária média: 33 anos;
- 46% são do sexo feminino;
- 54% são do sexo masculino;
- 29% dos voluntários afirmaram ser tabagistas;
- 33% dos voluntários afirmaram consumir bebida alcoólica aos finais de semana;
- 46% dos voluntários costumam permanecer mais de 5 horas no interior das cavernas;
- 4% afirmam visitar na sua maioria, os salões secos;
- 37,5% já apresentaram sintomas gripais após visitar uma caverna;
- 92% não usam máscaras durante a atividade espeleológica;
- 67% dos voluntários já rastejaram no interior da caverna em contato com guano;
- 50% limpam o rosto com as mãos após terem entrado em contato com guano;
- 54% não lavam as mãos após ter deixado a caverna e antes de comer;
- 67% dos voluntários ingerem água das minas existente no interior ou próximas às cavernas.

5.2. Teste de Imunodifusão

No teste de imunodifusão, foi obtido o seguinte resultado:

Das 37 amostras testadas, 33 apresentaram resultado negativo, caracterizado pela ausência das linhas de precipitação. Foram observadas também 04 amostras apresentaram resultado positivo, com presença de linhas de precipitação; representando 11% das amostras testadas. Ambos resultados estão representados no gráfico abaixo:



A imunodifusão é um teste simples e de baixo custo, portanto é amplamente utilizado na rotina de diagnóstico dos fungos sistêmicos e na manutenção de tratamento. Portanto, em casos de histoplasmose assintomática ou em infecções passadas, é pouco provável que haja positividade pela visualização das linhas de precipitação, caracterizando uma possibilidade maior de resultados falso-negativos. Porém em indivíduos com doença ativa, seja ela aguda ou crônica, a imunodifusão representa um teste de extrema importância, já que nestes casos, sua positividade pode chegar a 100% (Guimarães *et al.*, 2006).

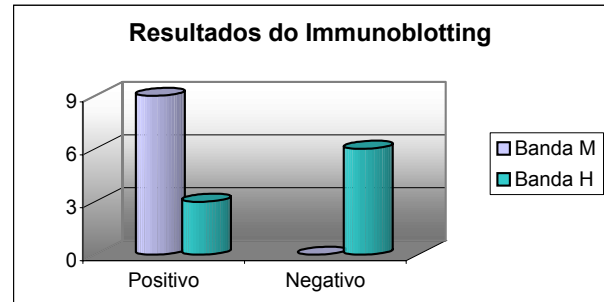
Relacionando com os resultados obtidos, é possível que os indivíduos voluntários neste estudo tenham entrado em contato em alguma vez com o fungo (não necessariamente durante a atividade espeleológica), porém, no momento da coleta, 33 deles apresentaram quantidade de anticorpos detectáveis ou possivelmente devem ser portadores assintomáticos da histoplasmose. Em relação aos 4 voluntários que tiveram seus testes positivos, não é possível afirmar que eles estão com doença em curso, e sim, que possuem níveis de anticorpos relativamente expressivos, pois entraram em contato com o *H. capsulatum*; para comprovar a presença de histoplasmose-doença, seria necessário uma avaliação médica, onde seriam abordados pontos como sintomatologia e pesquisa direta do agente etiológico causador da histoplasmose.

5.3. Teste Confirmatório de Immunoblotting

Devido à disponibilidade de testes no laboratório, foram selecionados, de forma aleatória, 9 amostras que apresentaram resultado negativo pelo método de imunodifusão.

No teste de Immunoblotting, foi obtido o seguinte resultado:

Do total de 9 (100%) amostras testadas pelo Immunoblotting, todas apresentaram a Banda M, dentre as quais, em relação à Banda H, 3 (33,3%) amostras foram positivas e 6 (66,6%) foram negativas. Estão representadas no gráfico abaixo:



A banda M, uma glicoproteína de 70 a 94 kDa, sugere que há histoplasmose aguda ou crônica, ou ainda, pode sugerir infecção passada. A banda H, uma glicoproteína de 108 a 120 kDa, sugere histoplasmose disseminada. Essa banda tende a desaparecer logo após tratamento e cura do paciente. Porém pode manter-se em até 2 anos após o contato com o fungo (Freitas, 2004).

Portanto pode-se afirmar que 6 voluntários se curaram espontaneamente durante infecção passada ou já entraram em contato com o fungo provavelmente há mais de 2 anos, já que houve visualização da banda M sem a banda H. Pode ser possível também que tenham sido imunizados pela reação intradérmica de histoplasmina já que este tipo de teste pode influenciar a formação de anticorpos anti-fração M.

Já os 3 voluntários que apresentam as duas bandas, H e M, podem ser sugestivos de doença ativa, seja ela aguda ou crônica, ou ainda, infecção recente ou contínua, dentro do período de 2 anos. Porém como no teste de imunodifusão não houve positividade, descarta-se o estado de doença ativa.

6. Conclusão

Neste trabalho através dos resultados parciais obtidos, sugere-se que a histoplasmose pode ser uma doença ocupacional relevante, já que todos os voluntários negativos na imunodifusão encontraram em contato com o *Histoplasma capsulatum* confirmado pelo teste de Immunoblotting. E como o desenvolvimento sintomático da histoplasmose está associado à imunidade do indivíduo e à quantidade de esporos inalada, seria interessante criar métodos de evitar à exposição contínua a esses esporos.

Porém como se trata de resultados parciais, é necessário avaliação dos outros voluntários para uma melhor conclusão do estudo.

7. Agradecimentos

A todos os co-autores deste projeto:

- Érica, pelos procedimentos pré-analíticos, pelo incentivo e principalmente pela paciência;



- Renê, pelos contatos obtidos em Iporanga e Apiaí, e pela excelente idéia de incluir os espeleólogos neste projeto, permitindo assim, o prosseguimento do estudo;
- Dra. Adriana, pela co-orientação, por ceder gentilmente seu laboratório para a execução dos testes e pelo ensino de todas as técnicas utilizadas;
- Profa. Dra. Marta, pela orientação, pelo interesse no projeto e por toda ajuda, paciência, incentivo e amizade.
- A todos integrantes do GESMAR pela amizade e incentivo;
- À Valdene Kohara e à Lúcia Barreto, do Laboratório Imunodiagnóstico das Micoses, pela amizade e pela colaboração nos testes;
- À Juliana Possatto e à Roseli Freitas pela amizade, pelos contatos e por toda a força e carinho em colaborar;
- E a todos os voluntários que aceitaram participar deste estudo.

Outros agradecimentos:

8. Referências

- BORGES, A. S. *et al.* **Histoplasmose em pacientes imunodeprimidos: estudo de 18 casos observados em Uberlândia, MG.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 30, n. 2, p. 119-124, 1997.
- CPRM – SERVIÇO GEOLÓGICO DO BRASIL. **CIEM – Centro Integrado de Estudos Multidisciplinares de Apiaí.** Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/sureg-sp/ciem/ciem.htm> . Acessado em: 21 abr. 2007.
- CURY, G. C. *et al.* **Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.34, n.5, p. 483-486, 2001.
- FISCHER, F. *et al.* **Micologia: fundamentos e diagnósticos.** Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- FORTALEZA, S. C. B. *et al.* **Histoplasmose disseminada aguda em indivíduo imunocompetente.** *J. bras. pneumol.* v. 30, n. 3, p. 270-273, 2004.
- FREITAS, R. S. **Caracterização Imunoquímica de Isolados de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.** Tese de Mestrado. Instituto Adolfo Lutz, 2004.
- GARCIA-VÁZQUEZ, E. *et al.* **Histoplasma capsulatum infection in a group of travelers to Guatemala.** *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v. 23, n. 5, p. 274-6, 2005.
- GUIMARÃES, A. J., NOSANCHUK, J. D. e ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. **Diagnosis of Histoplasmosis.** *Brazilian Journal of Microbiology.* v. 37, n. 1, p. 13. 2006.
- KARMANN, I. e Ferrari, J. A. 2000. **Carste e cavernas do Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), sul do Estado de São Paulo.** In: Schobbenhaus, C.; Campos, D. A.; Queiroz, E. T.; Winge, M.; Berbert-Born, M. (Edit.) *Sítios Geo-lógicos e Paleontológicos do Brasil.* Disponível em: <http://www.unb.br/ig/sigep/sitio043/sitio043.htm> . Acessado em: 24 ago. 2005.
- KERN, M. E *et al.* **Micologia médica: texto e atlas.** 2º ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999. p. 210.
- KUCHARSKI, L. D. *et al.* **Disseminated cutaneous histoplasmosis and AIDS: case report.** *Braz J Infect Dis.* v. 4, n. 5, p. 255-61, 2000.
- LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de micologia médica Lacaz.** 9º ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- MARTINS, E. M. L. *et al.* **Histoplasmose pulmonar aguda: relato de uma microepidemia.** *Radiol Brás.* v. 36, n. 3, p. 147-151, 2003.



- SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **PETAR – Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira**. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/parques/petar.htm> . Acesso em: 26 abr. 2007.
- SBE-NOTÍCIAS. **Boletim Eletrônico da Sociedade Brasileira de Espeleologia**. n. 40, p. 02. Disponível em: http://www.sbe.com.br/sbenoticias/SBENoticias_040.pdf . Acesso em: 21 abr. 2007.
- SIDRIM, J. J. C. *et al.* **Micologia Médica À Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- TADDEI, V. A. e PEDRO, W. A. **Morcegos (Chiroptera, Mammalia) do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo: Diversidade de Espécies**. Anais do VII Seminário Regional de Ecologia. v. 8, p. 911-919, 1998.
- TAYLOR, M. L. *et al.* **Imunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: studies in the State of Guerreiro, Mexico**. Mycopathologia. v. 138, n. 3, p. 137-42, 1997.
- UNIS, G. *et al.* **Histoplasmoma pulmonar no Rio Grande do Sul**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 38, n.1, p. 11-14, 2005.
- UNIS, G. *et al.* **Histoplasmose disseminada no Rio Grande do Sul**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 37, n. 6, p. 463-468, 2004.